

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TESE**

**Efeitos do hidrato de morina sobre o desenvolvimento e  
metabolismo de *Aedes aegypti***

**Luan Valim dos Santos**

**Novembro/2025**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Efeitos do hidrato de morina sobre o desenvolvimento e  
metabolismo de *Aedes aegypti***

**LUAN VALIM DOS SANTOS**

*Sob orientação do professor*  
**Emerson Guedes Pontes**

Tese submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Química,  
no Programa de Pós-Graduação em  
Química, Área de Concentração em  
Química.

Seropédica, RJ

Novembro/2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237e Santos, Luan Valim dos, 1994-  
Efeitos do hidrato de morina sobre o  
desenvolvimento e metabolismo de Aedes aegypti /  
Luan Valim dos Santos. - Rio de Janeiro, 2025.  
206 f.

Orientador: Emerson Guedes Pontes.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química, 2025.

1. Flavonoide. 2. controle biológico. 3.  
desenvolvimento. 4. metabolismo energético. 5.  
suscetibilidade vetorial. I. Pontes, Emerson Guedes,  
1974-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Química III.  
Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LUAN VALIM DOS SANTOS**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

**TESE APROVADA EM 27/11/2025**

Emerson Guedes Pontes Dr. UFRRJ  
(Orientador)

Marco Edilson Freire de Lima Dr. UFRRJ

Douglas Siqueira de Almeida Chaves Dr. UFRRJ

Katia Calp Gondim Dra. UFRJ

Ademir de Jesus Martins Junior Dr. Fiocruz



**TERMO Nº 1136/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)**

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 02/12/2025 14:46 )  
DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)  
Matrícula: ####050#5

(Assinado digitalmente em 04/12/2025 13:59 )  
EMERSON GUEDES PONTES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DBQ (11.39.00.24)  
Matrícula: ####553#7

(Assinado digitalmente em 02/12/2025 09:20 )  
MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DQO (11.39.00.23)  
Matrícula: ####587#8

(Assinado digitalmente em 02/12/2025 14:13 )  
KATIA CALP GONDIM  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ####.###.557-##

(Assinado digitalmente em 02/12/2025 14:57 )  
ADEMIR DE JESUS MARTINS JUNIOR  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ####.###.057-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 1136, ano: 2025, tipo: TERMO, data de emissão: 02/12/2025 e o código de verificação: 35a5689342

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi possível graças à contribuição de diversas pessoas e instituições, às quais registro minha sincera gratidão.

À minha família, expresso profundo reconhecimento pelo apoio incondicional, pela compreensão nas ausências e pelo incentivo constante ao longo desta jornada acadêmica. O suporte emocional e a confiança depositada em meu percurso científico foram essenciais para a conclusão desta tese.

A todas as pessoas queridas que fizeram parte desta jornada, agradeço pelo incentivo, pelo refúgio em momentos de exaustão e por tornarem o percurso acadêmico mais leve e significativo. Àqueles que acompanharam de perto os desafios deste processo e ofereceram suporte emocional genuíno, minha sincera gratidão.

Ao meu orientador, registro meu reconhecimento pela orientação formal ao longo desta trajetória, iniciada ainda na Iniciação Científica. Apesar dos desafios inerentes ao processo, sua contribuição institucional foi relevante para a consolidação deste projeto. Além da parceria e dos conselhos ao longo desses 12 anos.

Aos colegas de laboratório e demais colaboradores do grupo de pesquisa, minha gratidão pela convivência científica e pelo compartilhamento de experiências, ideias e esforços. A interação constante em ambiente de pesquisa foi determinante para a construção dos resultados aqui apresentados. Agradeço também aos técnicos e profissionais de apoio, cujo trabalho silencioso e preciso foi fundamental para a execução das etapas experimentais.

Aos membros da banca examinadora, agradeço pela disponibilidade em avaliar este trabalho, pelas contribuições substanciais e pela qualidade das discussões propostas. As observações apresentadas representam valiosas perspectivas científicas que enriquecem não apenas esta tese, mas minha formação enquanto pesquisador.

Por fim, agradeço a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada colaboração, por menor que pareça, integrou um processo coletivo que culmina na finalização desta tese.

*“Conhecimento que não muda o  
comportamento é inútil.”*

*(Yuval Noah Harari)*

## Índice de Figuras

Figura 1 Estrutura química geral dos flavonoides .....	23
Figura 2. Representação estrutural das principais subclasses de flavonoides .....	25
Figura 3. Distribuição global prevista de <i>Aedes aegypti</i> .....	28
Figura 4 Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	30
Figura 5 Taxa de sobrevivência de larvas tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.....	46
Figura 6. Taxas diárias de pupação e mortalidade após tratamento com hidrato de morina....	49
Figura 7. Postura de ovos por fêmeas submetidas a diferentes concentrações de hidrato de morina durante a fase larval.....	51
Figura 8. Taxa de eclosão de ovos postos por fêmeas tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.....	52
Figura 9. Prevalência de infecção e carga viral em fêmeas adultas após 7 dias de alimentação sanguínea pelo vírus Mayaro .....	55
Figura 10. Esquema representativo do trato digestivo de larvas de mosquitos.....	65
Figura 11. O corpo gorduroso em um esquema anatômico do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	68
Figura 12. Corte histológico transversal do abdome de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentada com açúcar.....	69
Figura 13. Transporte de lipídios via lipoforinas .....	72
Figura 14. Lipólise comparada de mamíferos e insetos .....	74
Figura 15. Lipogênese .....	75
Figura 16. Modelo esquemático da biossíntese e hidrólise do glicogênio e trealose .....	77
Figura 17. Conteúdo de triacilglicerol em larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina .....	92
Figura 18. Expressão de genes do metabolismo lipídico em larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.....	94
Figura 19. Níveis de carboidratos em larvas tratadas com hidrato de morina.....	99
Figura 20. Expressão de genes do metabolismo do glicogênio em larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina .....	100
Figura 21. Expressão de genes do metabolismo do glicogênio em larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina .....	102

Figura 22. Produção de peróxido de hidrogênio em larvas inteiras e no intestino de <i>Aedes aegypti</i> após exposição ao hidrato de morina.....	104
Figura 23. Tamanho larval de <i>Aedes aegypti</i> submetido a tratamento cruzado entre dieta padrão e exposição ao hidrato de morina .....	127
Figura 24. Níveis de proteínas totais e triacilglicerol em larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao tratamento cruzado entre dieta padrão e exposição ao hidrato de morina.....	130
Figura 25. Quantificação de carboidratos em larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao tratamento cruzado entre dieta padrão e exposição ao hidrato de morina .....	131

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 Sequências dos primers utilizados para checar a infecção por vírus Mayaro.....	42
Tabela 2. Sequências e informações obtidas de curvas de calibração de primers usadas em qPCR.....	89
Tabela 3. Valores nutricionais da ração de gato.....	122
Tabela 4 Aminoácidos identificados na análise relativa do perfil metabólico.....	134
Tabela 5 Ácidos orgânicos identificados na análise relativa do perfil metabólico. ....	143
Tabela 6. Compostos nitrogenados e carboidratos identificados na análise relativa do perfil metabólico.....	152

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

20E	20-Hidroxiecdisona
ACC	Acetyl-CoA carboxilase
AKH	Hormônio Adipocinético
AKHR	Receptor do Hormônio Adipocinético
ATGL	Lipase triglycerídica adiposa
bmm	Brummer
C+	Controle alimentado com ração
C-	Controle sob jejum
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CAT	Catalase
CGI-58	Gene Comparativo de Identificação 58
CL	Concentração letal
DAG	Diacilglicerol
DGAT1	Diacilglicerol aciltransferase-1
FA	Ácido graxo livre
FAS	Ácido graxo sintase
FAS1	Ácido graxo sintase-1
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GLUT	Transportador de glicose
GP	Glicogênio fosforilase
GPAT1	Glicerol-3-fosfato aciltransferase-1
GS	Glicogênio sintase
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa S-transferase
JH	Hormônio juvenil
HSL	Lipase hormônio sensível
ILP	Peptídeos semelhantes à insulina

ILr	Receptor de peptídeos semelhantes à insulina
Lsd1	Lipid storage droplet 1
M+	Tratamento com hidrato de morina alimentado com ração
M-	Tratamento com hidrato de morina sob jejum
MAG	Monoacilglicerol
MGL	Monoacilglireol lipase
Nobo	Glutationa S-transferase Noppera-bo
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PAS	Pós-alimentação sanguínea
PE	Pós-emergência
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SEM	Erro padrão da média
SOD	Superóxido dismutase
TAG	Triacilglicerol
TAGL1	triacilglicerol lipase-1
TMS	Trimetilsilil
TPP	Trealose-6-fosfato fosforilase
TPS	Trealose-6-fosfato sintetase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 HIPÓTESES .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 ORGANIZAÇÃO DA TESE.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO LITERÁRIA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CLASSIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 CARACTERÍSTICAS DOS FLAVONÓIS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 MORINA – UM FLAVONOL DA FAMÍLIA MORACEAE COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO .....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 CICLO DE VIDA E ECOLOGIA DE <i>AEDES AEGYPTI</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5 COMPORTAMENTO ALIMENTAR E RITMOS CIRCADIANOS .....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 SUSCETIBILIDADE VETORIAL E DIVERSIDADE GENÉTICA .....</b>	<b>32</b>
<b>2.7 MÉTODOS DE CONTROLE DO MOSQUITO <i>AEDES AEGYPTI</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 TRATAMENTO COM HIDRATO DE MORINA .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 ENSAIOS DE MORTALIDADE E PUPAÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 AVALIAÇÃO DA TAXA DE FERTILIDADE .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 SUSCETIBILIDADE VETORIAL .....</b>	<b>40</b>
<b>4.6 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA DO HIDRATO DE MORINA .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7 ANÁLISE DE DADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 EFEITOS DO HIDRATO DE MORINA NA SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO LARVAL .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 EFEITOS RESIDUAIS DO HIDRATO DE MORINA NA FECUNDIDADE E FERTILIDADE.....</b>	<b>50</b>
<b>5.3 POTENCIAL MODULADOR DO HIDRATO DE MORINA NA SUSCETIBILIDADE VETORIAL DE <i>AE. AEGYPTI</i> PARA O VÍRUS MAYARO .....</b>	<b>53</b>
<b>5.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO HIDRATO DE MORINA EM CAMUNDONGOS .....</b>	<b>56</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>59</b>
<b>7 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>62</b>
<b>7.1 PADRÕES NUTRICIONAIS E SUAS IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS EM <i>AEDES AEGYPTI</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>7.2 DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE NUTRIENTES EM <i>AEDES AEGYPTI</i>: DIFERENÇAS ENTRE LARVAS E ADULTOS .....</b>	<b>64</b>
<b>7.3 O CORPO GORDUROSO COMO CENTRO INTEGRADOR DO METABOLISMO EM INSETOS .....</b>	<b>67</b>
<b>7.4 METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM INSETOS .....</b>	<b>71</b>
<b>7.5 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM INSETOS .....</b>	<b>75</b>
<b>7.6 REGULAÇÃO HORMONAL E MOLECULAR DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM INSETOS .....</b>	<b>78</b>
<b>7.7 EFEITOS DE FLAVONOIDES SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO .....</b>	<b>79</b>

<b>8 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>82</b>
<b>8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>82</b>
<b>9 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
<b>9.1 TRATAMENTO COM HIDRATO DE MORINA .....</b>	<b>83</b>
<b>9.2 QUANTIFICAÇÃO DE TRIACILGLICEROL .....</b>	<b>83</b>
<b>9.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS .....</b>	<b>84</b>
<b>9.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS .....</b>	<b>85</b>
<b>9.5 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA .....</b>	<b>86</b>
<b>9.6 QUANTITATIVE PCR (QPCR).....</b>	<b>87</b>
<b>9.7 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....</b>	<b>89</b>
<b>9.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>90</b>
<b>10 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>10.1 O IMPACTO DO HIDRATO DE MORINA NO METABOLISMO LIPÍDICO .....</b>	<b>91</b>
<b>10.2 O IMPACTO DO HIDRATO DE MORINA NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS .....</b>	<b>98</b>
<b>10.3 O IMPACTO DO HIDRATO DE MORINA EM REGULADORES HORMONAIAS .....</b>	<b>101</b>
<b>10.4 O IMPACTO DO HIDRATO DE MORINA, UM ANTIOXIDANTE CAUSADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO .....</b>	<b>103</b>
<b>11 CONCLUSÃO .....</b>	<b>106</b>
 <b>CAPÍTULO III .....</b>	 <b>108</b>
 <b>12 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	 <b>111</b>
<b>12.1 O PAPEL DO INTESTINO NO METABOLISMO .....</b>	<b>112</b>
<b>12.2 METABOLISMO ENERGÉTICO DE INSETOS.....</b>	<b>114</b>
<b>12.3 AMINOÁCIDOS COMO REGULADORES METABÓLICOS .....</b>	<b>116</b>
<b>12.4 METABOLISMO DO NITROGÊNIO E DETOXIFICAÇÃO DE DERIVADOS DA HIDRÓLISE PROTEICA .....</b>	<b>118</b>
<b>12.5 ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO REDOX EM INSETOS .....</b>	<b>119</b>
<b>13 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>121</b>
<b>13.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>121</b>
<b>14 METODOLOGIA .....</b>	<b>122</b>
<b>14.1 TRATAMENTO COM HIDRATO DE MORINA COM A DISPONIBILIZAÇÃO DE RAÇÃO .....</b>	<b>122</b>
<b>14.2 MEDICAÇÃO DO TAMANHO LARVAL .....</b>	<b>123</b>
<b>14.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS .....</b>	<b>123</b>
<b>14.4 QUANTIFICAÇÃO DE TRIACILGLICEROL .....</b>	<b>123</b>
<b>14.5 ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO .....</b>	<b>124</b>
<b>14.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>125</b>
<b>15 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>126</b>
<b>15.1 ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO LARVAL DE <i>AEDES AEGYPTI</i> EM RESPOSTA AO HIDRATO DE MORINA: EVIDÊNCIAS DE LIMITAÇÃO NUTRICIONAL .....</b>	<b>126</b>
<b>15.2 INTERFERÊNCIA DO HIDRATO DE MORINA NA ABSORÇÃO E METABOLISMO ENERGÉTICO DE <i>AEDES AEGYPTI</i>.....</b>	<b>129</b>
<b>15.3 ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO .....</b>	<b>132</b>
<b>15.3.1 Perfil de aminoácidos em larvas de <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>133</b>
<b>15.3.1.1. Impacto da restrição alimentar no perfil de aminoácidos.....</b>	<b>134</b>
<b>15.3.1.2. Efeitos do hidrato de morina em larvas alimentadas.....</b>	<b>137</b>
<b>15.3.1.3 Sinergia entre jejum e hidrato de morina .....</b>	<b>139</b>
<b>15.3.1.4 Aminoácidos energéticos e antioxidantes .....</b>	<b>140</b>
<b>15.3.2 Perfil de ácidos orgânicos: bioenergética e rotas centrais .....</b>	<b>143</b>
<b>15.3.2.1 Alterações na glicólise e fermentação .....</b>	<b>145</b>

15.3.2.2 Ciclo do ácido cítrico .....	146
15.3.2.3 Associações com o metabolismo de aminoácidos.....	148
15.3.2.4 Metabolismo de carboidratos .....	149
15.3.2.5 Ácidos graxos.....	150
15.3.3 Compostos nitrogenados e carboidratos.....	151
15.3.3.1 Metabolismo do nitrogênio .....	151
15.3.3.2 Metabolismo de açúcares .....	153
15.3.4 Integração metabólica e implicações biológicas .....	155
15.3.4.1 Efeitos integrados do jejum.....	157
15.3.4.2 Efeitos integrados do hidrato de morina sobre o metabolismo energético.....	158
<b>16 CONCLUSÃO .....</b>	<b>160</b>
<b><u>17 DISCUSSÃO GERAL.....</u></b>	<b><u>161</u></b>
<b>17.1 INTEGRAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E METABÓLICOS .....</b>	<b>162</b>
<b>17.2 MECANISMOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS.....</b>	<b>164</b>
<b>17.3 IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS E EPIDEMIOLÓGICAS.....</b>	<b>165</b>
<b>17.4 PERSPECTIVAS, LIMITAÇÕES E RELEVÂNCIA CIENTÍFICA E SOCIAL.....</b>	<b>167</b>
<b><u>18 CONCLUSÕES GERAIS .....</u></b>	<b><u>170</u></b>
<b><u>19 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b><u>171</u></b>

## RESUMO

DOS SANTOS, Luan Valim. Efeitos do hidrato de morina sobre o desenvolvimento e metabolismo de *Aedes aegypti*. Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2025.

*Aedes aegypti* é o principal vetor de arboviroses de grande impacto em saúde pública, como dengue, zika, chikungunya e febre Mayaro, sendo capaz de adaptar-se a diferentes ambientes e desenvolver resistência a inseticidas sintéticos. Nesse cenário, compostos naturais como os flavonoides como alternativas no manejo integrado de vetores. O hidrato de morina, flavonol de origem vegetal, tem sido estudado por suas propriedades farmacológicas, mas pouco se conhece sobre sua ação em insetos vetores. O objetivo deste trabalho foi avaliar de forma integrada os efeitos do hidrato de morina sobre o metabolismo energético e parâmetros biológicos de *A. aegypti*, com enfoque na sobrevivência, no desenvolvimento, na fertilidade e na suscetibilidade vetorial. Para isso, foram conduzidos ensaios laboratoriais com larvas expostas ao composto em diferentes concentrações e condições nutricionais, sendo avaliados crescimento, sobrevivência, reservas energéticas, perfil bioquímico e metabolômico, além de ensaios de infecção com vírus Mayaro e análises complementares de toxicidade em mamíferos. Os resultados mostraram que o hidrato de morina provoca mortalidade larval dependente da dose, retarda o desenvolvimento e reduz a fertilidade de fêmeas emergidas, mesmo quando a exposição ocorre apenas em estágios juvenis. Observou-se depleção significativa de lipídios, carboidratos e proteínas, associada a alterações em vias metabólicas e indução de estresse oxidativo, configurando um estado fisiológico semelhante ao jejum. Essa perturbação energética repercutiu na fase adulta, comprometendo a reprodução e reduzindo a suscetibilidade vetorial para o vírus Mayaro. Além disso, os testes em camundongos demonstraram ausência de efeitos tóxicos relevantes, reforçando o potencial seletivo e ambientalmente seguro do composto. Em conjunto, os achados revelam que o hidrato de morina atua como um modulador metabólico multifuncional, capaz de comprometer simultaneamente sobrevivência, metabolismo, desenvolvimento e reprodução de *A. aegypti*, configurando uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas estratégias de controle sustentáveis e seletivos.

**Palavras chaves:** Flavonoide, controle biológico, desenvolvimento, metabolismo energético, suscetibilidade vetorial.

## ABSTRACT

DOS SANTOS, Luan Valim. Effects of morin hydrate on the development and metabolism of *Aedes aegypti*. Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2025.

*Aedes aegypti* is the primary vector of arboviruses with major public health impact, such as dengue, Zika, chikungunya, and Mayaro fever, being capable of adapting to diverse environments and developing resistance to synthetic insecticides. In this context, natural compounds such as flavonoids as alternatives for integrated vector management. Morin hydrate, a plant-derived flavonol, has been investigated for its pharmacological properties, but its effects on insect vectors remain poorly understood. The aim of this study was to comprehensively evaluate the effects of morin hydrate on the energy metabolism and biological parameters of *A. aegypti*, with emphasis on survival, development, fertility, and vector competence. Laboratory assays were conducted using larvae exposed to the compound at different concentrations and under variable nutritional conditions. Growth, survival, energy reserves, biochemical and metabolomic profiles were assessed, in addition to infection assays with Mayaro virus and complementary toxicity analyses in non-target organisms. The results showed that morin hydrate induces dose-dependent larval mortality, delays development, and reduces female fertility, even when exposure occurs only at juvenile stages. Significant depletion of lipids, carbohydrates, and proteins was observed, associated with alterations in metabolic pathways and the induction of oxidative stress, establishing a physiological state similar to starvation. This energy imbalance persisted into adulthood, impairing reproduction and decreasing vector competence for Mayaro virus. Moreover, toxicity tests in mice revealed no relevant adverse effects, supporting the selective and environmentally safe potential of the compound. Collectively, the findings demonstrate that morin hydrate acts as a multifunctional metabolic modulator, simultaneously impairing survival, metabolism, development, and reproduction of *A. aegypti*, representing a promising alternative for the development of sustainable and selective vector control strategies.

**Keywords:** Flavonoid, biological control, larval development, energy metabolism, vector susceptibility.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os flavonoides constituem uma das classes mais abundantes e diversificadas de metabólitos secundários de origem vegetal, com ampla distribuição no reino vegetal e reconhecida relevância biológica. Esses compostos têm sido amplamente estudados por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras de vias metabólicas em organismos distintos, incluindo modelos de mamíferos e sistemas celulares. Dentre os flavonóis, destaca-se o hidrato de morina, cujas ações já foram descritas em processos de estresse oxidativo e em mecanismos relacionados à homeostase energética. Apesar desse conhecimento, ainda são escassos os estudos que exploram os efeitos do composto sobre insetos de importância médica, o que limita a compreensão de seu potencial como agente bioativo em programas de saúde pública.

O mosquito *Aedes aegypti* representa atualmente um dos maiores desafios para o controle de arboviroses, sendo reconhecido como vetor primário de vírus como dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Sua elevada plasticidade ecológica, aliada à crescente resistência aos inseticidas sintéticos, compromete a eficácia das estratégias tradicionais de manejo, gerando impactos negativos tanto para o ambiente quanto para a saúde humana. Diante dessa problemática, cresce o interesse pela busca de alternativas inovadoras e ambientalmente seguras, com destaque para compostos naturais capazes de afetar processos fisiológicos essenciais ao ciclo de vida do vetor. Nesse contexto, os flavonoides vêm sendo apontados como candidatos promissores, pois podem interferir em processos digestivos, reservas energéticas, sinalização hormonal e defesa antioxidante dos insetos.

O estudo da interação entre o hidrato de morina e *Ae. aegypti* pode fornecer informações fundamentais sobre mecanismos bioquímicos de toxicidade, alterações metabólicas e potenciais repercussões na suscetibilidade vetorial. Avaliar como esse composto afeta o metabolismo energético, a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução do mosquito permite não apenas ampliar o conhecimento sobre sua biologia, mas também identificar novas possibilidades de intervenção seletiva. Além disso, compreender os efeitos persistentes da exposição ao flavonoide pode revelar vulnerabilidades que auxiliem no delineamento de estratégias sustentáveis de controle.

Assim, a questão central que norteia esta tese é investigar de que forma o hidrato de morina interfere no metabolismo energético e nos parâmetros biológicos de *Ae. aegypti*, abrangendo desde aspectos básicos de sobrevivência e fertilidade até respostas bioquímicas, moleculares e

implicações na suscetibilidade vetorial. Essa abordagem integrada busca estabelecer bases científicas sólidas para o uso de compostos naturais como ferramentas auxiliares no manejo do vetor, com potencial impacto positivo na saúde pública e na redução da dependência de inseticidas sintéticos.

### **1.1 HIPÓTESES**

- Os efeitos metabólicos induzidos pelo hidrato de morina repercutem em parâmetros biológicos como sobrevivência, desenvolvimento e fertilidade;
- A perturbação energética persistente compromete a suscetibilidade vetorial do mosquito, reduzindo sua capacidade de infecção e transmissão do vírus Mayaro;
- A exposição ao composto desencadeia alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares associadas ao estresse oxidativo e à modulação de vias metabólicas essenciais;
- O hidrato de morina apresenta seletividade biológica, afetando *Ae. aegypti* sem provocar toxicidade significativa em organismos não alvo;
- O hidrato de morina interfere na captação, incorporação e utilização de energia em *Aedes aegypti*, promovendo desequilíbrios no metabolismo energético.

### **1.2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do hidrato de morina sobre o metabolismo energético e parâmetros biológicos de *Aedes aegypti*, investigando implicações no desenvolvimento, na reprodução e na suscetibilidade vetorial.

### **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar os efeitos do hidrato de morina sobre a sobrevivência e o desenvolvimento larval de *Ae. aegypti* em diferentes concentrações;
- Avaliar o impacto do tratamento larval na fertilidade e na viabilidade dos ovos das fêmeas adultas;
- Investigar alterações nas reservas energéticas e no perfil metabólico de larvas expostas ao composto;

- Analisar a influência do hidrato de morina na suscetibilidade vetorial de *Ae. aegypti* para o vírus Mayaro;
- Verificar a seletividade e segurança do composto por meio de ensaios toxicológicos em mamíferos.

## 1.4 ORGANIZAÇÃO DA TESE

A presente tese foi estruturada em três capítulos independentes, mas complementares:

- Capítulo I: O hidrato de morina reduz a sobrevivência, retarda o desenvolvimento, reduz a fertilidade e a suscetibilidade vetorial sem impactar mamíferos;
- Capítulo II: O hidrato de morina reduz reservas lipídica e glicídicas, além de desencadear estresse oxidativo;
- Capítulo III: Alterações metabólicas decorrentes da ação do hidrato de morina na incorporação de energia.

Por meio desta abordagem integrada, espera-se oferecer novas perspectivas sobre o papel de flavonoides no controle vetorial e ampliar a compreensão das interações entre metabólitos secundários de plantas e insetos de relevância epidemiológica.

## **CAPÍTULO I**

**O hidrato de morina reduz a sobrevivência, retarda o desenvolvimento, reduz a fertilidade e a suscetibilidade vetorial sem impactar mamíferos**

## RESUMO

Os flavonoides constituem uma ampla classe de metabólitos secundários encontrados em plantas, caracterizados por sua diversidade estrutural e funcional. Essa variabilidade química confere aos flavonoides uma gama de atividades biológicas que tem despertado crescente interesse científico no desenvolvimento de aplicações farmacológicas, nutracêuticas e de controle biológico. O mosquito *Aedes aegypti* permanece como um dos principais desafios à saúde pública mundial, atuando como vetor de arboviroses de grande impacto, como dengue, zika, chikungunya e febre Mayaro. Sua ampla distribuição geográfica, capacidade adaptativa e resistência crescente aos inseticidas sintéticos convencionais evidenciam a urgência de estratégias inovadoras, seletivas e ambientalmente seguras para o seu controle. Nesse contexto, compostos naturais como os flavonoides despontam como alternativas promissoras. O hidrato de morina, um flavonol amplamente estudado por suas propriedades antioxidantes e farmacológicas, tem se mostrado um candidato relevante no manejo integrado de vetores. Assim, investigar os efeitos do hidrato de morina sobre *Ae. aegypti* representa não apenas uma oportunidade de ampliar o conhecimento sobre a ação dos flavonoides, mas também de explorar estratégias mais sustentáveis no enfrentamento das arboviroses. Larvas de *Ae. aegypti* foram expostas a diferentes concentrações de hidrato de morina, e parâmetros biológicos e fisiológicos foram monitorados. Avaliaram-se a mortalidade larval, a taxa de pupação, a fecundidade das fêmeas, a suscetibilidade vetorial frente ao vírus Mayaro (prevalência e carga viral), além de ensaios toxicológicos em camundongos como modelo de organismo não alvo. Os resultados demonstraram que o hidrato de morina promoveu aumento significativo da mortalidade larval e redução na taxa de pupação, retardando o desenvolvimento do mosquito. Fêmeas emergidas apresentaram redução expressiva na fertilidade e no número de ovos viáveis, além de exibirem diminuição da suscetibilidade vetorial, com menor prevalência e carga viral após a infecção pelo vírus Mayaro. Notavelmente, o composto não apresentou toxicidade em camundongos, mesmo em doses mil vezes superiores às utilizadas em mosquitos, confirmando sua seletividade e segurança. Em síntese, o hidrato de morina mostrou-se altamente eficaz em afetar múltiplos aspectos da biologia de *Ae. aegypti*, combinando efeitos larvicidas, antifecundidade e antivectoriais, sem impacto em mamíferos. Esses achados reforçam seu potencial como candidato para novas estratégias de manejo integrado de vetores. Futuras investigações voltadas ao metabolismo energético poderão esclarecer os mecanismos moleculares responsáveis por sua ação, ampliando a aplicabilidade deste flavonoide no controle de insetos vetores de arboviroses.

## ABSTRACT

Flavonoids constitute a broad class of secondary metabolites found in plants, characterized by their structural and functional diversity. This chemical variability endows flavonoids with a range of biological activities, which has sparked growing scientific interest in the development of pharmacological, nutraceutical, and biological control applications. The mosquito *Aedes aegypti* remains one of the major challenges to global public health, acting as a vector for high-impact arboviruses such as dengue, Zika, chikungunya, and Mayaro fever. Its wide geographic distribution, adaptive capacity, and increasing resistance to conventional synthetic insecticides highlight the urgency for innovative, selective, and environmentally safe control strategies. In this context, natural compounds such as flavonoids emerge as promising alternatives. Morin hydrate, a flavonol extensively studied for its antioxidant and pharmacological properties, has proven to be a relevant candidate in integrated vector management. Therefore, investigating the effects of morin hydrate on *Ae. aegypti* represents not only an opportunity to expand knowledge on flavonoid action but also to explore more sustainable strategies to combat arboviruses. *Ae. aegypti* larvae were exposed to different concentrations of morin hydrate, and biological and physiological parameters were monitored. Larval mortality, pupation rate, female fecundity, and vector susceptibility against Mayaro virus (prevalence and viral load) were assessed, in addition to toxicological assays in mice as a non-target organism model. The results demonstrated that morin hydrate significantly increased larval mortality and reduced pupation rate, thereby delaying mosquito development. Emerged females exhibited a marked reduction in fertility and the number of viable eggs, as well as decreased vector competence, with lower prevalence and viral load following Mayaro virus infection. Notably, the compound did not display toxicity in mice, even at doses a thousand times higher than those used in mosquitoes, confirming its selectivity and safety. In summary, morin hydrate proved highly effective in affecting multiple aspects of *Ae. aegypti* biology, combining larvicidal, anti-fecundity, and antiviral effects without impacting non-target organisms. These findings reinforce its potential as a candidate for new integrated vector management strategies. Future investigations focusing on energy metabolism may elucidate the molecular mechanisms underlying its action, expanding the applicability of this flavonoid in arbovirus control.

## **2 REVISÃO LITERÁRIA**

Desde o surgimento da civilização humana, as plantas medicinais têm sido utilizadas para prevenir e tratar diversas doenças na sociedade. De acordo com avaliações da Organização Mundial da Saúde, cerca de 75% da população mundial utiliza ervas e outros medicamentos tradicionais para tratar diferentes enfermidades (Kuruvilla, 2002). As fitomedicinas e derivados têm sido utilizados por um longo período e desempenham um papel fundamental na saúde humana em muitas sociedades ao redor do mundo (Gong et al., 2020; Rauf et al., 2019). Foi estimado no início do século que quase 5000 medicamentos fitoterápicos são comercializados no mundo para fins terapêuticos (Patwardhan et al., 2005), porém, é provável que esses números tenham escalonado exponencialmente. Assim, tem a crescido a relevância pela busca por medicamentos fitoterápicos na saúde humana que apresentem sua baixa toxicidade, fácil acesso e menor ocorrência de efeitos colaterais (Rajput et al., 2019).

A literatura tem apontado que diversas doenças crônicas, cardiovasculares, cânceres e distúrbios neurodegenerativos estão associados a desequilíbrios em espécies reativas de oxigênio (ROS) e os mecanismos antioxidantes endógenos do organismo (Islam et al., 2016; Rajput; Wang; Yan, 2021; Sinha; Ghosh; Sil, 2016; Zhang et al., 2015). O acúmulo de ROS danifica macromoléculas biológicas, como DNA, lipídios e proteínas, e promove processos inflamatórios crônicos que aceleram o envelhecimento celular (Del Rio et al., 2013; Fraga et al., 2019). Tendo isso em vista, o desenvolvimento de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias emerge como uma estratégia fundamental para a prevenção e o tratamento dessas doenças, substituindo ou complementando fármacos convencionais que muitas vezes apresentam efeitos adversos significativos (Quagliariello et al., 2018; Ullah et al., 2020).

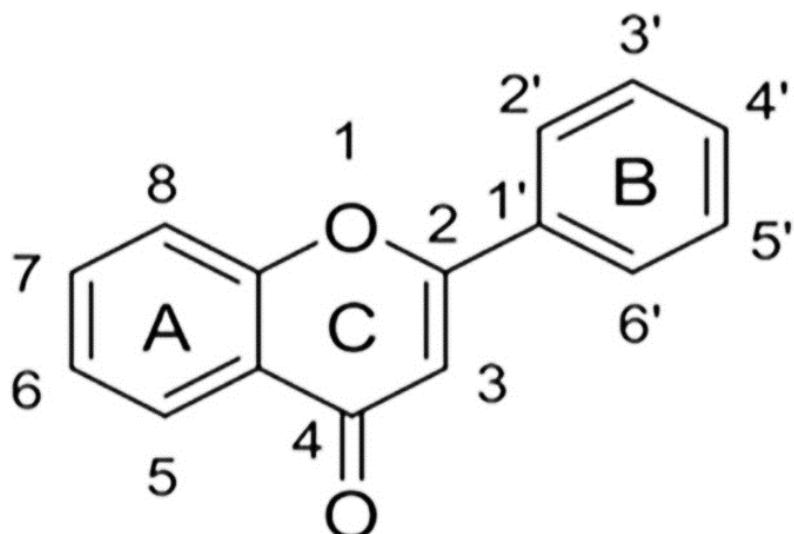
Os fitoquímicos, uma ampla classe de moléculas derivadas de plantas, destacam-se nesse cenário por apresentarem capacidade de modular processos celulares relacionados ao estresse oxidativo, à inflamação e ao metabolismo energético (Kumar et al., 2013; Panche; Diwan; Chandra, 2016). Esses compostos incluem alcaloides, terpenoides, lignanas e, sobretudo, os flavonoides, que se sobressaem devido à sua diversidade estrutural e funcional (Grosso et al., 2017; Nijveldt et al., 2001). Os flavonoides constituem a classe mais abundante e estudada de compostos fenólicos, sendo encontrados mais de 9000 compostos em quase todas as partes das plantas, como folhas, flores, frutos, sementes, caules e cascas, o que explica sua ampla presença na dieta humana (Baker, 2022; Panche; Diwan; Chandra, 2016; Ullah et al.,

2020). Sua ingestão diária, estimada entre 20 mg e 500 mg, ocorre predominantemente por meio de frutas, vegetais, chá, vinho tinto e chocolate, alimentos diretamente associados a efeitos protetores contra doenças crônicas em estudos epidemiológicos de larga escala (Del Rio et al., 2013; Grosso et al., 2017).

A diversidade estrutural dos flavonoides resulta em uma variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes por sequestro direto de radicais livres, modulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido dismutase e catalase, e inibição de vias de sinalização inflamatórias, como NF-κB e MAPK (Islam et al., 2016; Nijveldt et al., 2001). Além disso, estudos demonstram que os flavonoides exercem efeitos antivirais, antibacterianos e antifúngicos, contribuindo para a defesa do organismo contra patógenos, enquanto também apresentam atividades cardioprotetoras, antidiabéticas, neuroprotetoras e anticancerígenas, reforçando seu papel multifuncional na saúde humana (Panche; Diwan; Chandra, 2016; Ullah et al., 2020). A partir dessa perspectiva, os flavonoides são considerados candidatos promissores, não apenas para uso preventivo por meio da dieta, mas também como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas com aplicação clínica.

## **2.1 Características estruturais e classificação dos flavonoides**

Os flavonoides representam uma ampla classe de metabólitos secundários derivados do metabolismo fenilpropanoides de plantas e compartilham como característica fundamental uma estrutura química baseada no esqueleto C6-C3-C6 (Figura 1), que consiste em dois anéis aromáticos (A e B) conectados por uma cadeia de três carbonos que geralmente forma um heterociclo oxigenado (anel C) (Kumar et al., 2013; Panche; Diwan; Chandra, 2016). Essa configuração estrutural confere aos flavonoides uma notável diversidade, pois pequenas variações nas posições de hidroxila, metoxila, glicosídeos e outras substituições no núcleo básico resultam em grande variedade de subclasses, o que explica a complexidade de suas funções biológicas e sua ampla distribuição no reino vegetal (Nijveldt et al., 2001; Ullah et al., 2020). As principais subclasses de flavonoides incluem flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas e flavanóis, cada uma caracterizada por modificações específicas no anel C e nos padrões de hidroxilação e glicosilação (Del Rio et al., 2013; Panche; Diwan; Chandra, 2016).



**Figura 1 Estrutura química geral dos flavonoides.** Composta por dois anéis benzénicos (A e B) ligados por um heterociclo pirânico (anel C). A numeração padrão dos átomos de carbono está indicada, permitindo a identificação das posições substituíveis que definem as diferentes subclasses de flavonoides. Extraído de (Hao et al., 2024).

As flavonas, como a apigenina e a luteolina, apresentam uma dupla ligação entre C2 e C3 e um grupo carbonila na posição C4, sendo amplamente distribuídas em vegetais e ervas aromáticas, como o salsa e pimentas (Kumar et al., 2013; Mutha; Tatiya; Surana, 2021; Nijveldt et al., 2001). Similar a elas há os flavonóis, como a quercetina, kaempferol e miricetina, se diferenciam por apresentarem um grupo hidroxila adicional no C3, o que potencializa sua solubilidade e capacidade antioxidante, frequentemente estão presentes em cebolas, brócolis, chás e frutos vermelhos (Grosso et al., 2017; Kumar et al., 2013; Mutha; Tatiya; Surana, 2021; Ullah et al., 2020).

As flavanonas, representadas por hesperidina e naringina, não possuem a dupla ligação entre C2 e C3, apresentando um anel C saturado, o que confere maior estabilidade química e menor reatividade em comparação com flavonas e flavonóis, são encontradas abundantemente em frutas cítricas (como laranja e toranja), geralmente na forma glicosilada (Del Rio et al., 2013; Mutha; Tatiya; Surana, 2021). As isoflavonas, como a genisteína e a daidzeína, distinguem-se por apresentarem o anel B ligado ao carbono C3 do anel central, em vez do C2,

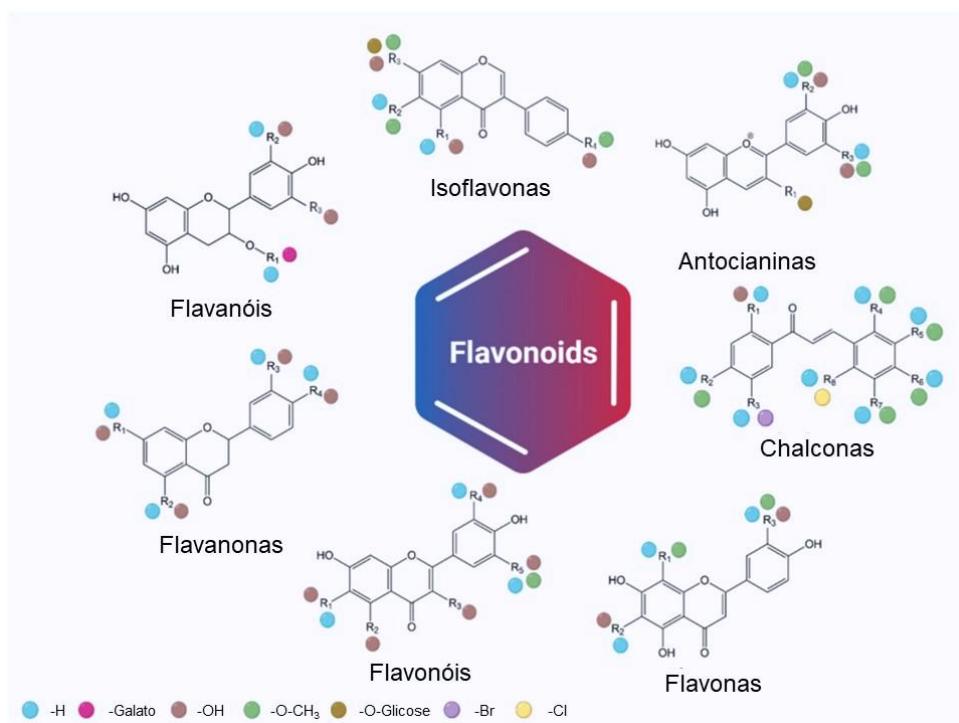
característica estrutural que confere similaridade com os estrogênios humanos e justifica seu papel como fitoestrógenos (Kumar et al., 2013; Panche; Diwan; Chandra, 2016).

As antocianidinas, pigmentos responsáveis por colorações vermelhas, roxas e azuis em frutos e flores, possuem um cátion flavílio como núcleo básico, apresentando estabilidade estrutural fortemente dependente do pH e da presença de açúcares quando conjugadas em formas glicosiladas, denominadas antocianinas (Fraga et al., 2019; Zhang et al., 2015). Por fim, os flavanóis, também conhecidos como catequinas, como a epicatequina e a galato de epigalocatequina, não possuem grupo oxo no C4 nem dupla ligação entre C2 e C3, se apresentando como compostos altamente hidroxilados e reconhecidos por suas fortes propriedades antioxidantes, especialmente no chá verde e no cacau (Del Rio et al., 2013; Hao et al., 2024).

Além destas, também há as chalconas, intermediárias na biossíntese dos flavonoides, apresentam uma estrutura não cíclica, com os anéis aromáticos A e B conectados diretamente por uma cadeia de carbono  $\alpha,\beta$ -insaturada, atuam como precursores biossintéticos e exibem atividade biológica significativa (Dreçcanu et al., 2022; Mutha; Tatiya; Surana, 2021). Ainda se incluem os menos comuns, porém relevantes, neoflavonoides, compostos nos quais o anel B está ligado ao C4 do anel central, que possuem propriedades terapêuticas distintas, como atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (Dreçcanu et al., 2022).

Além das subclasses, modificações químicas como metilação, acilação e glicosilação aumentam ainda mais a diversidade estrutural dos flavonoides (figura 2), influenciando sua solubilidade, estabilidade, transporte intracelular e biodisponibilidade (Kawabata; Yoshioka; Terao, 2019; Manach et al., 2004). A glicosilação, em particular, é uma modificação comum em plantas, na qual açúcares como glicose, ramnose ou galactose são adicionados principalmente às hidroxilas nas posições C3 ou C7, alterando significativamente a polaridade e a absorção intestinal (Del Rio et al., 2013). Essas variações estruturais não apenas explicam a diversidade química, mas também determinam a intensidade e a especificidade dos efeitos biológicos dos flavonoides, relacionando diretamente a química da molécula à sua bioatividade. Cada subclasse de flavonoides possui diferentes e exclusivos conjuntos de substituintes ligados a distintos átomos de carbono, sendo os principais -H, -OH, -O/C-Glicosídeo, -Manosídeo, -Galactosídeo, -Metil, -Galato e grupos -Acil (Figura 2). A maioria deles pode ser encontrada

na estrutura primária dos flavonoides *in planta*, por exemplo, em frutos, a forma mais estável de flavonoides é a flavonoides-O-glicosídeo (Drețcanu et al., 2022).



**Figura 2.** Representação estrutural das principais subclasses de flavonoides: flavanóis, flavanonas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianinas e chalconas. As variações estruturais estão associadas à presença de diferentes radicais substituintes (-H, -OH, -O-CH<sub>3</sub>, -O-Glicose, -Galato, -Br e -Cl), que conferem diversidade química e funcional a esses compostos. Adaptado de Drețcanu e colaboradores (2022).

## 2.2 Características dos flavonóis

Os flavonóis representam uma das subclasses mais relevantes dos flavonoides, como dito anteriormente, diferenciando-se estruturalmente pela presença de um grupo hidroxila na posição C3 e de uma carbonila na posição C4 do anel central, característica que lhes confere elevada capacidade antioxidante e importante papel em processos fisiológicos e moleculares (Mutha; Tatiya; Surana, 2021; Panche; Diwan; Chandra, 2016; Ullah et al., 2020). Mutações que alteram os níveis de flavonóis em plantas, em *Arabidopsis thaliana*, evidenciam seu papel crucial no desenvolvimento vegetal, influenciando arquitetura radicular, sinalização estomática

e desenvolvimento de pólen, principalmente por sua ação como sequestradores de ROS (Daryanavard et al., 2023).

Do ponto de vista nutricional, os flavonóis destacam-se como compostos onipresentes na dieta humana, presentes em frutas, hortaliças, chás e cereais. Estudos epidemiológicos sugerem associações inversas entre a ingestão de flavonóis (como quercetina, kaempferol e miricetina) e o risco de doenças crônicas como câncer e cardiovasculares, embora se ressalte a necessidade de cautela devido à limitada compreensão da biodisponibilidade e metabolismo desses compostos (Graf; Milbury; Blumberg, 2005). Outros estudos observacionais identificaram que cada acréscimo de 10 mg/dia na ingestão de flavonóis está associado a 20% menor risco de fragilidade de Fried (síndrome que comumente afeta idosos gerando perda de peso, exaustão, sedentarismo, fraqueza muscular e lentidão na marcha) em adultos ao longo de 12 anos, com destaque para a quercetina, cuja ingestão adicional de 10 mg/dia reduziu em 35% as chances de fragilidade (Oei et al., 2023).

Além disso, evidências apontam que os flavonóis exercem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antibacterianos, com potencial para inibir moléculas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e ICAM-1, bem como interferir em funções celulares relevantes para a modulação da resposta imunológica (Chagas et al., 2022). A ampla gama de modificações estruturais, como glicosilações e metilações, aumenta a diversidade funcional dos flavonóis, influenciando sua solubilidade e atividade biológica (Daryanavard et al., 2023).

## **2.3 Morina – um flavonol da família Moraceae com potencial biotecnológico**

A morina (2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona) é um flavonol isolado de plantas da família Moraceae, como *Maclura pomifera* (osage orange), *Maclura tinctoria* e folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) (Zhang; Yan, 2023a). Ela é destacada pelo intenso caráter polifenólico, com cinco hidroxilos que potencializam suas atividades antioxidante e anti-inflamatória (Rajput; Wang; Yan, 2021; Zhang; Yan, 2023a). Do ponto de vista físico-químico, apresenta solubilidade distinta em diferentes solventes: é altamente solúvel em metanol (cerca de 50 mg/mL) e em soluções alcoólicas, pouco solúvel em éter e ácido acético, e sua solubilidade em água é limitada, variando de 0,25 mg/mL a 20 °C para 0,94 mg/mL a 100 °C. Em soluções alcalinas aquosas, exibe coloração amarela intensa, que se torna castanha quando exposta ao ar,

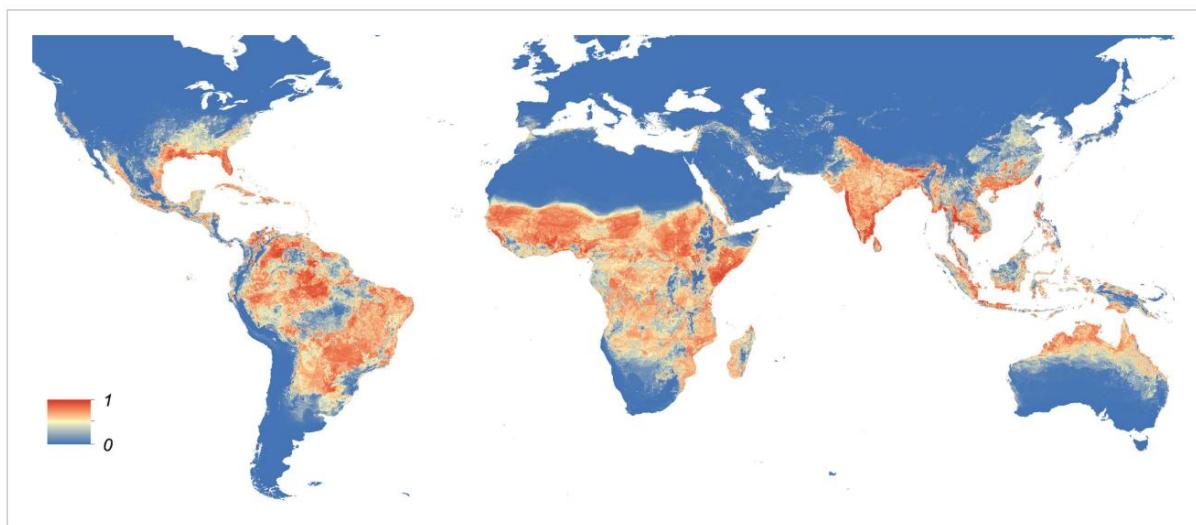
característica atribuída à oxidação dos grupos fenólicos (Sinha; Ghosh; Sil, 2016). Essas propriedades tornam o hidrato de morina um composto de interesse não apenas para estudos bioquímicos e farmacológicos, mas também para investigações envolvendo organismos de importância médica e ecológica, como os insetos vetores.

Na pesquisa experimental, a morina demonstrou sua capacidade de inibir a ácido graxo sintase (FAS) com IC<sub>50</sub> aproximado de 2,33 µM, sugerindo potencial terapêutico contra desordens metabólicas e tumorais (Li; Tian, 2004). Em um estudo com colite induzida por TNBS em ratos, a morina elevou os níveis de glutationa (GSH), reduziu atividade da mieloperoxidase, síntese de LTB<sub>4</sub> e níveis de MDA evidenciando seu papel anti-inflamatório no intestino (Li et al., 2023). No campo oncológico, a morina inibiu a secreção da metaloproteinase MMP-9 e suprimindo o marcador de transição epitélio-mesênquima N-caderina em células de câncer de mama MDA-MB-231, via inibição da via Akt, reduzindo potencial de invasão celular (Jin et al., 2014). Em modelos celulares de leucemia, também induziu apoptose via modulação de membros da família Bcl-2 e receptor Fas, aumentando a morte celular programada (Park et al., 2015). Adicionalmente, foi observada a indução de apoptose em células de câncer colorretal HCT-116, com aumento de subpopulação sub-G1, fragmentação de DNA e ativação de caspases (Hyun et al., 2015).

No contexto neurodegenerativo, a morina mostrou efeitos promissores: em modelo de Alzheimer com camundongos APPswe/PS1dE9, administrada via intraperitoneal (20 mg/kg/dia por 12 semanas), melhorou desempenho em testes de memória espacial, reduzindo deposição de β-amiloide ao regular a expressão de ADAM10, BACE1 e PS1, além de aumentar enzimas degradadoras de Aβ (Zhang; Yan, 2023b). Este mesmo trabalho mostrou que a morina também inibiu a atividade de GSK-3β e reduziu fosforilação de tau em hipocampo, além de modular positivamente antioxidantes (CAT, SOD, GSH, GPx) e reduzir marcadores inflamatórios (MDA, TNF-α, IL-1β, IL-6, NF-κB) no cérebro de modelos com β-amiloide. Por fim, a morina mostrou potencial em modelos de fibrose hepática: em células estreladas hepáticas, ativou PGC-1α via via AMPK, indicando possível ação antifibrótica (Yuan; Ahmad; Najar, 2017).

## **2.4 Ciclo de vida e ecologia de *Aedes aegypti***

*Ae. aegypti* é um díptero pertencente à família Culicidae que apresenta ampla distribuição geográfica em regiões tropicais caracterizadas por clima quente e úmido (Figura 3) (Kraemer et al., 2015; Leta et al., 2018), além disso, é o principal vetor urbano dos arbovírus dengue, zika, chikungunya e febre amarela, responsáveis por surtos recorrentes e graves impactos em saúde pública mundial (Souza-Neto; Powell; Bonizzoni, 2018). Embora apresente hábitos predominantemente diurnos, esse mosquito pode manter alta atividade noturna na presença de luz artificial (Taveira; Fontes; Natal, 2001). Sua atividade comportamental está diretamente relacionada à disponibilidade de recursos energéticos, uma vez que a oferta contínua de fontes de glicose favorece o acúmulo de lipídios no corpo gorduroso, contribuindo para maior motilidade dos adultos (Upshur et al., 2019; Van Handel, 1965). Além disso, as mudanças climáticas globais, especialmente o aumento da temperatura previsto até o final do século XXI devido ao acúmulo de gases de efeito estufa, tendem a intensificar ainda mais sua dispersão (Coffel; Horton; De Sherbinin, 2018; Iwamura; Guzman-Holst; Murray, 2020; Upshur et al., 2019). Esse conjunto de fatores torna *Ae. aegypti* um dos insetos mais adaptáveis e persistentes em ambientes urbanos e tropicais.



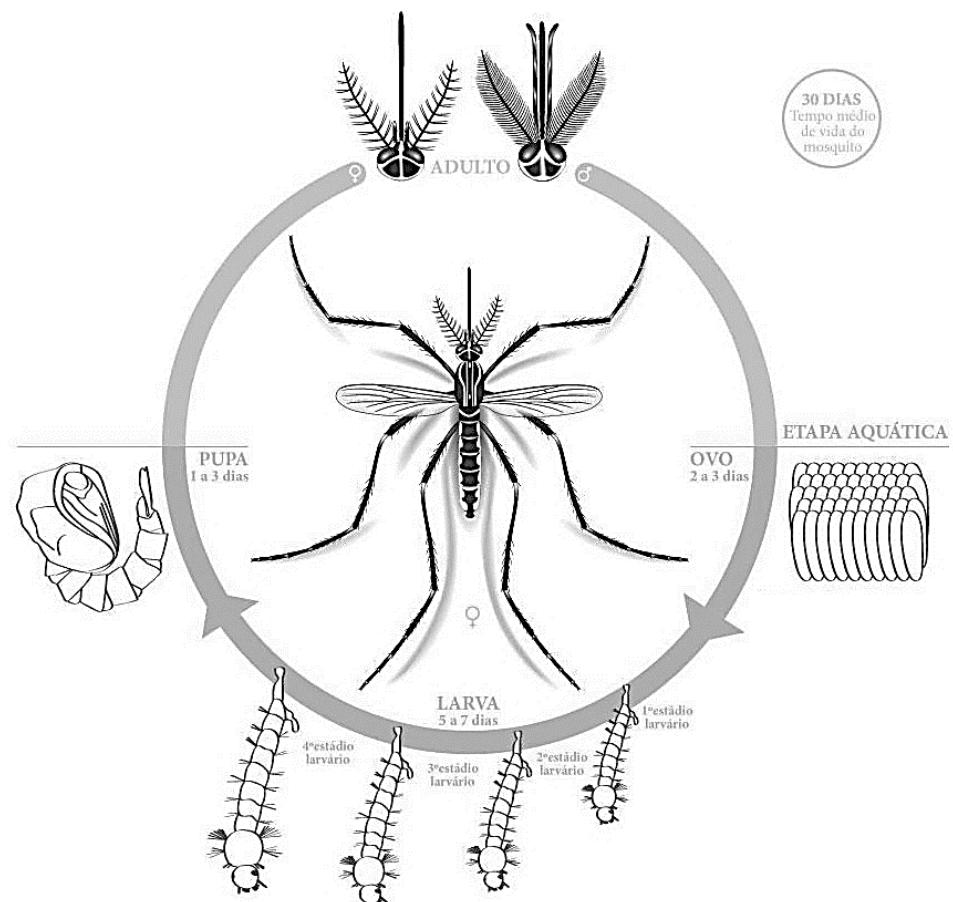
**Figura 3. Distribuição global prevista de *Ae. aegypti*.** O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 em azul a 1 em vermelho) em uma resolução espacial de 5 km × 5 km. Extraído de Kraemer e colaboradores (2015).

A dinâmica populacional de *Ae. aegypti* é profundamente influenciada por variáveis climáticas. A temperatura afeta tanto a taxa de desenvolvimento quanto a sobrevivência dos diferentes estágios do ciclo de vida, além de influenciar a replicação viral no vetor (Mordecai et al., 2017). A precipitação, por sua vez, cria criadouros temporários que favorecem a multiplicação do mosquito, embora em alguns cenários chuvas muito intensas possam até reduzir a população ao eliminar ovos e larvas por arraste (Caminade et al., 2017). Modelos matemáticos têm demonstrado que a variabilidade climática, mais do que valores médios de temperatura ou chuva, desempenha papel determinante na previsão de surtos (Siraj et al., 2017). Isso significa que pequenas mudanças sazonais podem ter grandes efeitos sobre a abundância do vetor e, consequentemente, ampliar a sua distribuição no globo terrestre.

O ciclo de vida desse vetor é caracterizado pela ocupação de nichos ecológicos distintos em função do estágio de desenvolvimento. Durante as fases larvais, *Ae. aegypti* habita ambientes aquáticos, alimentando-se de matéria orgânica suspensa na coluna d'água (Taveira; Fontes; Natal, 2001). Após a metamorfose, os adultos passam a explorar ambientes terrestres e aéreos, obtendo energia sobretudo por meio da ingestão de açúcares, como a sacarose proveniente de plantas, embora possam recorrer a outras fontes em áreas urbanas (Natal, 2002). As fêmeas, diferentemente dos machos, necessitam de repastos sanguíneos após a cópula, recurso essencial para a produção de ovos (Gulia-Nuss et al., 2011; Valzania et al., 2019). Essa dualidade ecológica ao longo do ciclo de vida reflete a plasticidade alimentar e a eficiência adaptativa da espécie.

O mosquito *Ae. aegypti* é um inseto holometabólico em que inclui uma reconstrução corporal completa com oviposição, quatro estágios larvais, pupa e culminando em na fase adulta (Figura 4), cujo tempo de desenvolvimento é resultado de fatores ambientais como temperatura, disponibilidade de alimento e condições hídricas (Turaga et al., 2025). A embriogênese em torno de 25 °C leva cerca de 77 h, com formação da cutícula serosa entre 14–16 h após oviposição, essencial para resistência à dessecção (Farnesi et al., 2015; Turaga et al., 2025). Estudos revelam que os ovos desenvolvem uma estratégia hipometabólica que inclui controle do metabolismo de carboidratos, com modulação de enzimas como hexocinase, piruvato quinase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), permitindo a resistência ao período seco (Da Silva et al., 2019). Após a eclosão, entre cada estágio larval há uma muda que caracteriza um rápido crescimento corporal. Entre cada muda há um tempo médio de 24h, porém, a duração de todo o estágio larval até a pupação depende fortemente da temperatura ambiente. Através do

uso de um modelo estatístico foi estimado que a temperatura ótima para esse processo é de aproximadamente 28 °C, com tempo médio do estágio larval até a pupação de cerca de 3,8 dias, com desvio padrão de 0,5 dias (Li et al., 2022).



**Figura 4 Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.** Representando a emergência de larvas após os ovos entrarem em contato com a água, passando por quatro instares larvais, seguido por uma fase de pupa que se metamorfoseará emergindo adultos. A diferenciação entre a cabeça de fêmeas e machos também é notada através de adaptações morfológicas nas antenas e probóscide. Fonte: casadaciencia.org.

Após a emergência, os adultos passam por um curto período de maturação antes de iniciar atividades de voo e alimentação, sendo que os machos vivem em média de 10 a 15 dias, enquanto as fêmeas podem sobreviver por várias semanas dependendo das condições

ambientais (Joy et al., 2010; Neira et al., 2014). Os machos alimentam-se exclusivamente de açúcares provenientes de néctar e outras fontes vegetais, enquanto as fêmeas necessitam de repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento ovariano e garantir a postura dos ovos (Chadée; Sutherland; Gilles, 2014; Tenywa et al., 2024). A escolha dos locais de oviposição é altamente adaptativa, com predileção por recipientes artificiais em áreas urbanas, o que contribui para sua eficiência como vetor em ambientes antrópicos (David et al., 2023; Kroth et al., 2019). Por fim, fatores como temperatura, umidade e microbiota intestinal modulam a longevidade e a competência vetorial do adulto, interferindo tanto na digestão do sangue quanto na suscetibilidade às infecções virais (Costanzo et al., 2015; Styer et al., 2007).

## 2.5 Comportamento alimentar e ritmos circadianos

O comportamento alimentar de *Ae. aegypti* é regulado por ritmos circadianos bem definidos. As fêmeas, que necessitam de sangue para vitelogênese, apresentam picos de atividade hematofágica ao amanhecer e no fim da tarde, períodos que coincidem com maior chance de contato humano (Chadée; Martinez, 2000; Yee; Foster, 1992). Paralelamente, a ingestão de açúcares provenientes de néctar garante energia para manutenção metabólica, sendo mais frequente nos machos, mas também presente nas fêmeas (Foster, 1995). Esse equilíbrio entre fontes energéticas influencia tanto a reprodução quanto a sobrevivência.

Do ponto de vista molecular, genes associados ao ciclo circadiano modulam diretamente tais comportamentos. O repasto sanguíneo, por exemplo, suprime temporariamente a expressão de genes reguladores no intestino médio, alterando a fisiologia do mosquito (Gentile et al., 2013). Experimentos com mutantes para o gene *cycle* mostraram não apenas alterações no padrão de atividade locomotora, mas também redução de eclosão, menor fertilidade e mudanças na resposta a estímulos olfativos (Shetty et al., 2022). Assim, além de coordenar os ritmos diários de busca por hospedeiro, o sistema circadiano influencia de maneira ampla a aptidão biológica da espécie.

Outro aspecto importante é a relação entre ritmos circadianos e detoxificação. Enzimas como citocromos P450 exibem flutuações de expressão ao longo do dia, o que pode modificar a sensibilidade do mosquito a inseticidas dependendo do horário de aplicação (Gentile et al., 2013). Esse detalhe aparentemente sutil tem implicações práticas: o momento do dia em que as

medidas de controle são implementadas pode impactar diretamente sua eficácia. Em termos práticos, o relógio biológico de *Ae. aegypti* representa não apenas um fenômeno fisiológico, mas um alvo estratégico para o controle vetorial.

## 2.6 Suscetibilidade vetorial e diversidade genética

Arbovírus são importantes causas de doenças em humanos no mundo todo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde epidemias ocorrem em ciclos endêmicos urbanos persistentes, gerando impactos econômicos e de saúde pública (Soni et al., 2023). O mosquito *Ae. aegypti* é geralmente associado a arbovírus causadores de febre amarela, dengue, zika e chikungunya, seu hábito antropofílico e suscetibilidade vetorial aumentam o potencial para a ocorrência dessas doenças (Weaver; Reisen, 2010). Estima-se que entre 1975 e 2022, os gastos decorrentes do tratamento de doenças transmitidas por *Ae. aegypti* e suas sequelas atingiram US\$ 310,8 bilhões em todo o mundo (Roiz et al., 2024).

A sua eficiência como vetor de arbovírus está diretamente ligada à sua biologia e genética. O vírus precisa atravessar barreiras de infecção e escape no intestino médio e alcançar as glândulas salivares para ser transmitido durante a picada. Estudos populacionais têm demonstrado grande variação geográfica na suscetibilidade vetorial, tanto para dengue quanto para Zika e chikungunya (Lima-Camara, 2016; Souza-Neto; Powell; Bonizzoni, 2019). Essa heterogeneidade reflete diferenças genéticas entre populações, além de fatores ambientais como temperatura e nutrição larval.

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus do gênero *Alphavirus*, tradicionalmente associado a mosquitos silvestres do gênero *Haemagogus*, como *Haemagogus janthinomys*. No entanto, estudos recentes demonstraram que *Ae. aegypti* também possui suscetibilidade vetorial para o MAYV (Kantor et al., 2019; Pereira et al., 2020; Wiggins; Eastmond; Alto, 2018). Pesquisas indicam que *Ae. aegypti* pode se infectar com o vírus por via oral e transmitir a infecção por meio da saliva, com taxas de transmissão variando entre 60% e 70% em condições laboratoriais (Long et al., 2011). Além disso, a presença do MAYV foi confirmada em populações urbanas de *Ae. aegypti* em Goiânia, Goiás, sugerindo que o vírus pode estar se adaptando ao ambiente urbano e aumentando o risco de surtos em áreas endêmicas (De Curcio et al., 2022). Esses achados ressaltam a importância de monitorar a suscetibilidade vetorial de

*Ae. aegypti* para o MAYV, especialmente em contextos urbanos, para avaliar o potencial de transmissão e orientar estratégias de controle eficazes.

Historicamente, a domesticidade da espécie resultou em forte associação com ambientes humanos. Linhagens africanas silvestres, menos antropofílicas, contrastam com a forma “doméstica” disseminada globalmente, altamente adaptada a recipientes artificiais e com marcada preferência por hospedeiros humanos (Powell; Tabachnick, 2013). Essa transição está ligada à seleção de traços comportamentais e genéticos que aumentaram a eficiência da transmissão viral em áreas urbanas densamente povoadas. O resultado é um vetor que combina plasticidade comportamental e alta capacidade de adaptação.

## 2.7 Métodos de controle do mosquito *Aedes aegypti*

Há consenso na literatura de que o controle do mosquito continua sendo a medida mais eficaz para a prevenção das arboviroses, uma vez que, apesar dos avanços recentes, ainda não existem vacinas amplamente disponíveis ou tratamentos antivirais específicos para a maioria dessas doenças, como dengue, zika e chikungunya (Soni et al., 2023; Souza-Neto; Powell; Bonizzoni, 2019). Nesse contexto, estratégias de manejo vetorial permanecem no centro das políticas de saúde pública, uma vez que a ampla distribuição geográfica do *Ae. aegypti* e sua alta suscetibilidade vetorial representam um desafio constante para áreas endêmicas (Kraemer et al., 2015).

Entre as ferramentas disponíveis, o controle químico por meio da aplicação de inseticidas, em especial aqueles à base de organofosforados e piretroides, é amplamente empregado em programas governamentais. Contudo, esse método apresenta limitações importantes: além de sua elevada toxicidade, que pode afetar organismos não alvo, como peixes, anfíbios e polinizadores, há evidências crescentes de seleção de populações resistentes, comprometendo a eficácia desses produtos (Arias-Castro; Martinez-Romero; Vasilieva, 2020; Moyes et al., 2017). Esse cenário ressalta a necessidade de novas abordagens sustentáveis e integradas, capazes de reduzir o impacto ambiental e os riscos à saúde humana.

Nesse sentido, compostos derivados de plantas têm recebido grande destaque como alternativas promissoras no controle vetorial. Estudos demonstram que extratos vegetais, ricos

em metabólitos secundários como flavonoides, terpenoides e alcaloides, apresentam atividade larvicida, adulticida e repelente, podendo ser empregados tanto isoladamente quanto em combinação com inseticidas sintéticos, em uma estratégia de manejo integrado (George et al., 2014; Pavela et al., 2019). Além disso, o uso de produtos naturais é recomendado por oferecer menor risco para a fauna vertebrada e para os seres humanos, configurando-se como uma ferramenta complementar de baixo impacto ambiental (dos Santos et al., 2023). Essa perspectiva abre espaço para o desenvolvimento de novos bioinseticidas e reforça a importância da biodiversidade como fonte de compostos com potencial para o controle de *Ae. aegypti*.

## **6.8. A potencialidade da utilização do hidrato de morina como inseticida**

Nenhum estudo demonstrou os efeitos do hidrato de morina em modelos de insetos *in vivo* antes desse trabalho. No entanto, já existiam fortes evidências de seu potencial inseticida baseadas em ensaios enzimáticos *in vitro*. Um dos principais achados iniciais foi o efeito inibitório sobre a ecdisona 20-monooxygenase, enzima chave no processo de muda, cuja atividade foi reduzida de forma dose-dependente em homogeneizados de *Ae. aegypti*, *Drosophila melanogaster* e *Manduca sexta* (Mitchell et al., 1993). Além disso, outro estudo estima mecanismos moleculares de ação de flavonoides como agentes larvicidas. Flavonoides como daidzeína e derivados foram identificados como inibidores da enzima glutathione S-transferase Noppera-bo (Nobo) que é essencial para a biossíntese da ecdisona (Inaba et al., 2022). Esses resultados são relevantes, uma vez que a interrupção da via da ecdisona compromete diretamente o desenvolvimento larval e a metamorfose, tornando o flavonoide um candidato promissor no controle de insetos vetores.

Outra via metabólica importante afetada por esse composto é a bioenergética mitocondrial. A atividade da transidrogenase mitocondrial foi avaliada em mitocôndrias isoladas do intestino médio de larvas de *M. sexta*, e observou-se inibição dose-dependente na presença de morina (Vandock; Mitchell; Fioravanti, 2012). Esses dados sugerem que o composto atua comprometendo o equilíbrio redox e a produção de energia celular, mecanismos que podem resultar em diminuição da sobrevivência larval. Adicionalmente, já foi descrito que outros flavonoides, estruturalmente relacionados à morina, também apresentam atividade inibitória sobre enzimas metabólicas essenciais. Por exemplo, a síntese de ácidos graxos animal foi significativamente reduzida pela ação de flavonóis como a morina, quercetina e kaempferol,

indicando um potencial mecanismo de depleção de reservas lipídicas em insetos expostos (Li; Tian, 2004).

Pesquisas com extratos de plantas contendo flavonoides reforçam seu potencial inseticida. Foi demonstrado que extratos flavonoídos de *Poncirus trifoliata* (poncirina, rhoifolina, naringina e marmesina) possuem ação larvicida e ovicida contra *Ae. aegypti*, além de promoverem efeito repelente, com níveis elevados de proteção e sem causar irritação dérmica em humanos (Rajkumar; Jebanesan, 2008). Isso evidencia que compostos da mesma classe podem atuar em diferentes fases do ciclo biológico do mosquito.

Extrações flavonólicas de plantas vêm sendo investigadas por sua atividade antialimentar contra insetos agrícolas, como *Spodoptera litura*. Por exemplo, flavonoides polimetoxilados isolados de *Gnaphalium affine* (5-hidroxi-3,6,7,8,4'-pentametoxiflavona e 5,6-diidroxi-3,7-dimetoxiflavona) demonstraram forte atividade antialimentar contra larvas dessa espécie, destacando como substituições específicas na estrutura química (como grupos metoxi ou posição dos grupos hidroxila) podem influenciar esses efeitos biológicos (Morimoto et al., 2003). Além disso, um estudo abrangente sobre flavonoides concluiu que compostos dessa classe podem agir de formas seletivas e multifuncionais, atuando como inseticidas pouco tóxicos, impedindo a alimentação ou favorecendo o manejo integrado de pragas sem prejudicar predadores naturais ou polinizadores (Riddick, 2024). Esses achados apoiam a ideia de que mecanismos antialimentares associados a flavonoides são plausíveis e viáveis.

Sendo assim, o hidrato de morina apresenta potencial multifuncional como inseticida: bloqueando vias hormonais (ecdisona), comprometendo a produção de energia (transidrogenase), e possivelmente atuando sobre sistemas nutricionais, como demonstrado em compostos análogos. Esse perfil reforça sua relevância como alternativa natural ao controle de *Ae. aegypti*, com menor impacto ambiental e risco à fauna não alvo.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficácia do hidrato de morina como agente larvicida e inseticida em *Ae. aegypti*, investigando seus efeitos sobre desenvolvimento larval, sobrevivência, reprodução, suscetibilidade vetorial e segurança toxicológica em modelos de mamíferos.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Determinar a sobrevivência larval de *Ae. aegypti* tratada com diferentes concentrações de hidrato de morina por 24h e estimar o seu efeito letal;
- Avaliar as taxas de pupação e mortalidade das larvas tratadas para estimar a eficiência inseticida persistente;
- Analisar o impacto do tratamento larval sobre a reprodução das fêmeas adultas, incluindo número de ovos postos e taxa de eclosão;
- Investigar os efeitos do hidrato de morina na suscetibilidade vetorial do mosquito para o vírus Mayaro;
- Avaliar os efeitos tóxicos do hidrato de morina em camundongos, observando sinais de intoxicação após a exposição.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Criação dos mosquitos**

Todos os experimentos foram conduzidos utilizando larvas de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller. As larvas foram obtidas de uma colônia estabelecida e mantida no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes (LBBMA), vinculado ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Brasil.

A manutenção da colônia foi realizada em condições ambientais controladas, com fotoperíodo de 12 h de luz:12 h de escuro, temperatura constante de  $28 \pm 1$  °C e umidade relativa de  $80 \pm 10\%$ . As larvas foram criadas em água descolorada e alimentadas com ração comercial para gatos triturada (Whiskas®), fornecida em quantidade suficiente para garantir o crescimento adequado sem provocar acúmulo excessivo de resíduos no meio. Os adultos emergidos receberam solução açucarada a 10% *ad libitum*, garantindo a manutenção da colônia e favorecendo a longevidade necessária para os experimentos.

Para estimular a postura dos ovos, as fêmeas adultas receberam uma refeição sanguínea em camundongos anestesiados com uma combinação de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal, conforme protocolos comumente empregados em experimentação animal. Após o repasto, recipientes contendo papel de filtro umedecido foram disponibilizados como substrato para a postura, e os ovos coletados foram secos, armazenados sob condições ambientais controladas e posteriormente utilizados para a manutenção da colônia ou experimentação.

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes internacionais para o uso de animais em pesquisa e de acordo com os padrões éticos nacionais para experimentação animal. O estudo foi previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o número de protocolo 006/2022, garantindo que todos os procedimentos respeitassem as normas de bem-estar animal e biossegurança.

#### **4.2 Tratamento com hidrato de morina**

Aproximadamente 300 larvas de *Ae. aegypti* foram criadas em recipientes plásticos contendo 1,5 L de água desclorada, mantidas sob condições controladas até atingirem o estágio larval L3, considerado adequado para ensaios fisiológicos e bioquímicos devido à sua elevada taxa metabólica e sensibilidade a compostos exógenos. Durante esse período, as larvas foram alimentadas *ad libitum* com ração comercial para gatos (Whiskas®, triturada finamente), fornecida em quantidades balanceadas para evitar tanto a limitação nutricional quanto o acúmulo de resíduos orgânicos que pudessem comprometer a qualidade da água e, consequentemente, a sobrevivência larval.

Após atingirem o estágio desejado (L3), as larvas foram cuidadosamente transferidas para recipientes experimentais, contendo água desclorada e hidrato de morina comercial (Merck, pureza < 85%) em diferentes concentrações sob a mesma densidade larval (1 larva / ml). O hidrato de morina foi solubilizado inicialmente em 0,1% de etanol absoluto, garantindo a dissolução adequada do composto, e em seguida diluído em água até alcançar as concentrações finais utilizadas nos experimentos. Para garantir a reprodutibilidade e evitar interferências de solvente, foi estabelecido um grupo controle contendo apenas 0,1% de etanol absoluto (0 µM de morina).

A densidade larval foi rigorosamente controlada, mantendo-se a proporção de uma larva por mL de solução de tratamento em todos os recipientes, a fim de evitar a competição por recursos e assegurar que os efeitos observados fossem atribuídos exclusivamente à ação do hidrato de morina. Os experimentos foram conduzidos em cinco réplicas independentes por tratamento e cada uma com um número equivalente de larvas.

#### **4.3 Ensaio de mortalidade e pupação**

A sobrevivência de larvas submetidas ao tratamento com hidrato de morina com diferentes concentrações de hidrato de morina foi avaliada após 24 h em quatro réplicas independentes, cada uma consistindo de quatro recipientes com 10 larvas em 10 mL de meio de criação contendo concentrações que variaram de 10 a 2500 µM de hidrato de morina. As larvas foram mantidas em jejum e expostas ao hidrato de morina por 24 h. Após esse período, o número de larvas vivas foi contado para avaliar a mortalidade induzida. A determinação da

concentração subletal, (< 50% de letalidade), letal mediana (50% de letalidade) e da concentração superletal (> 75% de letalidade) das larvas foi realizada utilizando o método proposto pela World Health Organization (WHO, 2005), que consiste em ajustar os dados de mortalidade observada às diferentes concentrações do composto através de análise probit.

A análise consistiu em utilizar os dados observados para descrever a relação dose-resposta entre a concentração do hidrato de morina e a mortalidade larval, partiu do pressuposto de que a suscetibilidade dos indivíduos seguiu uma distribuição normal quando expressa em função do logaritmo da concentração. Quando houve mortalidade no grupo controle dentro dos limites aceitáveis, os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott, a fim de eliminar o efeito da mortalidade natural sobre os resultados experimentais. Em seguida, as proporções de mortalidade corrigidas são transformadas em unidades de probit e relacionadas aos valores  $\log_{10}$  das concentrações por meio de regressão linear, permitindo a estimativa de concentrações letais, como CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, com seus respectivos intervalos de confiança, bem como a avaliação da qualidade do ajuste do modelo por testes de aderência.

O estabelecimento da concentração letal (CL) calculada com base nessa análise foi utilizado como base para determinar as concentrações utilizadas na avaliação persistente do tratamento com hidrato de morina. Onde 200 larvas do estágio L3 foram tratadas com 50, 100, 175 e 500  $\mu\text{M}$  de hidrato de morina por 24 h. Após esse período, as larvas sobreviventes foram delicadamente lavadas para a remoção do excesso de hidrato de morina, transferidas para água limpa (sem hidrato de morina) e contendo ração de gato (1 mg / larva). A contagem de mortes e pupas foi realizada diariamente em intervalos regulares de 24 horas durante 6 dias.

#### **4.4 Avaliação da taxa de fertilidade**

Para o ensaio de contagem de ovos, as larvas tratadas com hidrato de morina por 24 h foram transferidas para meio de criação com água limpa e ração de gato. As pupas que emergiram nos dias 3 e 4 após o tratamento foram transferidas para gaiolas de criação dos adultos. Os adultos que emergiram dessas pupas foram alimentados *ad libitum* com solução de sacarose a 10 %. Fêmeas adultas com quatro dias de idade receberam uma refeição de sangue e, após 24 h, as fêmeas totalmente ingurgitadas foram transferidas para recipientes de oviposição forrados com algodão úmido e papel filtro. No terceiro dia após a alimentação com sangue, o número de ovos foi contado. Após a contagem, os ovos foram mantidos em uma estufa climatizada com  $28 \pm 1$

°C e umidade relativa de  $80 \pm 10\%$ . Após 1 semana, os ovos foram imersos em água desclorada e o número de larvas do estágio L1 foi contado após 24h.

#### 4.5 Suscetibilidade vetorial

O MAYV foi cultivado em células C6/36 de *Aedes albopictus*, mantidas em incubadora a 28 °C por 48 h em meio Leibovitz (L-15) suplementado conforme descrito por Kawiecki & Christofferson (2016). Após o período de cultivo, a titulação viral foi realizada utilizando ensaio de placa de lise para determinar a quantidade de unidades formadoras de placa (PFU/mL), garantindo a padronização das doses utilizadas nos experimentos. Esses ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Ana Cristina Bahia Nascimento do Laboratório de Bioquímica de Insetos e Parasitos no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para os ensaios de suscetibilidade vetorial, larvas tratadas por 24 h com 175 µM de hidrato de morina foram transferidas para água limpa, permitindo que completassem seu desenvolvimento até a emergência adulta. Após a emergência, os adultos foram mantidos em fotoperíodo de 12:12 h, temperatura constante de 28 ± 1 °C e umidade relativa de 80 ± 10% por 7 dias. Após esse período, 50 fêmeas por gaiola foram separadas para a infecção experimental. A alimentação foi realizada utilizando sangue de coelho inativado misturado com o vírus Mayaro, em titulação de  $2 \times 10^7$  PFU / mL, colocado sobre uma membrana artificial introduzida em um alimentador aquecido a 37 °C. O grupo controle foi estabelecido com a alimentação com sangue de coelho inativado sem a inserção do vírus. A exposição durou aproximadamente 30 minutos, garantindo que as fêmeas ingurgitassem sangue suficiente para a infecção.

Logo após a alimentação, os mosquitos foram anestesiados no gelo e separados em dois grupos: alimentados e não alimentados. Apenas os mosquitos alimentados foram mantidos no infectório por mais 7 dias, permitindo a incubação viral e a disseminação do vírus nos tecidos do inseto. Após esse período, a persistência da infecção foi avaliada utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

#### **4.5.1 Extração de RNA e síntese de cDNA**

Os mosquitos coletados após o período de 7 dias após a infecção com MayV foram homogeneizados em 1 mL de reagente TRIzol® (Invitrogen), utilizando pistilo estéril em tubos de 1,5 mL, sob condições de gelo para evitar degradação enzimática. Cada condição foi processada em quadruplicata biológica independente, assegurando robustez estatística.

A extração do RNA total foi conduzida conforme as instruções do fabricante do TRIzol®, seguindo também as recomendações do guia MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin et al., 2009). Após a fase de lise, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, com vigorosa agitação por 15 segundos, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 × g por 15 minutos a 4 °C, permitindo a separação das fases. A fase aquosa superior contendo o RNA foi cuidadosamente transferida para novos tubos, à qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. Após centrifugação adicional (12.000 × g, 10 min, 4 °C), o pellet de RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% e finalmente ressuspensido em 30 µL de água livre de nucleases (DEPC-treated water).

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific), utilizando as razões A260/A280 e A260/A230 como indicadores de qualidade, sendo consideradas aceitáveis as amostras que apresentaram valores próximos a  $2,0 \pm 0,1$ . Para a eliminação de contaminações genômicas, 1 µg de RNA total de cada amostra foi tratado com 1 U de DNase I (Sigma-Aldrich), incubado por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 50 mM de EDTA e subsequente incubação por 10 minutos a 70 °C, garantindo a inativação da enzima.

A síntese de cDNA foi realizada com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), utilizando primers random hexamers e oligo(dT) em reação de 20 µL de volume final, conforme instruções do fabricante. As reações foram conduzidas em termociclador com o seguinte perfil térmico: 25 °C por 10 minutos (anelação dos primers), 37 °C por 120 minutos (extensão da transcriptase reversa) e 85 °C por 5 minutos (inativação enzimática). O cDNA resultante foi armazenado a -20 °C até o uso em análises subsequentes de expressão gênica.

#### **4.5.2 Quantitative PCR (qPCR)**

A quantificação da expressão gênica relativa por qPCR foi realizada em um sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific), utilizando o corante intercalante Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), que permite a detecção em tempo real da amplificação dos fragmentos de DNA alvo. Os primers específicos para os genes de interesse foram selecionados com base em trabalhos previamente publicados, garantindo a especificidade e a eficiência das reações. Os primers específicos foram extraídos de Mourão et al. (2012) (Tabela 1) que amplificam a glicoproteína E1 (sequência de referência: NC\_003417), seguindo protocolos validados para detecção sensível do RNA viral em tecidos de mosquitos.

Tabela 1 Sequências dos primers utilizados para checar a infecção por vírus Mayaro.

Gene	Sequences
Mayaro Virus	Forward: 5'-CCTTTATGTGGGGAGGTGC-3'
	Reverse: 5' - CATGGTCACCGTTCACATACG-3'
S7	Forward: 5' - GGGACAAATCGGCCAGGCTATC-3'
	Reverse: 5' - TCGTGGACGCTCTGCTTGTG-3'

As reações foram preparadas em uma placa de reação MicroAmp™ Fast Optical de 96 poços com código de barras (Applied Biosystems), utilizando volume final de 20 µL por reação, contendo 10 µL de Power SYBR™ Green Master Mix, 0,4 µL de cada primer (10 µM), 2 µL de cDNA diluído (equivalente a ~50 ng de RNA reverso-transcrito) e 7,2 µL de água livre de nucleases. O programa de ciclagem térmica adotado foi: 95 °C por 10 minutos (ativação inicial da DNA polimerase), seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (anelação e extensão), finalizando com uma curva de dissociação (65–95 °C, incremento de 0,5 °C a cada 5 s) para avaliar a especificidade da amplificação.

Controles negativos foram incluídos em todas as placas: No Template Control (NTC), para verificar a ausência de contaminação de reagentes, e No Reverse Transcriptase Control (NRT), para confirmar a ausência de DNA genômico residual nas amostras de RNA. Como genes de referência para normalização, foram utilizados actina e α-tubulina, cuja estabilidade de expressão foi previamente validada em condições experimentais semelhantes.

A análise da expressão relativa foi conduzida pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak; Schmittgen, 2001), normalizando os valores de Ct dos genes alvo em relação à média geométrica dos genes de referência. Como grupo calibrador, foi utilizada a condição controle negativo (0 µM de hidrato de morina), permitindo a comparação direta do efeito das diferentes concentrações de hidrato de morina sobre a expressão dos genes relacionados ao metabolismo de lipídios e carboidratos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica para cada amostra biológica, assegurando a confiabilidade estatística dos dados.

#### **4.6 Avaliação toxicológica aguda do hidrato de morina**

Camundongos Swiss machos ( $n = 13$ ) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Todos os experimentos foram conduzidos em conformidade com as normas éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFRRJ, sob o protocolo nº 006/2022. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas, com temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 50–60% e fotoperíodo de 12:12 h em sala ventilada. Foi disponibilizado acesso *ad libitum* a ração padrão para roedores e água filtrada.

A avaliação toxicológica aguda foi realizada seguindo as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) para avaliação de toxicidade oral aguda em camundongos (OCDE, 2022). Após um jejum de 12 horas, os camundongos foram divididos em dois grupos: o grupo experimental ( $n = 8$ ) recebeu uma dose única de hidrato de morina a 300 mg/kg de peso corporal, dissolvido em solução salina 0,9%, por via oral via gavagem. O grupo controle ( $n = 5$ ) recebeu a mesma quantidade de solução salina 0,9%. Os animais foram monitorados ao longo de 24 horas após a administração quanto a sinais clínicos de toxicidade, como alterações comportamentais, alterações na atividade motora, tremores, convulsões, alterações na postura, lacrimejamento, secreção nasal, diarreia, entre outros sintomas.

#### **4.7 Análise de dados**

As representações gráficas e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software), amplamente empregado em estudos para análise e visualização de dados experimentais. Todos os resultados foram expressos como

média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), permitindo a adequada representação da variabilidade entre os grupos experimentais. Com exceção ao teste de postura de ovos, onde os dados foram representados por mediana.

Para a determinação das concentrações letais e avaliação da relação dose-resposta, foi empregada a análise de probit de acordo com o método clássico descrito por Finney, utilizando a calculadora estatística proposta por (Mekapogu, 2021). Esse modelo permite estimar valores em uma longa faixa de letalidade da CL<sub>1</sub> e CL<sub>99</sub>, juntamente com seus intervalos de confiança de 95%, fornecendo robustez na interpretação da mortalidade observada em função das doses testadas.

Nos ensaios de efeitos fisiológicos residuais (mortalidade e pupação), bem como na taxa de eclosão de ovos, as diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por meio de ANOVA unidirecional, seguida de testes pós-hoc de Tukey. Para os experimentos de postura de ovos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, adequado para dados que não apresentaram distribuição normal. Já nos ensaios relacionados a suscetibilidade vetorial, as comparações entre grupos foram realizadas por meio do teste t de Student. Em todos os casos, adotou-se como critério de significância estatística um valor de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

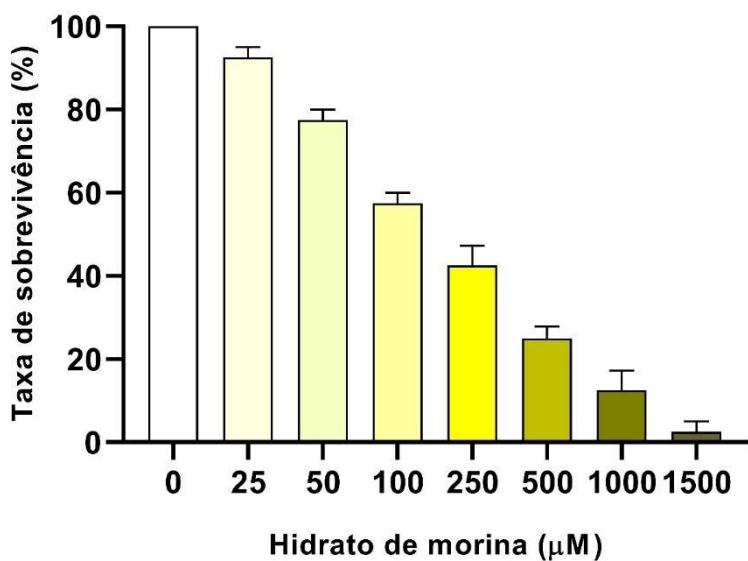
### 5.1 Efeitos do hidrato de morina na sobrevivência e desenvolvimento larval

Existem poucas informações disponíveis na literatura científica acerca dos efeitos biológicos do hidrato de morina sobre insetos, especialmente em mosquitos vetores de importância médica, como *Ae. aegypti*. Considerando essa lacuna, decidimos investigar os efeitos de diferentes concentrações de hidrato de morina em larvas do mosquito. A escolha da fase larval deve-se ao fato de representar um estágio crítico no ciclo de vida do inseto, no qual alterações no desenvolvimento e na sobrevivência podem impactar diretamente a dinâmica populacional e, consequentemente, a transmissão de patógenos.

Nos ensaios de exposição aguda de 24 horas, observamos uma redução gradual na sobrevivência larval em função da concentração de morina, indicando um efeito dose-dependente da substância (Figura 5). Foi possível constatar que concentrações inferiores a 25  $\mu\text{M}$  não provocaram efeitos significativos na mortalidade larval, sugerindo que, abaixo desse limiar, o metabolismo dos insetos pode compensar eventuais efeitos bioquímicos do composto. Por outro lado, a mortalidade larval aumentou substancialmente em concentrações mais elevadas, sendo que a letalidade completa foi registrada em concentrações superiores a 1800  $\mu\text{M}$  no período avaliado.

A análise estatística por meio de modelos de probit possibilitou o cálculo das CLs, fornecendo parâmetros quantitativos importantes para a compreensão da toxicidade do hidrato de morina em *Ae. aegypti*. Os valores obtidos foram:  $\text{CL}_{25} = 52,692 \mu\text{M}$ ,  $\text{CL}_{40} = 111,121 \mu\text{M}$ ,  $\text{CL}_{50} = 174,775 \mu\text{M}$ ,  $\text{CL}_{75} = 575,083 \mu\text{M}$  e  $\text{CL}_{90} = 1685,936 \mu\text{M}$ . Esses resultados evidenciam que a substância apresenta atividade larvicida moderada, sendo efetiva principalmente em doses intermediárias a altas.

De forma complementar, os valores progressivos de letalidade sugerem que o hidrato de morina exerce efeitos subletais em concentrações menores, os quais podem influenciar processos fisiológicos relevantes, como metabolismo energético, desenvolvimento e reprodução, ainda que não provoquem mortalidade imediata. Esse aspecto torna o composto particularmente interessante para estudos, uma vez que alterações fisiológicas subjacentes podem impactar a homeostase do mosquito, mesmo na ausência de morte larval direta.



**Figura 5 Taxa de sobrevivência de larvas tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.** Larvas no estágio L3 foram criadas em soluções com diferentes concentrações de morina, e a taxa de sobrevivência após 24 h foi determinada. Os valores são relatados como a porcentagem da sobrevivência média de quatro réplicas biológicas independentes  $\pm$  EPM ( $n = 16$ ).

Para avaliar a eficiência do tratamento e os impactos nas fases de desenvolvimento, o efeito sobre essas larvas foi observado após um tratamento de 24 h com hidrato de morina. As larvas tratadas foram então transferidas para meio contendo água limpa e alimento, a fim de permitir que completassem seu ciclo biológico. Optamos por utilizar concentrações próximas a CL<sub>25</sub>, CL<sub>40</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub>, previamente determinadas nos ensaios de sobrevivência. A escolha desses valores teve como objetivo estabelecer gradientes de toxicidade que permitissem avaliar tanto efeitos subletais quanto letais ao longo do desenvolvimento. Por outro lado, a utilização de concentrações próximas a CL<sub>90</sub> mostrou-se inviável, uma vez que resultava em mortalidade excessiva, restringindo a disponibilidade de material biológico para as análises subsequentes.

As taxas de pupação e mortalidade foram monitoradas diariamente após o tratamento com diferentes concentrações de hidrato de morina (Figura 6). No sexto dia pós-tratamento, todas as larvas dos grupos tratados haviam se transformado em pupas ou apresentado mortalidade, indicando que o hidrato de morina interferiu diretamente no ritmo do

desenvolvimento larval. Observou-se que a pupação diária (Figura 6A) apresentou um pico entre no segundo dia após o tratamento, sendo este mais evidente no grupo controle (com taxa de 49,3 % de pupação), enquanto as concentrações crescentes de morina retardaram e reduziram a taxa de pupação diária. Com exceção do grupo tratado com 50  $\mu$ M que não apresentou diferença significativa para o grupo controle apresentando 45,3 % de pupação no segundo dia. Em contraste, o pico de taxa de pupação das larvas tratadas com 100 e 175  $\mu$ M ocorreu apenas no terceiro dia, enquanto as larvas tratadas com 500  $\mu$ M tiveram pico de pupação apenas no quarto dia. Além do atraso no tempo de pupação, houve uma redução significativa nas taxas de acúmulo observadas com concentrações mais altas de hidrato de morina. Após 6 dias, quase todas as larvas se tornaram pupas nas concentrações de 0 e 50  $\mu$ M, mostrando uma pequena redução no número total de pupas observada em 100  $\mu$ M, que se intensificou com o aumento da concentração de hidrato de morina, com taxas de acúmulo de aproximadamente 64% e 33% em 175 e 500  $\mu$ M, respectivamente (Figura 6B).

Quanto à mortalidade diária (Figura 6C), os grupos tratados apresentaram aumento progressivo ao longo dos dias, em contraste com o controle e 50  $\mu$ M, que manteve mortalidade persistente mínima. O grupo tratado com 100  $\mu$ M também apresentou mortalidade baixa, porém, se diferenciou estatisticamente com o passar dos dias. Esse efeito foi ainda mais evidente quando analisada a mortalidade acumulada (Figura 6D), onde as concentrações de morina resultaram em incrementos consistentes de mortalidade até o sexto dia, alcançando diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle e o grupo de 50  $\mu$ M. Esses resultados demonstram não apenas o efeito larvicida imediato do hidrato de morina, mas também seu impacto persistente ao longo do desenvolvimento, comprometendo tanto a sobrevivência quanto a transição bem-sucedida das larvas para pupas.

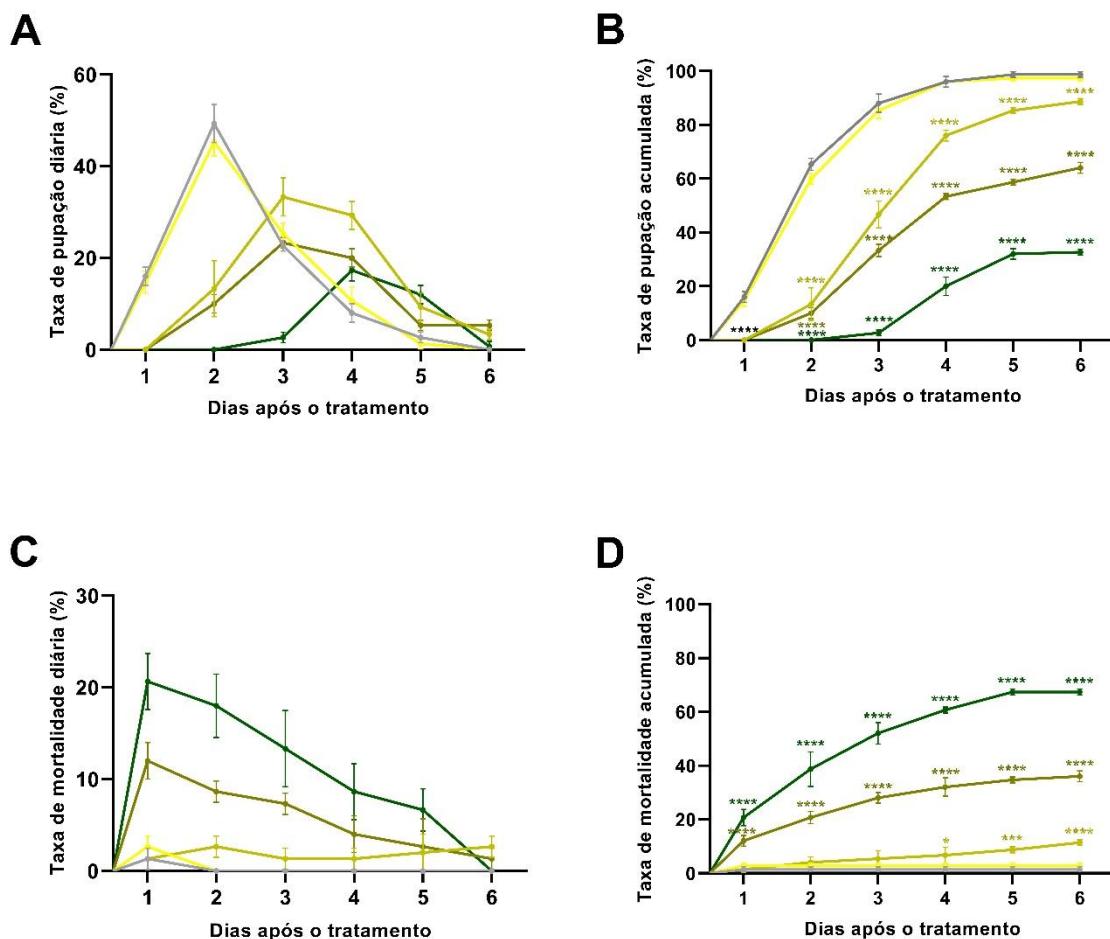
Em conjunto, esses dados reforçam que o hidrato de morina exerce efeitos tóxicos cumulativos e graduais, interferindo de forma direta na dinâmica do desenvolvimento larval de *Ae. aegypti* revelando um retardamento no desenvolvimento. Esse padrão de ação é consistente com a literatura sobre flavonoides, que frequentemente apresentam tanto efeitos agudos quanto subletais em insetos, afetando a sobrevivência, o tempo de desenvolvimento e a fecundidade (Herrera-Mayorga et al., 2022; Isman, 2020; Pavela et al., 2019).

A toxicidade observada pode estar relacionada à alta reatividade dos flavonoides, compostos conhecidos por sua capacidade de interagir com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, promovendo alterações funcionais e estruturais que comprometem a sobrevivência

de organismos-alvo (Pavela et al., 2019). Alguns dos mecanismos que podem ser afetados envolvem o potencial inibitório contra enzimas de detoxicação em insetos, como GSTs, esterases e oxidases do citocromo P450 que são essenciais para neutralizar compostos xenobióticos e inseticidas (Azuma, 2014; Muthu et al., 2015). Dessa forma, a exposição a flavonoides pode levar a um acúmulo de espécies tóxicas e consequente desequilíbrio fisiológico, resultando em redução da viabilidade larval.

Na literatura, o uso de extratos vegetais para avaliação da atividade inseticida é amplamente reportado, e em grande parte dos casos esse potencial tem sido associado à presença de metabólitos secundários, em especial flavonoides (Isman, 2020; Pavela; Benelli, 2016). No entanto, estudos com flavonoides isolados também têm demonstrado efeitos larvicidas importantes. Por exemplo, a pectinaringenina (5,7-di-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona) foi relatada como tóxica contra *Anopheles stephensi* e *Earias vittella*, efeito atribuído à inibição das enzimas GST e esterases, fundamentais na defesa metabólica contra xenobióticos (Azuma, 2014; Muthu et al., 2015).

Outros flavonoides também exibem mecanismos de toxicidade semelhantes. A quercetina, um isômero estrutural da morina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), foi relatada como inibidora da acetilcolinesterase em *Spodoptera frugiperda*, comprometendo a neurotransmissão colinérgica e levando à disfunção neuromuscular e à morte (Herrera-Mayorga et al., 2022). De forma complementar, estudos demonstraram que a suplementação de morina e quercetina, em associação com etilparaoxona e cipermetrina, reduziu significativamente o ganho de peso e a sobrevivência de larvas de *Helicoverpa armigera*, sugerindo um efeito sinérgico entre flavonoides e inseticidas convencionais (Aurade et al., 2011).



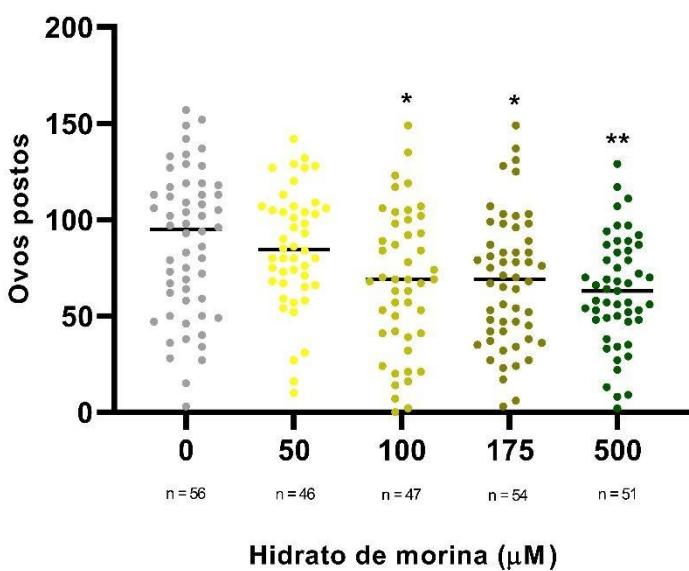
**Figura 6. Taxas diárias de pupação e mortalidade após tratamento com hidrato de morina.** Após 24 h de tratamento, as larvas sobreviventes foram lavadas e transferidas para um meio contendo água limpa. As taxas diárias de pupação (A), pupação acumulada (B), mortalidade diária (C) e mortalidade acumulada (D) foram registradas em intervalos de 24 h. As diferenças estatísticas em relação ao controle (0  $\mu$ M de hidrato de morina) foram determinadas usando ANOVA bidirecional. As cores das linhas representam diferentes tratamentos: cinza (0  $\mu$ M), amarelo claro (50  $\mu$ M), amarelo médio (100  $\mu$ M), amarelo oliva (175  $\mu$ M) e verde (500  $\mu$ M). Os valores são relatados como a porcentagem de pupação e mortalidade média de três réplicas biológicas independentes  $\pm$  EPM ( $n = 12$ ). As barras anotadas com asteriscos são significativamente diferentes do controle (0  $\mu$ M), onde \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## **5.2 Efeitos residuais do hidrato de morina na fecundidade e fertilidade**

Com o intuito de investigar possíveis efeitos residuais do hidrato de morina além da mortalidade larval imediata, avaliamos a capacidade reprodutiva de *Ae. aegypti* cujos adultos emergiram de larvas previamente expostas ao composto. Para isso, larvas sobreviventes ao tratamento com diferentes concentrações de morina foram mantidas até atingirem a fase adulta, quando foram separadas e submetidas a ensaios de fertilidade. No quarto dia pós-emergência, fêmeas adultas foram alimentadas com sangue e, após 72 h, o número de ovos depositados foi quantificado.

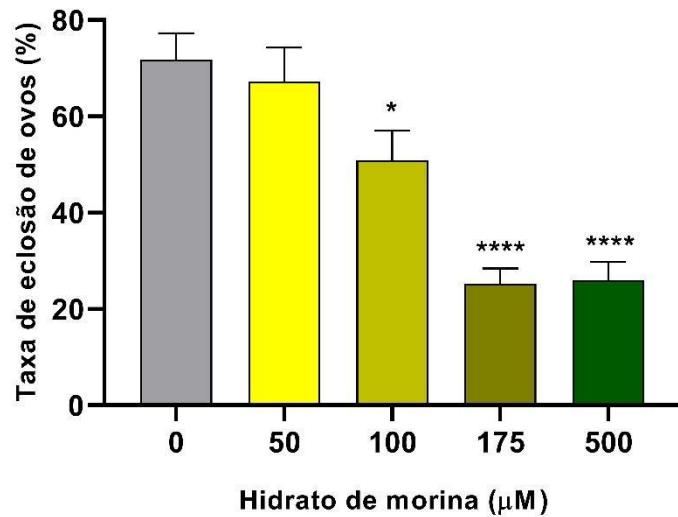
Os resultados obtidos (Figura 7) indicam que o tratamento larval com concentrações de hidrato de morina acima de 100  $\mu\text{M}$  reduziu significativamente a fecundidade das fêmeas adultas em relação ao controle. Fêmeas tratadas com 100  $\mu\text{M}$  e 175  $\mu\text{M}$  de morina apresentaram uma queda de aproximadamente 28% no número de ovos depositados ( $p < 0,05$ ), enquanto aquelas expostas a 500  $\mu\text{M}$  exibiram uma redução ainda mais acentuada, de cerca de 35% ( $p < 0,01$ ). Essa diminuição evidencia que a morina, mesmo após um período limitado de exposição na fase larval, compromete a maturação reprodutiva e, provavelmente, a alocação de recursos energéticos nas fêmeas.

A análise da taxa de eclosão (Figura 8) revelou ainda maior impacto, apresentando que a exposição larval a 100  $\mu\text{M}$  resultou em mais de 20% de redução na taxa de eclosão, enquanto concentrações de 175  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  provocaram uma queda superior a 46% na viabilidade dos ovos. Esse quadro reforça que o dano vai além da quantidade de ovos produzidos, estendendo-se também à sua qualidade e capacidade de originar descendentes viáveis. A redução expressiva na eclosão sugere que o hidrato de morina interfere em etapas críticas do desenvolvimento embrionário, possivelmente comprometendo a deposição de nutrientes essenciais no vitelo, a integridade das membranas ou a regulação hormonal envolvida na formação e maturação dos ovos.



**Figura 7. Postura de ovos por fêmeas submetidas a diferentes concentrações de hidrato de morina durante a fase larval.** Larvas de *Aedes aegypti* no estágio L3 foram submetidas a um tratamento de 24 horas com diferentes concentrações de hidrato de morina. As larvas sobreviventes após o tratamento que atingiram a fase adulta foram alimentadas com sangue, e o número de ovos postos foi contado. Os valores representam a mediana de quatro repetições biológicas independentes. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

Esses dados mostram que o tratamento com hidrato de morina causa mortalidade larval de forma dose-dependente e que, mesmo após o tratamento, as larvas sobreviventes foram impactadas tanto no desenvolvimento quanto na geração de descendentes, mesmo sem exposição por mais de 24 horas. Em outras palavras, a administração de morina teve um efeito persistente sistêmico e de longo prazo nas larvas tratadas. Isso é consistente com o que foi observado em *Coptotermes formosanus*, o flavonoide biochanin A reduziu significativamente a fecundidade quando administrado a reprodutores primários via alimentação e aplicação tópica (Boué; Raina, 2003). Além disso, extratos vegetais ricos em flavonoides usados em larvas de várias espécies de mosquitos diminuíram tanto a fecundidade quanto a eclosão dos ovos de *Ae. aegypti*, *An. stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, com reduções que variaram entre 62,4% e 87,4% nos prole e entre 82,8% e 93,3% no índice de esterilidade (Muthukrishnan; Pushpalatha, 2001).



**Figura 8. Taxa de eclosão de ovos postos por fêmeas tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.** Larvas de *Aedes aegypti* no estágio L3 foram submetidas a um tratamento de 24 horas com diferentes concentrações de hidrato de morina, e as larvas que atingiram o estágio adulto foram alimentadas com sangue após 96 horas. Os ovos foram coletados, e o número de larvas eclodidas desses ovos foi usado para calcular a porcentagem. Os valores representam a média de três réplicas biológicas independentes  $\pm$  EPM ( $n = 15$ ). As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA unidirecional (\*  $p < 0,05$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Esses resultados de fertilidade, associados aos observados anteriormente na figura 6, sugerem um desequilíbrio na homeostase do inseto, indicando que vias metabólicas cruciais podem ter sido comprometidas pela exposição ao hidrato de morina. Estudos prévios mostram que flavonoides podem reduzir a atividade da Nobo (Inaba et al., 2022) e da ecdisona 20-monooxygenase dependente do citocromo P-450 (Mitchell et al., 1993), ambas enzimas envolvidas na síntese de precursores e ativadores de ecdisona. A ecdisona é um hormônio essencial para o crescimento larval, metamorfose e regulação de processos fisiológicos em insetos holometabólicos (Kannangara; Mirth; Warr, 2021), além de ter uma função fundamental na regulação no metabolismo reprodutivo de *Ae. aegypti* após refeições sanguíneas (Roy et al., 2016). Logo, é plausível afirmar que a inibição enzimática causada pelo hidrato de morina tenha reduzido sua disponibilidade, retardando o desenvolvimento larval e taxa de pupação observada em nosso estudo. Além disso, o seu comprometimento pode ter repercutido também no sistema

reprodutivo das fêmeas emergentes, uma vez que observamos reduções expressivas tanto na oviposição, quanto na eclosão. Assim, a ação do hidrato de morina parece não apenas interferir no desenvolvimento larval, mas também exercer efeitos residuais na fecundidade e na viabilidade dos ovos, possivelmente mediados por alterações hormonais e metabólicas induzidas durante a fase larval.

Além disso, o comprometimento simultâneo da fecundidade e da eclosão amplia o efeito deletério do composto, uma vez que impacta tanto o número de descendentes gerados quanto a probabilidade de sobrevivência das futuras larvas. Dessa forma, mesmo fêmeas capazes de ovipositar apresentam um potencial reprodutivo significativamente reduzido, o que, em um contexto populacional, representa uma diminuição expressiva na capacidade de reposição da população de mosquitos ao longo dos ciclos geracionais. Portanto, os efeitos adversos observados refletem uma ação abrangente dos flavonoides sobre processos fisiológicos essenciais ao desenvolvimento e à reprodução dos insetos. Sendo assim, o hidrato de morina atua não apenas como agente larvicida, mas também como modulador da fecundidade e da viabilidade larval, configurando-se como uma molécula promissora no manejo integrado de vetores, ao reduzir de forma cumulativa a sobrevivência, o desenvolvimento e o potencial reprodutivo de *A. aegypti*.

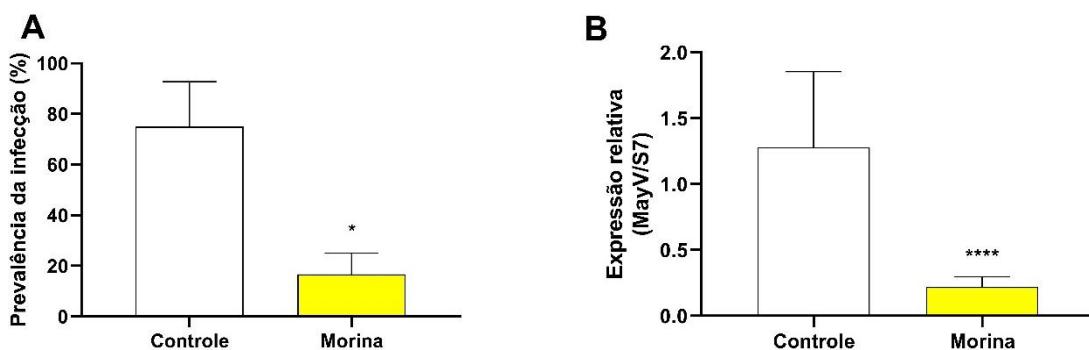
### **5.3 Potencial modulador do hidrato de morina na suscetibilidade vetorial de *Ae. aegypti* para o vírus Mayaro**

A suscetibilidade vetorial de mosquitos do gênero *Aedes* é um fator determinante para a manutenção e disseminação de arboviroses emergentes, como o vírus Mayaro, cuja transmissão tem sido associada a espécies adaptadas ao ambiente urbano (Caicedo et al., 2021; De Curcio et al., 2022; Pereira et al., 2020). Considerando que alterações fisiológicas ocorridas durante a fase imatura podem refletir na suscetibilidade dos adultos à infecção viral, avaliamos o impacto do tratamento larval com hidrato de morina sobre a capacidade de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* se infectarem e sustentarem a replicação do vírus Mayaro após o repasto sanguíneo. Para isso, adultos provenientes de larvas previamente expostas a 175 µM de hidrato de morina, próximo a CL<sub>50</sub>, foram desafiados experimentalmente com sangue infectado, e, após sete dias, a prevalência de infecção e a carga viral foram determinadas por PCR em tempo real.

Os resultados referentes à prevalência de infecção, que expressam a proporção de fêmeas infectadas após sete dias da alimentação com sangue infectado, bem como os dados de carga viral estão apresentados na Figura 9. O tratamento larval com hidrato de morina reduziu de forma expressiva a suscetibilidade vetorial das fêmeas adultas de *A. aegypti* para o vírus Mayaro. Após sete dias da alimentação sanguínea infectada, a prevalência de infecção no grupo controle foi de 75%, enquanto que nas fêmeas oriundas de larvas tratadas com a CL<sub>50</sub> (175 µM) do composto essa proporção caiu para apenas 16,7% (Figura 9A). De maneira consistente, a carga viral detectada por qPCR também foi significativamente menor nas fêmeas tratadas, correspondendo a apenas 17,2% daquela observada no controle, o que representa uma redução de 82,8% na carga viral (Figura 9B).

Os resultados mostram que o tratamento larval com hidrato de morina reduziu drasticamente tanto a prevalência de infecção quanto a carga viral do Mayaro em fêmeas de *Ae. aegypti*, indicando uma redução marcada na suscetibilidade vetorial desse vetor após exposição larval. Achados prévios demonstram que *Ae. aegypti* é potencialmente competente para o Mayaro em condições laboratoriais, mas que taxas de infecção e transmissão variam amplamente com a cepa viral, a população de mosquitos e as condições experimentais; portanto, alterações fisiológicas induzidas durante o desenvolvimento imaturo podem modular decisivamente esses parâmetros (Long et al., 2011). Além disso, já foi relatado que o ambiente larval é conhecido por modular a suscetibilidade vetorial, onde condições nutricionais que prejudicam ou estressam o desenvolvimento de larvas de *Anopheles gambiae* reduzem a capacidade de adquirir e transmitir a malária (Barreaux et al., 2016), fato que pode refletir um conjunto de alterações fisiológicas persistentes induzidas pelo hidrato de morina durante a etapa larval.

A redução significativa da prevalência de mosquitos infectados e da carga viral observada após o tratamento larval com hidrato de morina sugere que alterações fisiológicas durante o desenvolvimento podem ter comprometido a suscetibilidade vetorial do *Ae. aegypti*. Estudos sugerem que danos ao epitélio intestinal larval, frequentemente mediados por estresse oxidativo, reduzem a eficiência de absorção de nutrientes e modulam a microbiota, o que impacta diretamente a formação de reservas energéticas e a suscetibilidade a patógenos na fase adulta (Kuraishi; Hori; Kurata, 2013; Oliveira et al., 2011). Esse mecanismo é particularmente relevante para mosquitos, no qual a integridade intestinal é determinante para a barreira inicial contra arbovírus.



**Figura 9. Prevalência de infecção e carga viral em fêmeas adultas após 7 dias de alimentação sanguínea pelo vírus Mayaro.** Em (A) há a representação do percentual de mosquitos que apresentaram infecção após 7 dias e em (B) a carga viral que ocorreu em fêmeas originadas de larvas tratadas com a CL<sub>50</sub> (175 µM) estabelecida nos testes larvicidas do hidrato de morina. A carga viral foi aferida através de qPCR. Após a emergência na fase adulta, fêmeas de 7 dias de idade foram alimentadas com sangue infectado com o arbovírus Mayaro e após 7 dias a prevalência infecção foi checada através de PCR. Os valores representam a média de quatro réplicas biológicas independentes ± EPM (n = 12). As diferenças estatísticas foram determinadas por teste T (\* p < 0,05 e \*\*\*\* p < 0,0001).

A microbiota intestinal desempenha papel central na digestão, desenvolvimento e imunidade, sendo também um fator chave na competência vetorial (Cansado-Utrilla et al., 2021; Dong; Manfredini; Dimopoulos, 2009). Alterações induzidas por compostos bioativos durante a fase larval podem remodelar a composição microbiana e reduzir a permissividade ao vírus Mayaro, limitando sua disseminação sistêmica. Além disso, estudos prévios demonstram que flavonoides exercem atividade antimicrobiana e antioxidante modulando a homeostase intestinal (Cory et al., 2018), o que reforça a razoabilidade dessa via de ação para explicar os resultados obtidos.

Adicionalmente, flavonoides já foram descritos contendo atividade antiviral direta contra arbovírus, incluindo Dengue (Frabasile et al., 2017; Oo et al., 2018; Zandi et al., 2011). Portanto, a redução da carga viral observada pode resultar tanto de efeitos indiretos mediados pelo hospedeiro, via alterações intestinais e metabólicas, quanto de uma ação antiviral direta do hidrato de morina. Assim, os resultados aqui apresentados corroboram evidências de que o ambiente larval e a exposição a metabólitos secundários vegetais podem modular de forma

significativa a suscetibilidade vetorial de mosquitos (Alto; Bettinardi, 2013), destacando o potencial do hidrato de morina como agente modulador da transmissão de arboviroses.

#### **5.4 Avaliação toxicológica do hidrato de morina em camundongos**

Para avaliar os efeitos do hidrato de morina em vertebrados, conduzimos ensaios toxicológicos em camundongos utilizando uma dose aproximadamente 1000 vezes maior do que aquela usada nos ensaios com mosquitos. Durante o período de observação, não foram observados sintomas de intoxicação, como convulsões, hiperatividade, perda do reflexo postural, alterações na frequência respiratória, sedação, tremores, convulsões, lacrimejamento, secreção nasal ou diarreia. Além disso, nenhuma morte ocorreu no grupo tratado.

Esse resultado está de acordo com a literatura científica, que relata a natureza relativamente segura da morina em modelos mamíferos. Por exemplo, um estudo subcrônico em ratos F344 demonstrou boa tolerância ao tratamento oral de morina, mesmo em doses elevadas de até 2400 mg/kg ao longo de 13 semanas, sem mortalidade ou manifestações clínicas adversas significativas (Cho et al., 2006), que é muito superior aos 300 mg/kg que foi utilizado no presente estudo. Além disso, morina apresentou forte atividade antioxidante e hepatoprotetora em modelos de lesão hepática induzida por CCl<sub>4</sub>, atenuando os níveis de marcadores de dano hepático e reduzindo estresse oxidativo (Li et al., 2019). Outro estudo recente demonstrou que o tratamento com hidrato de morina protegeu contra a toxicidade testicular induzida por agentes como acetamiprida, restaurando a sinalização antioxidante via Nrf2 e reduzindo estresse oxidativo e inflamação nos testículos de camundongos (Alemdar et al., 2025). E ainda foi descrito como modulador da regulação do metabolismo do açúcar (Hua et al., 2024). Além de várias outras funções já descritas na literatura, como antioxidante, anticancerígena, antiartite, gastroprotetivo, nefroprotetivo, neuroproteivo, antimicrobiano, entre outras (Rajput; Wang; Yan, 2021).

Contudo, diversos estudos têm buscado avaliar os efeitos tóxicos de flavonoides em modelos de mamíferos, considerando sua ampla distribuição na dieta e potencial farmacológico. Em roedores, a fração de flavonoides de *Lithocarpus polystachyus* (ST-F) foi avaliada em testes de toxicidade aguda e subcrônica, revelando ausência de efeitos adversos significativos em doses únicas de até 5.000 mg/kg em camundongos, embora em exposições prolongadas (70 a

560 mg/kg/dia) tenham sido observadas alterações hematológicas e bioquímicas, incluindo modificações nos níveis de glicose e enzimas hepáticas (Liang et al., 2017). De forma semelhante, a administração do flavonoide formononetina em camundongos demonstrou que doses elevadas ( $LD_{50} \sim 103,6$  mg/kg, via intraperitoneal) estão associadas a sinais de toxicidade, especialmente hepática, enquanto doses mais baixas (12,5 a 50 mg/kg por 28 dias) não apresentaram efeitos adversos relevantes (Pingale; Gupta, 2023). Esses dados reforçam a ideia de que, apesar da segurança em doses agudas elevadas, a exposição repetida pode desencadear efeitos sistêmicos sutis ou cumulativos.

No presente estudo, a administração de 300 mg/kg de hidrato de morina em camundongos não resultou em sinais de intoxicação aguda, corroborando com evidências anteriores de que doses únicas de flavonoides podem apresentar baixo potencial tóxico em modelos murinos. Essas evidências sugerem que o hidrato de morina possui um perfil de segurança elevado em mamíferos, mesmo quando administrado em doses substancialmente maiores do que aquelas necessárias para o controle vetorial, ao mesmo tempo em que demonstrou alta eficácia contra *Ae. aegypti*. Tal resultado indica que seu mecanismo de ação é seletivo, impactando o metabolismo e a fisiologia dos insetos sem causar efeitos adversos detectáveis em vertebrados como os camundongos. Contudo, à luz dos resultados reportados para outros flavonoides, é plausível supor que exposições repetidas ou prolongadas possam afetar parâmetros fisiológicos ou bioquímicos, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo hepático. Assim, embora nossos achados sugiram segurança em administração aguda na concentração utilizada, estudos adicionais são necessários para elucidar os efeitos a longo prazo do hidrato de morina em modelos de mamíferos, permitindo compreender de forma mais ampla suas implicações metabólicas e toxicológicas.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que o hidrato de morina exerce efeitos multifacetados sobre o ciclo de vida de *Ae. aegypti*, comprometendo tanto a sobrevivência quanto a capacidade reprodutiva da espécie. A exposição larval ao composto resultou em aumento significativo da mortalidade, reduzindo a proporção de indivíduos que atingiram estágios posteriores do desenvolvimento. Entre os sobreviventes, observou-se atraso no processo de pupação, indicando que o composto interfere em mecanismos fisiológicos fundamentais para a metamorfose. Além disso, as fêmeas adultas emergidas das larvas tratadas apresentaram redução expressiva na fertilidade, refletida na menor oviposição e viabilidade dos ovos. Do ponto de vista epidemiológico, o hidrato de morina também impactou a suscetibilidade vetorial: as fêmeas provenientes de larvas expostas exibiram menor prevalência de infecção e redução acentuada da carga viral após o desafio com o vírus Mayaro, o que demonstra a capacidade do composto em limitar a transmissão de arbovírus. Esses resultados, em conjunto, revelam que a morina atua em diferentes pontos críticos da biologia do mosquito, reduzindo sua abundância populacional e sua eficiência como vetor de patógenos.

Adicionalmente, os ensaios toxicológicos em camundongos mostraram que, mesmo em doses muito superiores às utilizadas nos experimentos com mosquitos, o hidrato de morina não induziu sinais clínicos de toxicidade aguda ou mortalidade, corroborando dados da literatura que descrevem a baixa toxicidade deste flavonoide em modelos mamíferos. Esses achados reforçam a seletividade do composto, sugerindo um potencial promissor para estratégias de controle vetorial ambientalmente seguras, sem comprometer mamíferos. Contudo, mais estudos são necessários para compreender o efeito de exposições crônicas do hidrato de morina em modelos de mamíferos.

Considerando a amplitude de seus efeitos sobre a biologia de *Ae. aegypti*, é plausível propor que o hidrato de morina atue interferindo em vias metabólicas críticas para o desenvolvimento e a reprodução do inseto. Nesse contexto, a investigação do metabolismo energético, incluindo o papel de vias relacionadas à homeostase de lipídios, carboidratos e proteínas, poderão esclarecer os mecanismos moleculares que sustentam a ação larvicida e antivetorial da morina. Essa abordagem contribuirá não apenas para compreender os efeitos bioquímicos do composto, mas também para consolidar seu potencial como ferramenta inovadora no manejo integrado de vetores.

## **CAPITULO II**

**O hidrato de morina reduz reservas lipídica e glicídicas,  
além de desencadear estresse oxidativo**

## RESUMO

Os flavonoides são compostos naturais amplamente distribuídos em plantas e conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e inseticidas, despertando crescente interesse no controle de vetores devido ao seu potencial de modular processos metabólicos essenciais em insetos. Entre eles, o hidrato de morina tem se destacado por apresentar baixa toxicidade em modelos de mamíferos e efeitos promissores contra *Aedes aegypti*, um dos principais vetores de arboviroses como dengue, zika e chikungunya. Neste estudo, avaliamos o impacto do hidrato de morina sobre o metabolismo energético e o equilíbrio redox de larvas de *Ae. aegypti*. Larvas L3 foram expostas por 24 h a diferentes concentrações do composto (0, 50, 100, 175 e 500 µM), e avaliou-se o conteúdo de triacilgliceróis, glicose, trealose e glicogênio, bem como a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico, glicídico e receptores hormonais (AKH e ILPs), além disso, verificou-se a produção de peróxido de hidrogênio. Os resultados revelaram um efeito dose-dependente caracterizado pela redução progressiva dos estoques lipídicos e de carboidratos, associado à ativação de lipases (TAGL1, HSL) e à forte repressão de enzimas lipogênicas (FAS1, DGAT1, GPAT1) e da glicogênio sintase, enquanto a trealose circulante se manteve relativamente estável, sugerindo priorização da homeostase hemolinfática. A modulação hormonal incluiu aumento da expressão do receptor de AKH e supressão drástica do receptor de ILPs, indicando um redirecionamento para um estado catabólico persistente. Paralelamente, observou-se indução significativa de peróxido de hidrogênio em homogeneizados de larvas inteiras e intestinos, evidenciando que a sobrecarga metabólica e a mobilização energética intensificaram o metabolismo oxidativo, além de indicar o comprometimento da integridade intestinal e a absorção de nutrientes. Em conjunto, os achados demonstram que o hidrato de morina atua como modulador metabólico profundo, suprimindo vias anabólicas, estimulando vias catabólicas e induzindo estresse oxidativo, o que contribui para a depleção energética e redução da aptidão larval de *Ae. aegypti*.

## **ABSTRACT**

Flavonoids are natural compounds widely distributed in plants and known for their antioxidant, anti-inflammatory, and insecticidal properties, generating increasing interest in vector control due to their potential to modulate essential metabolic processes in insects. Among them, morin hydrate has stood out for its low toxicity in mammalian models and its promising effects against *Aedes aegypti*, one of the main vectors of arboviruses such as dengue, Zika, and chikungunya. In this study, we evaluated the impact of morin hydrate on the energy metabolism and redox balance of *Ae. aegypti* larvae. Third-instar larvae were exposed for 24 h to different concentrations of the compound (0, 50, 100, 175, and 500 µM), and the contents of triacylglycerols, glucose, trehalose, and glycogen were measured, as well as the expression of lipidic and glycogenic enzymes and hormonal receptors (AKH and ILPs). In addition, hydrogen peroxide production was assessed. The results revealed a dose-dependent effect characterized by a progressive reduction in lipid and carbohydrate stores, associated with the activation of lipases (TAGL1, HSL) and strong repression of lipogenic enzymes (FAS1, DGAT1, GPAT1) and glycogen synthase, while circulating trehalose remained relatively stable, suggesting prioritization of hemolymph homeostasis. Hormonal modulation included an increase in AKH receptor expression and a drastic suppression of ILP receptor expression, indicating a shift toward a persistent catabolic state. In parallel, a significant induction of hydrogen peroxide was observed in homogenates of whole larvae and midguts, demonstrating that metabolic overload and energy mobilization intensified oxidative metabolism and compromised intestinal integrity and nutrient absorption. Taken together, the findings demonstrate that morin hydrate acts as a profound metabolic modulator, suppressing anabolic pathways, stimulating catabolic ones, and inducing oxidative stress, which contributes to energy depletion and reduced larval fitness in *Ae. aegypti*.

## **7 REFERENCIAL TEÓRICO**

O armazenamento e a mobilização de reservas energéticas representam processos fundamentais para a manutenção da homeostase em insetos, pois permitem a sobrevivência em períodos de escassez alimentar, variações ambientais e demandas fisiológicas específicas (Arrese; Soulages, 2010). Nesse contexto, o tecido adiposo, denominado corpo gorduroso, exerce papel central como órgão metabólico e de armazenamento, acumulando lipídios sob a forma de triacilgliceróis e carboidratos na forma de glicogênio (Canavoso et al., 2001; Gondim et al., 2018). Assim, esse tecido funciona como um integrador metabólico, ajustando-se a estímulos internos e externos de modo a sustentar funções vitais como crescimento, metamorfose, reprodução e longevidade (Arrese; Soulages, 2010).

A manutenção do equilíbrio energético em insetos depende da interação coordenada entre diferentes tipos de reservas. Enquanto os lipídios fornecem energia de longa duração e participam da formação de membranas celulares, os carboidratos, especialmente o glicogênio, atuam como fonte de energia de rápida mobilização (Canavoso et al., 2001). Além disso, a trealose, principal carboidrato circulante na hemolinfa, assegura aporte energético contínuo às células e tecidos, desempenhando ainda funções associadas à resistência ao estresse oxidativo e à manutenção estrutural durante variações ambientais (Shukla et al., 2015; Yu et al., 2021). Dessa forma, lipídios, glicogênio e trealose constituem um sistema integrado que garante a homeostase metabólica dos insetos frente a diferentes condições de desafio energético.

Em mosquitos vetores, como *Ae. aegypti*, a importância das reservas energéticas torna-se ainda mais evidente. Durante o primeiro ciclo gonotrófico, substratos acumulados previamente, seja na fase larval ou por meio da ingestão de açúcares na fase adulta, são mobilizados em paralelo à utilização de nutrientes derivados do sangue, assegurando a produção eficiente de ovos (Briegel, 1990; Ziegler; Ibrahim, 2001). Após o repasto sanguíneo, observam-se alterações marcantes na composição lipídica e na morfologia das gotas citoplasmáticas do corpo gorduroso, refletindo a redistribuição de nutrientes para a vitelogênese (Hou et al., 2015; Wang et al., 2017). Assim, a capacidade de reorganizar as reservas energéticas garante que o ciclo reprodutivo seja concluído mesmo diante de variações no aporte nutricional.

Para além da reprodução, as reservas energéticas também modulam outros processos fisiológicos relevantes. Alterações no metabolismo de lipídios e carboidratos estão associadas

à resposta imune e à interação com patógenos, como evidenciado em modificações metabólicas observadas durante infecções por arbovírus (Barletta et al., 2017; Perera et al., 2012). De maneira semelhante, ajustes no metabolismo glicídico durante o desenvolvimento embrionário de ovos de *Ae. aegypti* conferem resistência à dessecação, assegurando a viabilidade até a eclosão (Rezende et al., 2008). Ainda, o estado nutricional das larvas influencia diretamente a quantidade de reservas acumuladas nos adultos, afetando fecundidade, longevidade e até a competência vetorial (Silva et al., 2020; Telang et al., 2012). Nesse sentido, as reservas energéticas não apenas sustentam processos fisiológicos imediatos, mas representam também um elo entre nutrição, reprodução e sobrevivência em diferentes fases do ciclo de vida. Portanto, o equilíbrio entre armazenamento e mobilização de reservas é essencial para a homeostase geral dos insetos, garantindo não só a manutenção das funções básicas, mas também a sobrevivência das espécies.

## **7.1 Padrões nutricionais e suas implicações fisiológicas em *Aedes aegypti***

As exigências nutricionais de *Ae. aegypti* variam de acordo com o estágio do ciclo de vida, refletindo a adaptação do inseto a diferentes ambientes e fontes alimentares. Na fase larval, a nutrição depende principalmente da ingestão de partículas orgânicas suspensas em água, como microrganismos, detritos vegetais e matéria orgânica em decomposição, os quais são processados por meio de um aparato bucal filtrador eficiente (Merritt; Dadd; Walker, 1992). Essa dieta fornece proteínas, lipídios e carboidratos essenciais para o acúmulo de reservas que sustentarão a metamorfose e a emergência do adulto (Telang; Frame; Brown, 2007). A disponibilidade e a qualidade desse alimento aquático influenciam diretamente no tamanho corporal, na quantidade de reservas energéticas acumuladas e, consequentemente, na fecundidade e longevidade dos adultos (3). Assim, a fase larval estabelece a base metabólica sobre a qual se desenvolverão os estágios subsequentes.

Na fase adulta, as necessidades nutricionais se diversificam de acordo com o sexo e a função fisiológica desempenhada. Tanto machos quanto fêmeas dependem do consumo de açúcares de origem vegetal, principalmente néctar e exsudatos de frutas que fornecem energia imediata para o metabolismo basal e o voo (Foster, 1995). Essa fonte de carboidratos é fundamental para a sobrevivência dos adultos, especialmente em períodos nos quais a disponibilidade de sangue é limitada (Martinez-Ibarra et al., 1997). Já as fêmeas apresentam a

peculiaridade de necessitar de uma refeição sanguínea, que fornece proteínas e lipídios indispensáveis para a produção de ovos (Attardo; Hansen; Raikhel, 2005). O sangue ingerido é direcionado ao processo de vitelogênese, garantindo a síntese de vitelogenina e o desenvolvimento dos oócitos (Clifton; Noriega, 2012). Dessa forma, enquanto o açúcar assegura energia de manutenção, a refeição sanguínea representa um aporte específico e direcionado à reprodução.

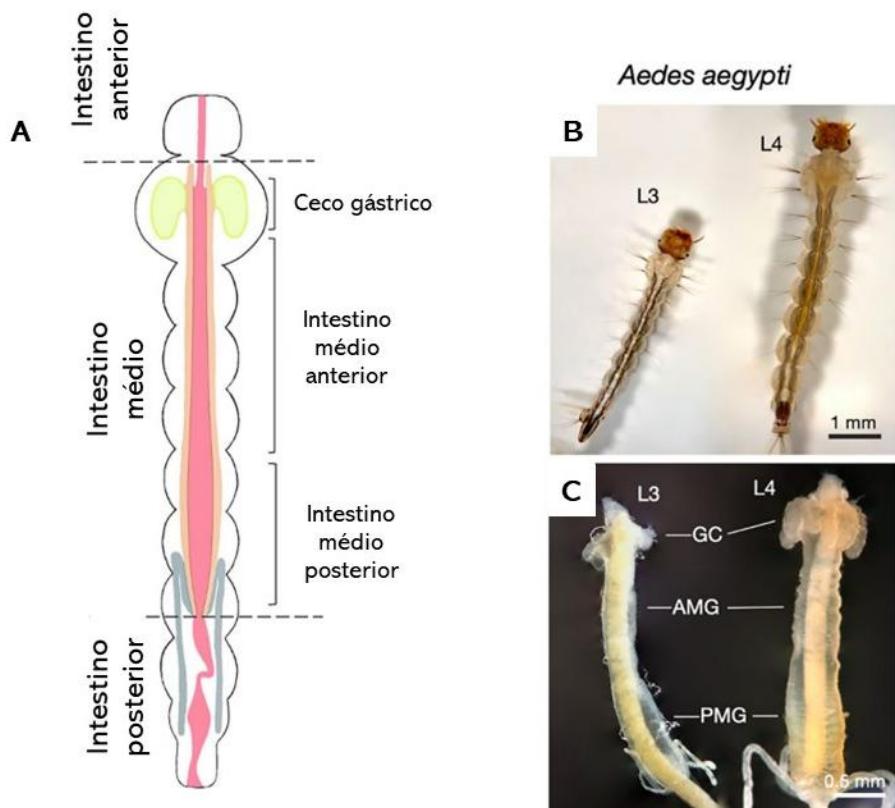
A interdependência entre estágios ressalta como a nutrição em *Ae. aegypti* deve ser compreendida como um processo integrado, que conecta o ambiente aquático inicial às demandas metabólicas e reprodutivas da fase terrestre. Essa perspectiva integrada evidencia que alterações no aporte nutricional em um estágio reverberam nos subsequentes, afetando parâmetros vitais como sobrevivência, fecundidade e capacidade vetorial, como visto no capítulo anterior. Assim, compreender esses vínculos é essencial não apenas para a biologia da espécie, mas também para estratégias de manejo e controle do vetor.

## **7.2 Digestão e absorção de nutrientes em *Aedes aegypti*: diferenças entre larvas e adultos**

O trato digestivo de *Ae. aegypti* apresenta divisão anatômica em intestino anterior, médio e posterior, sendo o intestino médio o principal local de digestão e absorção em larvas e adultos (Clements, 2011). Trabalhos mais recentes fazem a divisão do intestino médio em intestino médio anterior e intestino médio posterior dada sua grande extensão (Figura 10) (Godoy et al., 2023). Apesar da semelhança estrutural básica, as demandas fisiológicas variam entre as fases, refletindo as diferentes dietas: larvas consomem matéria orgânica suspensa no ambiente aquático, enquanto adultos, especialmente as fêmeas, especializam-se na hematofagia. Essa diferença dietética determina tanto a composição enzimática secretada quanto a morfologia funcional do epitélio intestinal (Clements, 2011; Lehane, 1997).

Nas larvas, o epitélio do intestino médio é adaptado para digestão extracelular de detritos e microrganismos presentes no ambiente aquático. A presença de células colunares com microvilosidades densas permite maior superfície de absorção de proteínas, carboidratos e lipídios oriundos da dieta variada, enquanto a matriz peritrófica regula a passagem de partículas maiores e protege o epitélio contra abrasão (Hegedus et al., 2009). Já nos adultos, o epitélio sofre remodelação após a metamorfose, tornando-se especializado na digestão de sangue, com

grande expansão do retículo endoplasmático rugoso nos enterócitos e secreção rápida de proteases após a refeição (Hecker, 1977). Essa transição evidencia a plasticidade do intestino médio de *Ae. aegypti* frente às exigências nutricionais de cada fase.



**Figura 10. Esquema representativo do trato digestivo de larvas de mosquitos.** Em (A), um desenho esquemático representando o trato digestivo. Em (B), larvas de *Aedes aegypti*. Em (C), intestinos dissecados de larvas evidenciando o ceco gástrico (GC), o intestino médio anterior (AMG) e o intestino médio posterior (PMG). Adaptado de Godoy e colaboradores (2023).

Embora em ambas as fases o intestino médio seja o principal sítio de absorção, os mecanismos de transporte refletem necessidades distintas. Nas larvas, transportadores de aminoácidos e carboidratos sustentam o rápido crescimento corporal e o acúmulo de reservas energéticas, essenciais para a metamorfose (Nation, 2016). Nos adultos, especialmente após a refeição sanguínea, predominam transportadores de aminoácidos, além da ativação de vias específicas para lipídios, com a lipoforinas transportando triacilgliceróis na hemolinfa, em contraste com a predominância de diacilgliceróis em outros insetos (Arrese et al., 2001). Assim,

embora compartilhem estratégias básicas de absorção, larvas e adultos divergem quanto às moléculas priorizadas em cada estágio. Outro ponto de semelhança é a função da matriz peritrófica, onde tanto nas larvas quanto nos adultos, ela atua como barreira seletiva e protetora, contudo, nos adultos seu papel ganha relevância na digestão sanguínea por reter produtos da hemoglobina e reduzir a toxicidade associada a heme (Hegedus et al., 2009). Essa diferença funcional reflete a adaptação específica dos mosquitos hematófagos em comparação ao estágio larval filtrador.

A interação com a microbiota é um fator determinante. Nas larvas, o microbioma intestinal contribui para a digestão de compostos vegetais e a obtenção de vitaminas (Coon et al., 2014). Já nos adultos, a microbiota se expande após a ingestão de sangue, favorecendo a lise de eritrócitos e acelerando a digestão proteica, além de influenciar a fecundidade (Gaio et al., 2011). Assim, enquanto em larvas o microbioma sustenta a nutrição geral, nos adultos ele se integra diretamente ao sucesso reprodutivo. Além de tudo isso, o intestino médio atua como barreira imunológica em ambas as fases, mas com funções diferenciadas. Nas larvas, ele limita a invasão de microrganismos ambientais potencialmente patogênicos, garantindo a sobrevivência em habitats ricos em matéria orgânica (Jagadeshwaran et al., 2009). Nos adultos, além da proteção contra bactérias, o intestino médio representa o primeiro ponto de contato com arbovírus como dengue, Zika, Chikungunya e Mayaro, funcionando como barreira permissiva ou refratária à infecção (Sim; Jupatanakul; Dimopoulos, 2014). Dessa forma, enquanto a função larval está ligada à defesa contra patógenos ambientais, a função adulta associa-se diretamente à suscetibilidade vetorial.

O percurso do alimento no trato digestivo de *Ae. aegypti*, desde a ingestão até a distribuição pela hemolinfa, apresenta bases estruturais semelhantes entre larvas e adultos, mas revela diferenças profundas em termos de fisiologia, metabolismo e integração com a microbiota e patógenos. Enquanto as larvas priorizam a absorção de carboidratos e aminoácidos para sustentar o crescimento rápido e a metamorfose, os adultos, sobretudo as fêmeas hematófagas, direcionam a utilização de aminoácidos derivados do sangue para a produção de vitelogenina e mobilizam lipídios, transportados por lipoforinas, para a maturação ovariana. Essas particularidades refletem as exigências adaptativas de cada fase do ciclo de vida e explicam, em grande parte, o sucesso desse mosquito como vetor de importância médica.

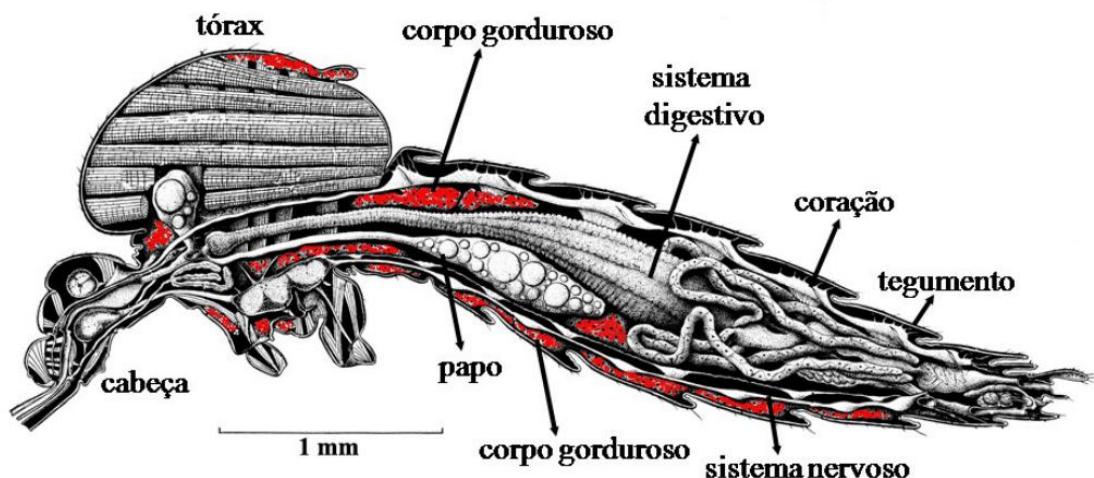
### **7.3 O corpo gorduroso como centro integrador do metabolismo em insetos**

O corpo gorduroso é um órgão multifuncional central na fisiologia dos insetos, desempenhando papéis fundamentais na regulação da homeostase. Atua como principal órgão de armazenamento lipídico e de síntese de metabólitos intermediários, liberando na hemolinfa precursores essenciais para reprodução, locomoção e outros processos fisiológicos (Gondim et al., 2018; Nation, 2016; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Van Handel, 1965; Wigglesworth, 1942). Além disso, exerce papel ativo no sistema imunológico, por meio da produção de peptídeos antimicrobianos, e na resistência a inseticidas e moléculas tóxicas (Azeez; Meintjes; Chamunorwa, 2014; Hu et al., 2016). Esse caráter multifuncional, que inclui ainda a produção de hormônios como a 20-hidroxiecdisona (20E) e fatores de crescimento (IDGFs, ADGFs), frequentemente leva à comparação com o fígado e o tecido adiposo dos vertebrados (Chapman, 2013; Lord; Brown, 2012; Nation, 2016; Søndergaard, 1993; Wigglesworth, 1942; Yafei; Yongmei, 2015).

Os metabólitos adquiridos a partir da alimentação são direcionados ao corpo gorduroso, que exerce funções equivalentes a fígado e tecido adiposo, mas adaptadas ao ciclo de vida holometábolo (Wigglesworth, 1942). Esse tecido é de origem mesodérmica e ocupa grande parte da cavidade interna do inseto, formado por três tipos celulares: trofócitos, uratócitos e oenócitos. Os trofócitos predominam e concentram as principais reservas energéticas; os uratócitos estão envolvidos no metabolismo do nitrogênio; e os oenócitos apresentam papel central na regulação lipídica (Arrese; Soulages, 2010). Essa diversidade celular permite integrar funções de armazenamento, detoxificação, metabolismo endócrino e imunidade, consolidando o corpo gorduroso como verdadeiro “órgão central” da fisiologia dos insetos (Canavoso et al., 2001).

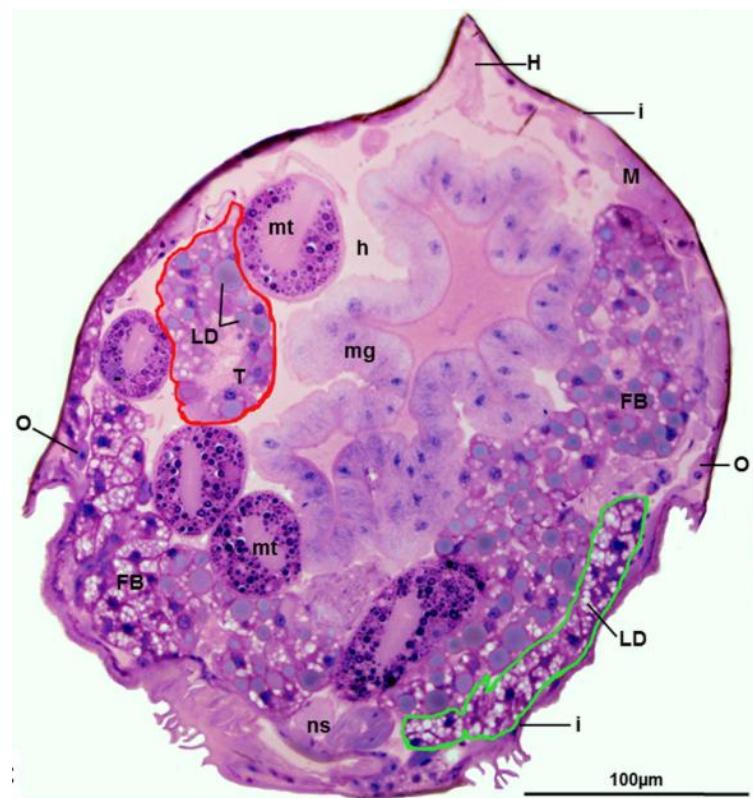
Morfologicamente, o corpo gorduroso apresenta-se como um tecido esbranquiçado distribuído por todo o corpo, atuando como tecido conjuntivo, mas concentrado principalmente no abdome (Assis et al., 2014; Nation, 2016; Roma; Bueno; Camargo-Mathias, 2010). Divide-se em dois tipos: periférico, localizado sob o tegumento e associado ao sistema muscular; e perivisceral, distribuído ao redor de órgãos, especialmente na região posterior do trato digestivo (Figura 11) (Assis et al., 2014; Chapman, 2013; Martins, 2008; Roma; Bueno; Camargo-Mathias, 2010; Turgay-İzzetoğlu; Gülmez, 2019). Em *A. aegypti*, ambas as formas ocorrem na fase larval, mas apenas a periférica permanece visível nos adultos (Martins; Pimenta, 2008; Martins, 2008). Alterações conformacionais acompanham mudanças fisiológicas: dietas ricas

em açúcar podem induzir hipertrofia, enquanto a ingestão de sangue leva ao achatamento do órgão devido à expansão intestinal (Martins; Pimenta, 2008).



**Figura 11. O corpo gorduroso em um esquema anatômico do mosquito *Aedes aegypti*.** Em vermelho a localização do corpo gorduroso é evidenciada. Retirado de Martins (2008).

Na Figura 12 observa-se um corte histológico transversal do abdome de *Lutzomyia longipalpis* alimentada com dieta açucarada, evidenciando a distribuição do corpo gorduroso. O tecido aparece organizado em duas porções distintas: o corpo gorduroso perivisceral, indicado em vermelho, localizado em torno dos órgãos internos, e o periférico, assinalado em verde, situado próximo ao tegumento. Em ambos, é possível identificar trofócitos contendo abundantes gotículas lipídicas, confirmando a função do corpo gorduroso como principal órgão de armazenamento de energia. Além disso, o corte permite visualizar estruturas associadas à fisiologia abdominal, incluindo a hemocele, o coração, o tegumento, a musculatura, o intestino médio, os túbulos de Malpighi, o sistema nervoso, bem como a presença de oenóцитos (o) e ovários. Essa organização reforça a importância do corpo gorduroso na integração metabólica e no suporte fisiológico dos dípteros, conforme descrito por Assis e colaboradores (2014).



**Figura 12. Corte histológico transversal do abdome de *Lutzomyia longipalpis* alimentada com açúcar.** O corte foi corado com hematoxilina e eosina evidenciando a distribuição do corpo gorduroso. Os lobos corpo gorduroso (FB) perivisceral (circulado em vermelho) e o periférico (circulado em verde) estão indicados. Trofócitos (T) no FB aparecem ricos em gotículas de lipídios (LD). h, hemocele; H, coração; i, tegumento; M, músculo; mg, intestino médio; mt, túbulos de malpighi; ns, sistema nervoso; o, oenócitos; Ov, ovário. Retirado de Assis e colaboradores (2014).

A estrutura celular inclui trofócitos, oenócitos e, em insetos em geral, uratócitos, porém, nos mosquitos, apenas os dois primeiros são predominantes (Canavoso et al., 2001; Johnson; Butterworth, 1985). Os trofócitos, que representam cerca de 91–94% das células, concentram lipídios, açúcares, proteínas e precursores de vitelo, apresentando mitocôndrias abundantes, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos (Arrese; Soulages, 2010; Martins et al., 2011b, 2011c). Após o repasto sanguíneo, observa-se enriquecimento citoplasmático em organelas associadas ao metabolismo energético, processo crítico para vitelogênese (Assis et al., 2014). Já os oenócitos, menos abundantes, destacam-se por vacúolos digestivos, mitocôndrias densas e retículo endoplasmático liso desenvolvido, desempenhando

funções de defesa inata, lipogênese, detoxificação e produção de hormônios esteroides como  $\alpha$ -e  $\beta$ -ecdisona (Martins et al., 2011a, 2011d; Roma; Bueno; Camargo-Mathias, 2010; Ruvolo; Landim, 1993; Tzou; De Gregorio; Lemaitre, 2002).

No metabolismo energético, o corpo gorduroso atua como reservatório dinâmico de lipídios e carboidratos. Em relação aos lipídios, a estocagem ocorre principalmente sob a forma de triacilgliceróis (TAG) em gotículas lipídicas, representando mais de 90% das reservas energéticas (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Zimmermann et al., 2009). A mobilização dessas reservas depende da ação das lipoforinas, lipoproteínas de alta densidade que transportam lipídios de forma eficiente na hemolinfa, sem degradação completa da partícula (Canavoso et al., 2001; Gondim et al., 2018; Horne; Haritos; Oakeshott, 2009; Van der Horst et al., 2002). Após a refeição sanguínea, a captação de ácidos graxos pelo corpo gorduroso e sua rápida transferência aos ovários são cruciais para a vitelogênese e o ciclo gonotrófico (Ziegler; Ibrahim, 2001).

Os carboidratos também têm papel central no metabolismo energético, onde a glicose e a frutose absorvidas no intestino são convertidas em trealose no corpo gorduroso pela ação da trealose-6-fosfato sintase e liberadas na hemolinfa como principal fonte de energia circulante (Becker et al., 1996). A trealose sustenta a intensa atividade muscular durante o voo, sendo hidrolisada em glicose por trealases nos tecidos-alvo (Veenstra, 1989). O corpo gorduroso também acumula glicogênio, mobilizado em períodos de jejum para complementar as reservas lipídicas (Murphy; Wyatt, 1965).

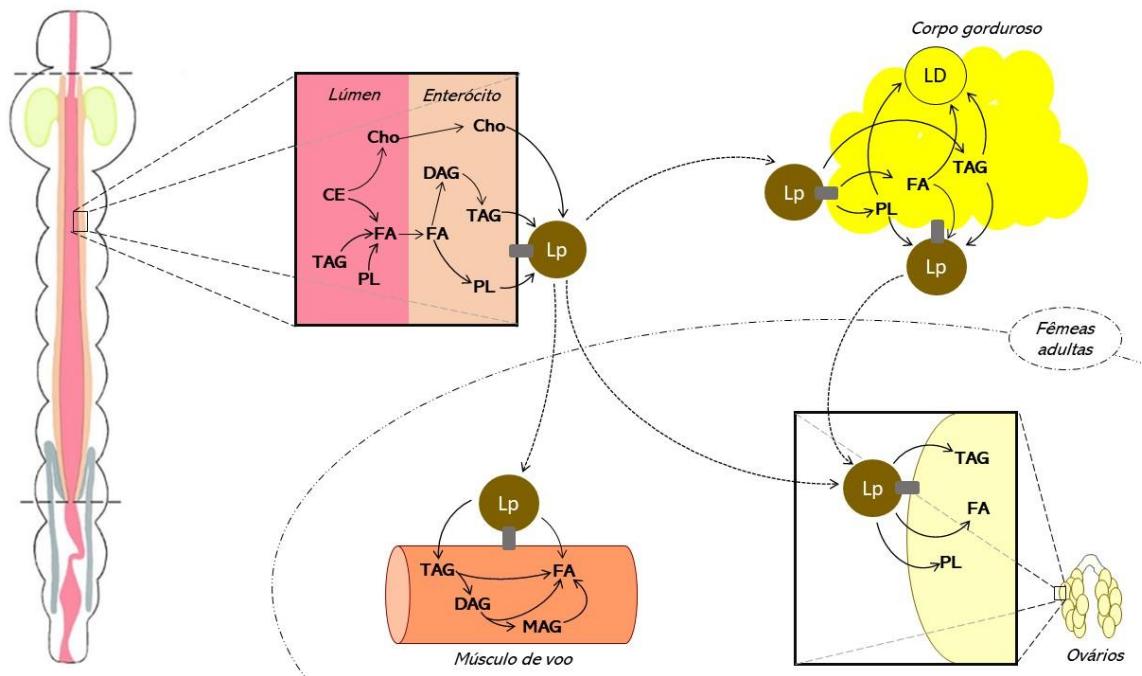
A integração metabólica é finamente regulada por hormônios, incluindo os peptídeos semelhantes à insulina (ILPs) e o hormônio juvenil (JH), que modulam tanto a síntese quanto a mobilização de reservas (Raikhel; Dhadialla, 1992). Em *Ae. aegypti*, tais vias sinalizadoras são críticas por conectar o estado nutricional à reprodução, garantindo a alocação eficiente da energia do repasto sanguíneo para a produção de ovos (Attardo; Hansen; Raikhel, 2005).

Assim, o corpo gorduroso em *Ae. aegypti* consolida-se como centro integrador do metabolismo, recebendo e redistribuindo nutrientes de acordo com as demandas fisiológicas e ecológicas. Lipídios e carboidratos, em particular, representam reservas energéticas estratégicas, sustentando desde o voo até a vitelogênese, reforçando o papel essencial desse tecido para a sobrevivência e sucesso reprodutivo do inseto.

## **7.4 Metabolismo de lipídios em insetos**

Os lipídios são essenciais para a manutenção das funções regulares do metabolismo dos insetos, uma vez que estão envolvidos na embriogênese, crescimento, desenvolvimento, metamorfose, diapausa, reprodução, voo prolongado e sobrevivência durante o inverno e períodos de escassez de alimentos (Arrese; Soulages, 2010; Gondim et al., 2018). A ingestão e o processamento de nutrientes são fundamentais para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção da homeostase em organismos vivos (Shi & Burn, 2004). Entre esses nutrientes, os lipídios constituem fontes energéticas altamente densas, podendo ser ingeridos na forma de TAG, fosfolipídios, ésteres de colesterol e ácidos graxos livres (FA). Antes de sua absorção, contudo, passam por transformações catalisadas por lipases digestivas. Em insetos, enzimas lipolíticas foram identificadas na região anterior do intestino médio e associadas à matriz peritrófica (Dow, 1987; Toprak et al., 2008), hidrolisando TAG, diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG) e fosfolipídios em ácidos graxos, glicerol e outros intermediários (Terra; Ferreira, 1994). As enzimas que catalisam essa hidrólise são classificadas como lipases que compartilham a tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu característica de hidrolases (Horne; Haritos; Oakeshott, 2009; Pirahanchi; Sharma, 2019), outros estudos mostram que a digestão lipídica em insetos envolve principalmente lipases neutras, fosfolipases e colesterol esterases (Carriere et al., 1993; Toprak, 2020).

Os produtos finais da digestão lipídica incluem ácidos graxos, glicerol e colesterol não esterificado (Gondim, 2018). Esses metabólitos são absorvidos por enterócitos no intestino médio, como demonstrado em *D. melanogaster*, com participação de proteínas transportadoras de ácidos graxos (Esteves; Ehrlich, 2006; Holtof et al., 2019). Uma vez internalizados, os ácidos graxos podem ser oxidados em mitocôndrias para geração imediata de energia, utilizados para síntese de novos lipídios complexos ou transportados para outros tecidos. As lipoforinas circulantes distribuem energia para tecidos ativos, como músculos durante o voo, e também direcionam lipídios para estocagem no corpo gorduroso na forma de TAG (Figura 13) (Arrese; Soulages, 2010; Gondim et al., 2018).



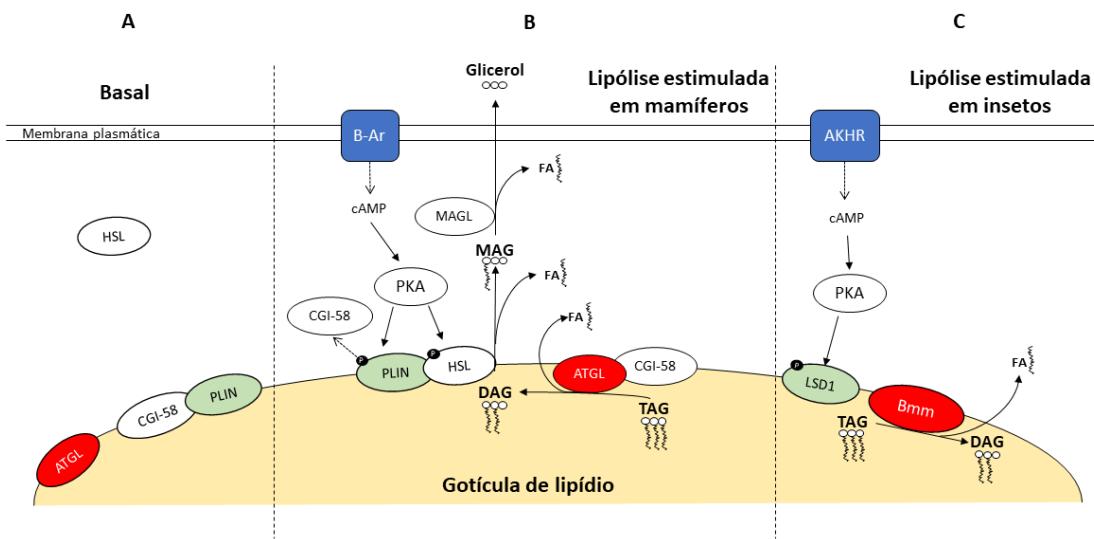
**Figura 13. Transporte de lipídios via lipoforinas.** Em destaque a absorção de triacilglicerol (TAG), fosfolipídios (PL), éster de colesterol (CE), colesterol (Cho) e ácidos graxos (FA) do lúmen intestinal, nos enterócitos TAG, PL e CE são sintetizados para serem transportados por lipoforinas (Lp) que distribui esses lipídios para diferentes lipídios. No corpo gorduroso os lipídios são estocados em gotículas lipídicas (LD). Adaptada de Gondim e colaboradores (2018).

O metabolismo lipídico em mosquitos reflete a plasticidade alimentar ao longo do ciclo de vida. Durante o estágio larval, a dieta é baseada em detritos orgânicos presentes no ambiente aquático, com relatos de canibalismo em situações de escassez (Beserra; Fernandes; Ribeiro, 2009). Já os adultos apresentam hábitos distintos: ambos os sexos ingerem carboidratos de fontes vegetais, enquanto as fêmeas necessitam do sangue para sustentar a vitelogênese (Arrese; Soulages, 2010; Gondim et al., 2018). Açúcares simples, como glicose e frutose, absorvidos no intestino após hidrólise por carboidrases (Chapman, 2013; Grossman et al., 1997), podem ser oxidados ou convertidos em lipídios e armazenados como TAG no corpo gorduroso (Van Handel, 1965; Ziegler; Ibrahim, 2001). Esse processo depende de transportadores de glicose do tipo GLUT e SGLT (Meyer; Vitavská; Wieczorek, 2011), além de enzimas lipogênicas como acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase. Já os aminoácidos resultantes da digestão de proteínas do sangue são desviados para vias anabólicas, sendo substratos para a síntese de

lipídios *de novo*, reforçando a conexão entre dieta proteica e lipogênese (Borovsky, 2003; Holtof et al., 2019; Venancio et al., 2009).

A mobilização de TAG em insetos depende da ativação de cascatas de sinalização reguladas pelo hormônio adipocinético (AKH), que atua via receptores acoplados à proteína G promovendo o aumento de AMPc e a subsequente ativação da proteína quinase A (PKA) (Lu et al., 2018). A PKA fosforila proteínas associadas às gotículas lipídicas, como LSD-1, que controlam o acesso das lipases ao substrato (Toprak, 2020). A lipase brummer (bmm), ortóloga da *adipose triglyceride lipase* (ATGL) de mamíferos, desempenha papel essencial na hidrólise de TAG, sendo regulada tanto por fosforilação como por proteínas coativadoras semelhantes à CGI-58 (Grönke et al., 2005; Walther; Farese, 2009). Estudos recentes em *Ae. aegypti* demonstram que a expressão de bmm varia conforme o estágio de desenvolvimento (mais alta em larvas tardias e pupas) e que em adultos submetidos ao jejum a expressão de bmm correlaciona com a redução nos níveis de TAG, evidenciando sua participação funcional na mobilização lipídica quando há escassez de alimento (Dos Santos et al., 2024). Em mamíferos, a cascata lipolítica é desencadeada principalmente por catecolaminas que ativam receptores  $\beta$ -adrenérgicos, resultando em um mecanismo análogo de ativação de PKA, porém, envolvendo lipases distintas, como ATGL, lipase hormônio sensível (HSL) e monoacilglicerol lipase (MGL) (Duncan et al., 2007; Zechner et al., 2009). Esse paralelismo funcional entre insetos e mamíferos sugere uma conservação evolutiva do controle hormonal da lipólise.

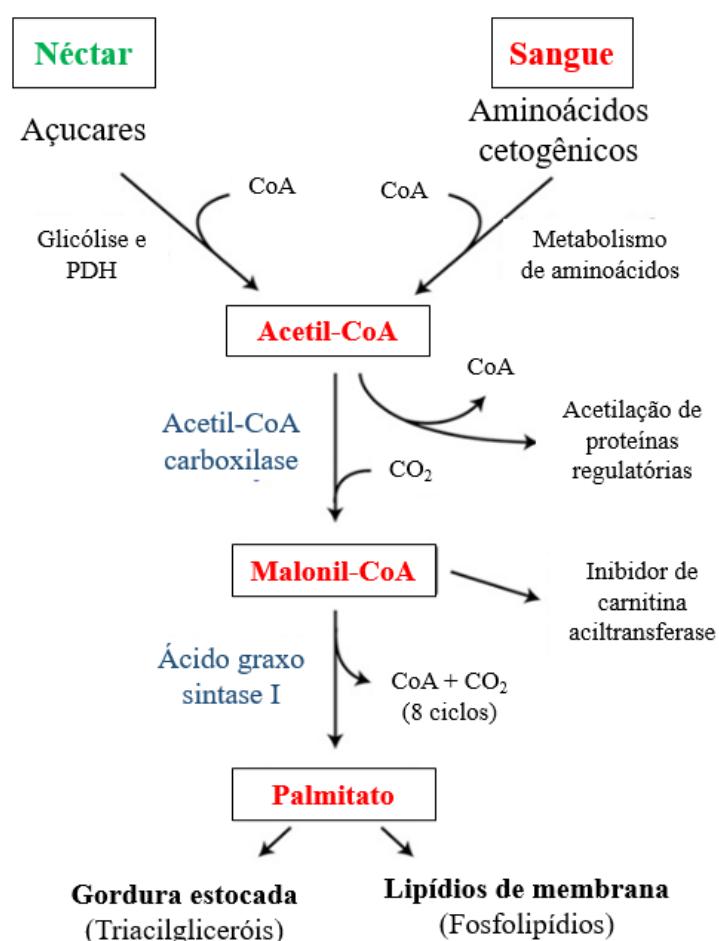
Após a formação de diacilglicerol (DAG) por ação da ATGL, a sequência lipolítica é similar entre insetos e mamíferos. Em vertebrados, a HSL atua sobre DAG, convertendo-o em monoacilglicerol (MAG), que por sua vez é hidrolisado pela monoacilglicerol lipase (MGL), liberando ácidos graxos livres e glicerol (Figura 14) (Lass et al., 2006; Zechner et al., 2009). Nos insetos, evidências sugerem a presença de lipases neutras capazes de realizar a hidrólise de DAG, desempenhando função análoga à de HSL em mamíferos (Canavoso et al., 2001; Toprak, 2020). Os ácidos graxos liberados nesse processo podem ser direcionados para  $\beta$ -oxidação mitocondrial, gerando acetil-CoA que alimenta o ciclo do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons, resultando na produção de ATP (Arrese; Soulages, 2010; Nässel; Zandawala, 2019). Esse suprimento energético é particularmente crítico durante voo sustentado e processos reprodutivos em mosquitos, nos quais a mobilização lipídica atua como principal via de suporte metabólico (Dos Santos et al., 2024).



**Figura 14. Lipólise comparada de mamíferos e insetos.** Em A há a representação do estado onde não há a estimulação da lipólise, em B há a ocorrência do mecanismo lipolítico descrito em mamíferos e em C há a representação do que já é documentado sobre lipólise em insetos. Proteínas representadas em vermelho representam proteínas homólogas entre si com atividade de TAG lipase. Proteínas representadas em verde representam proteínas com atividade relacionada ao estoque de TAG. As formas em azul representam os hormônios receptores que regulam o metabolismo. HSL, Lipase Hormônio Sensível; Plin, Perilipina; CGI-58, Gene Comparativo de Identificação 58; ATGL, Lipase Triglycerídica Adiposa; MAGL, Monoacilglicerol lipase; PKA, Proteína quinase A; FA, Ácido graxo; TAG, Triacilglicerol; DAG, Diacilglicerol; MAG, Monoacilglicerol; cAMP, Adenosina Monofosfato Cíclica; Bmm, Brummer; Lsd1, Lipid storage droplet 1; AKHR, Receptor do Hormônio Adipocinético. Adaptado de (Lord; Brown, 2012).

Após períodos de abundância nutricional, como após uma refeição sanguínea, o corpo gorduroso de insetos hematófagos direciona seu metabolismo para a síntese de lipídios *de novo*, acumulando principalmente triacilgliceróis que servirão de reserva energética para processos vitais como reprodução e voo (Arrese; Soulages, 2010; Gondim et al., 2018; Saraiva et al., 2021). Em *Rhodnius prolixus*, esse processo é bem caracterizado e envolve aumento da atividade de acetil-CoA carboxilase (ACC), essencial para a formação de malonil-CoA, e cuja redução compromete a lipogênese e a capacidade reprodutiva (Moraes et al., 2022). Em mosquitos, particularmente em *Ae. aegypti*, a ácido graxo sintase (FAS) apresentou expressão elevada em fêmeas adultas, sendo FAS1 a isoforma predominante na lipogênese, e sua redução

está associada a prejuízos no acúmulo de lipídios e no sucesso reprodutivo (Chotiwan et al., 2022). Além disso, estudos de nutrição mostram que dietas ricas em carboidratos durante a fase larval elevam a ocorrência de ILPs e aumentam a eficiência de conversão de açúcares em lipídios no corpo gorduroso de adultos, evidenciando que a qualidade nutricional precoce afeta diretamente a capacidade de síntese lipídica em fases posteriores (Pooraiouby et al., 2018). Essa plasticidade metabólica garante a rápida reposição das reservas lipídicas após períodos de mobilização, sustentando a demanda energética necessária para a reprodução e a manutenção da homeostase.



**Figura 15. Lipogênese.** A figura representa um esquema da síntese lipídica mediada pela acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase I. Adaptado de Alabaster e colaboradores (2011).

### 7.5 Metabolismo de carboidratos em insetos

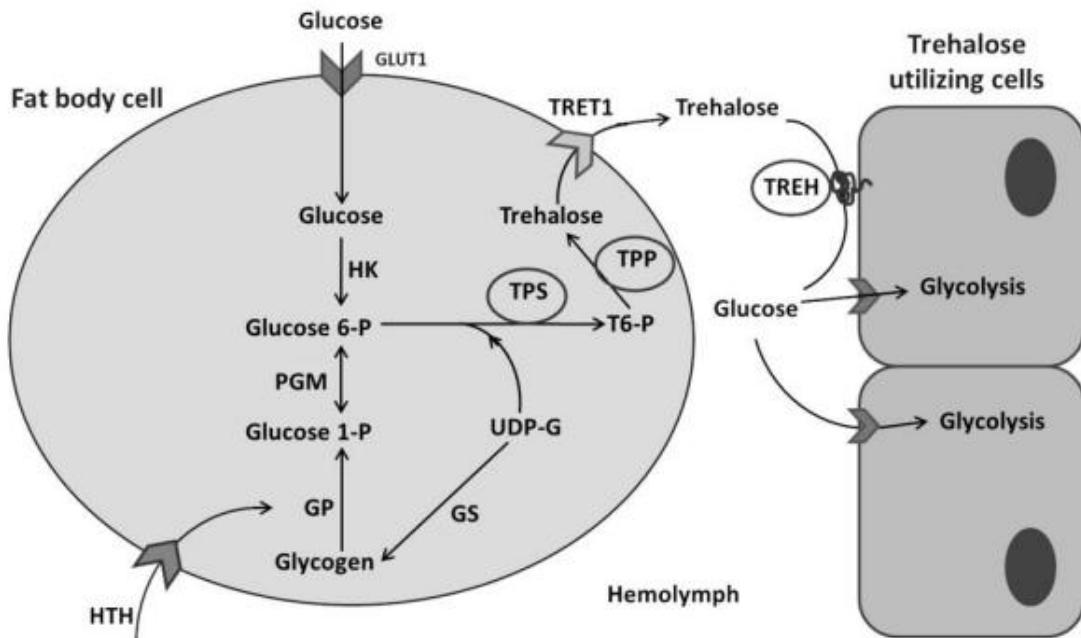
Os carboidratos representam uma classe de biomoléculas essenciais, cuja principal função é fornecer energia rápida e servir como matéria-prima para processos biossintéticos

fundamentais (Berg et al., 2019). Em insetos, esses compostos podem ser armazenados sob a forma de polissacarídeos, como o glicogênio, ou circular no hemolinfa como açúcares livres, principalmente glicose e trealose (Thompson, 2003; Wyatt; Loughheed; Wyatt, 1956). O glicogênio funciona como uma reserva de médio prazo, acumulada principalmente no corpo gorduroso, enquanto a trealose atua como açúcar não redutor predominante no hemolinfa, desempenhando papel central na manutenção da homeostase energética e na proteção contra estresses ambientais (Becker et al., 1996; Thompson, 2003). Dessa forma, os carboidratos fornecem uma base metabólica flexível, capaz de sustentar tanto processos contínuos de manutenção quanto respostas adaptativas rápidas a diferentes condições fisiológicas e ambientais.

A glicose livre constitui a forma mais imediata de carboidrato nos insetos, atuando como substrato essencial para a glicólise e o ciclo do ácido cítrico. Sua concentração na hemolinfa é normalmente baixa devido ao controle osmótico e à rápida conversão em trealose no corpo gorduroso (Arrese; Soulages, 2010; Becker et al., 1996). Experimentos em *D. melanogaster* mostraram que a manipulação de transportadores de glicose (GLUT-like) afeta o crescimento larval e o balanço energético, evidenciando a importância desse açúcar mesmo em pequenas concentrações (Dus; Ai; Suh, 2013). Em mosquitos, incluindo *Ae. aegypti*, a glicose é rapidamente desviada para a síntese de trealose ou glicogênio, desempenhando papel transitório antes de ser estabilizada em formas mais seguras de armazenamento (Wyatt; Loughheed; Wyatt, 1956).

A trealose representa a principal forma de carboidrato circulante em insetos, atingindo concentrações na hemolinfa até 200 vezes maiores do que a glicose (Thompson, 2003). Formada por duas moléculas de glicose ligadas, sua síntese ocorre no corpo gorduroso a partir da trealose-6-fosfato sintetase (TPS) e da trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (Figura 16) (Shukla et al., 2015). O silenciamento gênico em *Nilaparvata lugens* demonstrou que a inibição de TPS reduz significativamente os níveis de trealose circulante, comprometendo a sobrevivência pós-emergência e a resistência ao estresse oxidativo (Yang et al., 2017). A mobilização desse dissacarídeo é catalisada pela trealase, enzima que hidrolisa a trealose em duas moléculas de glicose, rapidamente utilizadas em tecidos metabolicamente ativos, como o músculo durante o voo ou o epitélio intestinal em condições de infecção viral (Shukla et al., 2015). Além do papel energético, a trealose confere proteção estrutural a proteínas e membranas em estados de

dessecação, sendo considerada uma molécula chave para a tolerância a estresses ambientais (Elbein et al., 2003).



**Figura 16. Modelo esquemático da biossíntese e hidrólise do glicogênio e trealose.** HK: Hexoquinase, PGM: Fosfoglicomutase, GP: Glicogênio fosforilase, GS: Glicogênio sintase, TPS: Trealose 6-fosfato sintase. TPP: Trealose 6-fosfato fosfatase, TREH: Trealase, HTM: Hormônio hipertrealossêmico. Retirado de Shukla e colaboradores (2015).

O glicogênio, por sua vez, é a forma predominante de armazenamento de carboidratos nos insetos, acumulando-se principalmente no corpo gorduroso, mas também em tecidos como o músculo e o epitélio intestinal (Arrese; Soulages, 2010; Murphy; Wyatt, 1965; Wigglesworth, 1942). Estruturalmente, consiste em uma rede altamente ramificada de resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, permitindo tanto estabilidade, quanto mobilização rápida. Sua degradação ocorre via glicogenólise, mediada pela glicogênio fosforilase, liberando glicose-1-fosfato que é convertida em glicose-6-fosfato e direcionada para a glicólise (Figura 16) (Gäde; Auerswald, 2003). Em *Ae. aegypti*, experimentos de restrição alimentar larval mostraram que o acúmulo reduzido de glicogênio compromete a fecundidade e a longevidade

dos adultos, evidenciando o impacto desse polímero na preparação energética para o ciclo gonotrófico (Telang; Frame; Brown, 2007). Mais recentemente, análises transcriptômicas revelaram que a infecção por arbovírus pode modular a expressão de genes relacionados à síntese e mobilização de glicogênio, reforçando a conexão entre metabolismo energético e competência vetorial (Saraiva et al., 2016).

Portanto, glicose livre, trealose e glicogênio não apenas representam diferentes formas de carboidratos, mas também refletem estratégias moleculares e fisiológicas complementares. Enquanto a glicose atua como substrato imediato e regulado de forma estrita, a trealose funciona como uma reserva circulante estável e multifuncional, e o glicogênio constitui o depósito energético de médio prazo. Essa tríade garante flexibilidade metabólica aos insetos, permitindo adaptações rápidas a mudanças ambientais, demandas energéticas extremas e desafios imunológicos.

## 7.6 Regulação hormonal e molecular do metabolismo energético em insetos

O balanço energético em insetos é mantido por mecanismos integrados que regulam o armazenamento e a mobilização de lipídios e carboidratos, garantindo a homeostase frente a variações nutricionais e fisiológicas (Arrese; Soulages, 2010). O corpo gorduroso atua como principal depósito metabólico, acumulando triacilgliceróis em gotas lipídicas e glicogênio, além de funcionar como centro de síntese e degradação de substratos (Arrese et al., 2001). A circulação de lipídios na hemolinfa é mediada por lipoforinas, que transportam diacilgliceróis de forma reversível entre órgãos de consumo e reservas de armazenamento, porém, em mosquitos ocorre na forma de triacilgliceróis (Arrese; Soulages, 2010; Ford; Van Heusden, 1994). Assim, esse tecido desempenha papel central como elo entre a ingestão alimentar e a utilização energética nos diferentes estágios do ciclo de vida.

A regulação metabólica depende de hormônios e vias de sinalização sensíveis ao estado nutricional. Hormônios peptídicos como o AKH estimulam a lipólise e a glicogenólise durante períodos de alta demanda energética, enquanto ILPs (Sieglaff; Duncan; Brown, 2005) e a via TOR favorecem o anabolismo em condições de abundância (Alves-Bezerra et al., 2016; Giulianuss et al., 2011; Lu et al., 2018). Além desses, a 20E exerce papel fundamental no redirecionamento de nutrientes após o repasto sanguíneo em *Ae. aegypti*, estimulando a mobilização de lipídios e carboidratos para sustentar a vitelogênese (Lu et al., 2018). Essa

integração entre AKH, insulina/TOR e 20E garante que as reservas energéticas sejam utilizadas de forma coordenada em função das demandas fisiológicas do ciclo reprodutivo (Roy; Hansen; Raikhel, 2007). Esse equilíbrio entre vias catabólicas e anabólicas confere ao inseto flexibilidade metabólica diante de diferentes contextos ambientais.

O controle molecular da utilização de lipídios e carboidratos também envolve fatores de transcrição e reguladores enzimáticos específicos. Homólogos do fator HNF4 em insetos induzem a expressão de genes relacionados à  $\beta$ -oxidação e à mobilização de ácidos graxos, favorecendo o uso energético em momentos de demanda elevada (Palanker et al., 2009). A homeostase de carboidratos, por sua vez, é sustentada pela regulação da trealose, principal açúcar circulante, cuja síntese e degradação são controladas por trealose-fosfato sintase e trealase (Shukla et al., 2015). Há ainda evidências de que a 20E, em conjunto com ILPs, regula indiretamente a expressão de enzimas envolvidas na mobilização de lipídios e no controle de carboidratos durante a fase reprodutiva em mosquitos (Sieglaff; Duncan; Brown, 2005). A integração dessas vias assegura que lipídios e carboidratos atuem de forma complementar, mantendo o fluxo energético constante para processos vitais do inseto.

Quando o equilíbrio entre armazenamento e mobilização é perturbado, surgem consequências significativas para a aptidão do mosquito. Alterações na expressão de lipases, receptores de hormônios ou na sinalização de insulina podem reduzir a fecundidade, a longevidade e até a competência vetorial (Arrese; Soulages, 2010; Gondim et al., 2018). Esse impacto evidencia como a regulação das reservas energéticas não apenas garante a sobrevivência individual, mas também influencia a dinâmica populacional e epidemiológica da espécie.

## 7.7 Efeitos de flavonoides sobre o metabolismo energético

Muitos flavonoides vegetais têm sido identificados como inibidores da enzima ecdisone-20-monooxigenase, que converte ecdisona em 20E, crucial para metamorfose e eventos metabólicos em insetos; entre os flavonoides com esse efeito estão queracetina, miricetina, kaempferol, apigenina e flavona, os quais inibem essa atividade em *Ae. aegypti*, larvas de *D. melanogaster* e larvas de *Man. sexta*, num regime dose-dependente (Mitchell et al., 1993). Essa inibição retarda o desenvolvimento larval ou de muda, o que altera o balanço

energético porque exige redistribuição ou mobilização de reservas energéticas para manutenção metabólica na ausência de progresso de desenvolvimento (Mitchell et al., 1993).

Além disso, há evidências de que a síntese de ácidos graxos pode ser diretamente modulada por flavonoides. Em modelos animais, diversos compostos dessa classe atuam como inibidores diretos da FAS, incluindo queracetina, morina e outros, apresentando IC<sub>50</sub> em faixa micromolar contra FAS isolada de fígado de mamíferos (Li; Tian, 2004). Esses resultados são consistentes com achados em insetos, onde a supressão experimental de FAS em *Colaphellus bowringi* comprometeu a formação de reservas lipídicas durante a preparação para diapausa, afetando também a expressão de genes de tolerância ao estresse (Tan et al., 2017). De forma semelhante, em *Ae. aegypti*, a redução experimental da atividade de ACC e FAS afetou de maneira diferencial a formação da camada externa dos ovos e a digestão do sangue, revelando que a integridade das vias lipogênicas é essencial tanto para o acúmulo quanto para a utilização de lipídios em processos reprodutivos e metabólicos (Alabaster et al., 2011). Assim, o bloqueio da síntese de ácidos graxos emerge como um mecanismo convergente pelo qual flavonoides reduzem o acúmulo de reservas energéticas.

O impacto dos flavonoides sobre a bioenergética em insetos não se restringe à lipogênese, mas também envolve alterações em enzimas mitocondriais associadas ao metabolismo energético. Em *Man. sexta*, foi demonstrado que diferentes flavonoides vegetais, incluindo morina, interferem na atividade da transidrogenase mitocondrial em intestino médio e corpo gorduroso de larvas do quinto instar, indicando que compostos dessa classe afetam diretamente o balanço redox celular e, por consequência, a utilização de substratos energéticos (Vandock; Mitchell; Fioravanti, 2012). Esses efeitos podem comprometer a eficiência de geração de NADPH, essencial para síntese de lipídios, além de diminuir a absorção de nutrientes, o que ajuda a explicar reduções de estoques lipídicos sob exposição a flavonoides.

Ainda que a maior parte da literatura sobre carboidratos em insetos sob ação de flavonoides seja limitado, estudos paralelos indicam que inibidores do crescimento, ao alterar o balanço hormonal e o metabolismo, impactam tanto reservas lipídicas quanto glicogênicas em mosquitos, sugerindo que compostos flavonoides com atividade anti-ecdisona podem gerar efeitos semelhantes (Dhadialla; Carlson; Le, 1998). Esse redirecionamento metabólico reforça a ideia de que a ação dos flavonoides em vias hormonais e enzimáticas não apenas reduz a síntese de reservas, mas também acelera sua mobilização.

Em vertebrados, achados recentes reforçam essa visão de convergência. A morina foi descrita como potente inibidor da lipase pancreática e da adipogênese em modelos celulares, reduzindo a diferenciação adipocinética e limitando o acúmulo de triglicerídeos (Venkateish; Rajamanikandan; Perumal, 2024). Nesse mesmo estudo, verificou-se que a morina modulou de forma significativa a expressão de transportadores de glicose, favorecendo a captação e utilização de glicose, o que impacta diretamente no balanço energético (Venkateish; Rajamanikandan; Perumal, 2024). Adicionalmente, observou-se redução da expressão de FAS e das proteínas da família perilipinas, responsáveis pelo revestimento e estabilidade das gotículas lipídicas, indicando que a morina não apenas diminui a lipogênese, mas também compromete a estocagem segura de lipídios em adipócitos (Venkateish; Rajamanikandan; Perumal, 2024). Além disso, em modelos de mamíferos sob dieta rica em lipídios, flavonoides como morina diminuíram o acúmulo lipídico hepático e adiposo, modulando a expressão de genes lipogênicos e aumentando a  $\beta$ -oxidação (Naowaboot; Wannasiri; Pannangpatch, 2016). Esses resultados, embora obtidos em animais distantes filogeneticamente, destacam que o potencial de flavonoides em reduzir reservas energéticas é amplamente conservado.

Em conjunto, os estudos disponíveis indicam que os flavonoides podem comprometer os estoques energéticos de insetos por múltiplas vias: (1) inibição da biossíntese de ecdisona, impactando indiretamente o metabolismo; (2) bloqueio direto de enzimas lipogênicas, como FAS; e (3) alteração do metabolismo mitocondrial, limitando a produção de cofatores essenciais para a síntese lipídica. Apesar dos avanços, ainda há lacunas substanciais, especialmente quanto à quantificação de reservas de carboidratos e à análise integrada dos efeitos desses compostos ao longo do ciclo de vida dos insetos.

## **8 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de hidrato de morina sobre o metabolismo de lipídios e carboidratos em *Ae. aegypti*, buscando compreender os impactos desse composto bioativo na regulação das reservas energéticas e na homeostase metabólica do inseto.

### **8.1 Objetivos específicos**

- Quantificar os níveis de triacilglicerol em larvas de *Aedes aegypti* expostos a diferentes concentrações de hidrato de morina;
- Avaliar possíveis alterações na expressão gênica de proteínas envolvidas com o metabolismo lipídico;
- Analisar os níveis de glicose, trealose e glicogênio em larvas sob ação o hidrato de morina;
- Investigar possíveis alterações na expressão gênica na expressão de glicogênio sintase e glicogênio fosforilase;
- Investigar se os níveis de expressão de receptores de AKH e IL modulam a ação observada
- Verificar a presença de estresse oxidativo em larvas tratadas.

## **9 MATERIAL E MÉTODOS**

### **9.1 Tratamento com hidrato de morina**

Conforme detalhado no Capítulo 1, as condições de criação larval e preparo das soluções de hidrato de morina seguiram protocolos previamente padronizados de modo a garantir a reproduutibilidade dos experimentos. Entretanto, neste capítulo é importante destacar que todos os ensaios foram conduzidos após 24 horas de exposição ao composto. Nos experimentos de quantificação de TAG e de expressão gênica por qPCR, foram utilizadas as concentrações de 0, 50, 100, 175 e 500 µM de hidrato de morina, permitindo avaliar desde efeitos subletais até concentrações mais elevadas. Por outro lado, nos ensaios de quantificação de carboidratos e de produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), foram empregadas apenas as concentrações de 0 e 175 µM, esta última escolhida por corresponder aproximadamente à CL<sub>50</sub> previamente estabelecida, assegurando a análise em um ponto crítico de resposta larval.

### **9.2 Quantificação de triacilglicerol**

Para a determinação do teor de TAG, 10 larvas previamente expostas a diferentes concentrações de hidrato de morina foram coletadas e imediatamente transferidas para microtubos de 1,5 mL previamente identificados. As amostras foram homogeneizadas em 200 µL de água destilada gelada utilizando micropistilo estéril, garantindo a ruptura celular completa e a liberação dos lipídios intracelulares. O procedimento foi conduzido em gelo para minimizar a degradação enzimática e oxidativa dos ácidos graxos durante a extração. Para aumentar a reproduutibilidade e reduzir o efeito de variações individuais, foram estabelecidas cinco réplicas biológicas independentes para cada tratamento, cada uma composta por um pool de 10 larvas.

O teor de TAG foi quantificado utilizando um kit enzimático comercial de monorreagente de triglicerídeos (Bioclin®), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Brevemente, 10 µL do homogeneizado larval foram transferidos para placas de 96 poços de fundo transparente, aos quais foram adicionados 200 µL do reagente corante fornecido no kit. A mistura foi homogeneizada por agitação suave e incubada a 37 °C por 30 minutos em estufa de microplacas, condição necessária para a hidrólise completa dos triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos, bem como para o desenvolvimento da reação colorimétrica.

Após a incubação, a absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro de microplacas (Greiner® 96 Well Clear Polystyrene), com calibração prévia do equipamento. Para a quantificação absoluta, foi construída uma curva padrão de TAG utilizando soluções de triglicerídeos de concentração conhecida, processadas nas mesmas condições experimentais que as amostras biológicas. Os valores de absorbância obtidos foram interpolados na curva padrão, permitindo a determinação da concentração de TAG nos homogeneizados larvais. Por fim, os resultados foram normalizados pela quantidade de proteínas totais pareada por réplica, possibilitando comparações diretas entre os diferentes grupos experimentais.

### 9.3 Quantificação de carboidratos

A quantificação de carboidratos foi realizada segundo protocolo adaptado de Van Handel (1985), amplamente empregado em estudos de metabolismo energético de insetos por permitir a determinação simultânea de açúcares de reserva e circulantes. Nesse ensaio, foram mensurados os teores de glicose, trealose e glicogênio. Diferentemente dos experimentos anteriores de triacilgliceróis, foi utilizada apenas a concentração correspondente à CL<sub>50</sub> do hidrato de morina (175 µM), com o objetivo de avaliar especificamente o impacto metabólico dessa dose crítica.

Cinco larvas L4 foram homogeneizadas em 130 µL de tampão PBS (10 mM, pH 7,4, contendo 150 mM de NaCl) e 90 µL de solução de sulfato de sódio a 4% (p/v). Em seguida, 20 µL do homogeneizado foram reservados para a quantificação de proteínas totais. Ao restante, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto, seguido de agitação em vórtex e centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi dividido em duas frações de 600 µL para as análises de açúcares totais e trealose, enquanto o pellet foi reservado para a dosagem de glicogênio. As amostras do sobrenadante foram processadas em um concentrador a vácuo por aproximadamente 30 minutos a 30 °C, evitando a secagem completa para não comprometer a ressuspensão. As análises foram realizadas com o reagente Antrona (150 mg de antrona, 30 mL de água destilada, 76 mL de ácido sulfúrico).

Para dosagem de glicose total, as amostras foram ressuspensas em 100 µL de etanol absoluto e processadas em paralelo com uma curva padrão de glicose. A reação foi realizada pela adição de 1 mL de reagente de antrona, seguida de incubação a 90 °C por 17 minutos em banho seco. Após o resfriamento, 250 µL de cada amostra ou padrão foram transferidos em

triplicata para microplacas de 96 poços. A absorbância foi lida a 655 nm em espectrofotômetro de microplacas.

As amostras destinadas à quantificação de trealose foram ressuspensas em 100 µL de etanol absoluto. Em seguida, foram adicionados 50 µL de HCl 1 M, com incubação a 90 °C por 7 minutos, seguida pela neutralização com 150 µL de NaOH 1 M e nova incubação nas mesmas condições. Após essa etapa, adicionou-se 1 mL do reagente de antrona, com incubação final a 90 °C por 17 minutos. Após resfriamento, 250 µL das amostras foram transferidos em triplicata para microplacas, e a leitura foi realizada a 655 nm.

O pellet proveniente da etapa inicial foi utilizado para a determinação do glicogênio. Onde, o mesmo foi ressuspenso em 100 µL de etanol absoluto. As amostras e os padrões de glicogênio foram tratados com 1 mL de reagente de antrona e incubados a 90 °C por 17 minutos. Após o resfriamento, 300 µL das amostras foram transferidos em triplicata para microplacas e a leitura foi realizada a 655 nm.

Após a execução das etapas do protocolo, a leitura espectrofotométrica foi realizada a 655 nm em espectrofotômetro de microplacas devidamente calibrado. A quantificação absoluta foi obtida por meio da interpolação dos valores de absorbância em uma curva padrão construída com soluções de glicose, trealose e glicogênio de concentrações conhecidas. Por fim, os resultados foram normalizados pela quantidade de proteínas totais pareada por réplica, possibilitando comparações diretas entre os diferentes grupos experimentais.

#### **9.4 Quantificação de proteínas totais**

Os resultados obtidos nos ensaios bioquímicos foram normalizados em relação ao teor total de proteínas presentes nas amostras, de modo a corrigir variações decorrentes do tamanho ou da massa corporal das larvas. Para essa finalidade, foi utilizado o método colorimétrico de Lowry modificado (Lowry et al., 1951), reconhecido por sua alta sensibilidade e aplicabilidade em amostras biológicas complexas.

Inicialmente, 2 µL do homogeneizado larval foram transferidos para poços de microplaca de 96 poços, aos quais foram adicionados 200 µL da solução de Lowry, conforme descrito no protocolo padrão. Essa solução promove a reação inicial de complexação entre o cobre e as ligações peptídicas das proteínas, formando um complexo estável. Em seguida, foram

adicionados 20 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) previamente diluído em água destilada, responsável pela redução dos íons fosfomolibdato e fosfotungstato, resultando na formação de um cromóforo azul característico.

As placas foram homogeneizadas por agitação suave e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos em ambiente escuro, prevenindo a fotodegradação do reagente de Folin-Ciocalteu. Após a reação, a intensidade da coloração azul foi medida por espectrofotometria em 660 nm. A quantificação absoluta foi realizada a partir de uma curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich), preparada em concentrações conhecidas e submetida às mesmas condições experimentais que as amostras biológicas.

Os valores de absorbância das amostras foram interpolados na curva padrão para calcular a concentração de proteína total em cada homogeneizado larval. Finalmente, os resultados de carboidratos e lipídios foram normalizados por esse valor de proteína, sendo expressos como ng de TAG ou carboidrato por mg de proteína, permitindo comparações consistentes entre tratamentos distintos e reduzindo a influência de variações individuais de massa larval.

## 9.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

Após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de hidrato de morina (50, 100, 175 e 500 µM), grupos de 10 larvas por condição experimental foram coletados e imediatamente homogeneizados em 1 mL de reagente TRIzol® (Invitrogen), utilizando pistilo estéril em tubos de 1,5 mL, sob condições de gelo para evitar degradação enzimática. Cada condição foi processada em quadruplicata biológica independente, assegurando robustez estatística.

A extração do RNA total foi conduzida conforme as instruções do fabricante do TRIzol®, seguindo também as recomendações do guia MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin et al., 2009). Após a fase de lise, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, com vigorosa agitação por 15 segundos, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 × g por 15 minutos a 4 °C, permitindo a separação das fases. A fase aquosa superior contendo o RNA foi cuidadosamente transferida para novos tubos, à qual foram adicionados 500 µL de

isopropanol para precipitação do RNA. Após centrifugação adicional ( $12.000 \times g$ , 10 min, 4 °C), o pellet de RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% e finalmente ressuspensionado em 30 µL de água livre de nucleases (DEPC-treated water).

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific), utilizando as razões A260/A280 e A260/A230 como indicadores de qualidade, sendo consideradas aceitáveis amostras que apresentaram valores próximos a  $2,0 \pm 0,1$ . Para a eliminação de contaminações genômicas, 1 µg de RNA total de cada amostra foi tratado com 1 U de DNase I (Sigma-Aldrich), incubado por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 50 mM de EDTA e subsequente incubação por 10 minutos a 70 °C, garantindo a inativação da enzima.

A síntese de cDNA foi realizada com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), utilizando primers random hexamers e oligo(dT) em reação de 20 µL de volume final, conforme instruções do fabricante. As reações foram conduzidas em termociclador com o seguinte perfil térmico: 25 °C por 10 minutos (anelação dos primers), 37 °C por 120 minutos (extensão da transcriptase reversa) e 85 °C por 5 minutos (inativação enzimática). O cDNA resultante foi armazenado a –20 °C até o uso em análises subsequentes de expressão gênica.

## 9.6 Quantitative PCR (qPCR)

A quantificação da expressão gênica relativa por qPCR foi realizada em um sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific), utilizando o corante intercalante Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), que permite a detecção em tempo real da amplificação dos fragmentos de DNA alvo. Os primers específicos para os genes de interesse foram selecionados com base em trabalhos previamente publicados, garantindo a especificidade e a eficiência das reações. Os primers para triacilglicerol lipase-1 (TAGL1), lipase Brummer (Bmm), lipase hormônio-sensível (HSL), diacilglicerol aciltransferase-1 (DGAT1), glicerol-3-fosfato aciltransferase-1 (GPAT1), glicogênio sintase (GS), glicogênio fosforilase (GP), receptor de hormônio adipocinético (AKHr) e receptor semelhante à insulina (ILr) foram utilizados conforme descrito por Dou e colaboradores (2022), enquanto o primer para ácido graxo sintase-1 (FAS1) foi adotado conforme (Alabaster et al., 2011).

Informações detalhadas sobre os primers estão listadas na Tabela 2, incluindo o identificador gênico no VectorBase, a sequência dos oligonucleotídeos, a eficiência de amplificação (90–110%), a inclinação da curva padrão de cDNA e o coeficiente de determinação ( $r^2 \geq 0,99$ ). Antes da execução dos ensaios, todos os primers foram testados para especificidade por análise de curva de dissociação (melting curve), confirmando a presença de um único produto de amplificação para cada reação.

As reações foram preparadas em uma placa de reação MicroAmp™ Fast Optical de 96 poços com código de barras (Applied Biosystems), utilizando volume final de 20 µL por reação, contendo 10 µL de Power SYBR™ Green Master Mix, 0,4 µL de cada primer (10 µM), 2 µL de cDNA diluído (equivalente a ~50 ng de RNA reverso-transcrito) e 7,2 µL de água livre de nucleases. O programa de ciclagem térmica adotado foi: 95 °C por 10 minutos (ativação inicial da DNA polimerase), seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (anelação e extensão), finalizando com uma curva de dissociação (65–95 °C, incremento de 0,5 °C a cada 5 s) para avaliar a especificidade da amplificação.

Controles negativos foram incluídos em todas as placas: No Template Control (NTC), para verificar a ausência de contaminação de reagentes, e No Reverse Transcriptase Control (NRT), para confirmar a ausência de DNA genômico residual nas amostras de RNA. Como genes de referência para normalização, foram utilizados actina e α-tubulina, cuja estabilidade de expressão foi previamente validada em condições experimentais semelhantes.

A análise da expressão relativa foi conduzida pelo método do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak; Schmittgen, 2001), normalizando os valores de Ct dos genes alvo em relação à média geométrica dos genes de referência. Como grupo calibrador, foi utilizada a condição controle negativo (0 µM de hidrato de morina), permitindo a comparação direta do efeito das diferentes concentrações de hidrato de morina sobre a expressão dos genes relacionados ao metabolismo de lipídios e carboidratos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica para cada amostra biológica, assegurando a confiabilidade estatística dos dados.

Tabela 2. Sequências e informações obtidas de curvas de calibração de primers usadas em qPCR

Gene (VectorBase)	Sequências	Slope	$r^2$	Eficiência (%)
<i>Actin1</i> (AAEL011197)	Forward: 5'-CGTCGTGACATCAAGGAAA-3' Reverse: 5'-GAACGATGGCTGGAAGAGAG-3'	-3.329	0.9992	99.67
<i>α-Tubulin</i> (AAEL013229)	Forward: 5'-CTGCTTCAAAATGCGTGAAT-3' Reverse: 5'-GGTCCAGATCGACGAAA-3'	-3.324	0.9983	99,93
<i>TAGLI1</i> (AAEL014553)	Forward: 5'-CATTGGGCACTTGGATTCT-3' Reverse: 5'-GGGCACTTGGTACGCATACT-3'	-3.296	0,9901	101.08
<i>Brummer</i> (AAEL011918)	Forward: 5'-TCTTCGGGTGGTGAACGAG-3' Reverse: 5'-GACGTTCTGCCGTCGTAGA-3'	-3.394	0.9909	97.08
<i>HSL</i> (AAEL005706)	Forward: 5'-ATGGAGGAGGGTTCGTAGCT-3' Reverse: 5'-CTTCTAGAGCACGCGGAAAT-3'	-3.431	0.9997	95.65
<i>FASI</i> (AAEL001194)	Forward: 5'-GAGGTCGTCCGATTGGTTTC-3' Reverse: 5'-AGGACAACCTTGCCGATGTG-3'	-3.352	0.991	98.76
<i>GPAT1</i> (AAEL007080)	Forward: 5'-AGGTTCTGAAGGCACGCTAC-3' Reverse: 5'-GGACGACGAGGATGGTTGT-3'	-3.493	0.9873	93.31
<i>DGAT1</i> (AAEL001204)	Forward: 5'-GCCGACGTTGTGCTATGAAC-3' Reverse: 5'-CATGTTGGAGAACGGGACCA-3'	-3.342	0.985	99.18
<i>AKHr</i> (AAEL011325)	Forward: 5'-GCGCGAAGTGTGAATTATAG-3' Reverse: 5'-CTTGTGTCCATCGTTGAATTGC-3'	-3.306	0.9996	100.65
<i>ILr</i> (AAEL002317)	Forward: 5'-GCGGGCAGAGTAAGATCAAG-3' Reverse: 5'-ATGTCCCGCAGTTATCGTC-3'	-3.183	0,9934	106.15

## 9.7 Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada fluorimetricamente em larvas inteiras e intestinos isolados após 24h de tratamento pelo método de oxidação utilizando Amplex Red (Sigma-Aldrich) na presença de peroxidase de rabanete (Sigma-Aldrich), conforme descrito por Votyakova & Reynolds (2004). Essa metodologia permite detectar a formação de peróxido de hidrogênio em condições experimentais próximas às fisiológicas. Para a preparação das

amostras, 10 larvas por tratamento foram homogeneizadas em 180 µL de PBS (pH 7,4) acrescido de 20 µL de coquetel de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich), sendo cada condição preparada em triplicata independente. O homogeneizado foi transferido para placas de microtitulação de 96 poços apropriadas para fluorescência, contendo a mistura de reação composta por Amplex Red (50 µM) e peroxidase de rabanete (0,1 U/mL), em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4).

Após a preparação da placa, foi realizada a primeira leitura (tempo 0 h) em leitor de microplacas multimodo, no modo fluorescência, utilizando filtro de excitação de 534 nm e filtro de emissão de 590 nm. A placa foi então mantida em ambiente protegido da luz à temperatura ambiente e, após 1 h, procedeu-se à segunda leitura nas mesmas condições experimentais. A produção de peróxido de hidrogênio foi determinada como a diferença entre a fluorescência final e inicial:  $[\Delta F = F(60\text{min}) - F(0\text{min})]$ . Por fim, os resultados foram normalizados pelo teor total de proteínas de cada amostra sendo expressos como nmol de  $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína.

## 9.8 Análise estatística

As representações gráficas e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM, assegurando a representação adequada da variabilidade entre os grupos analisados.

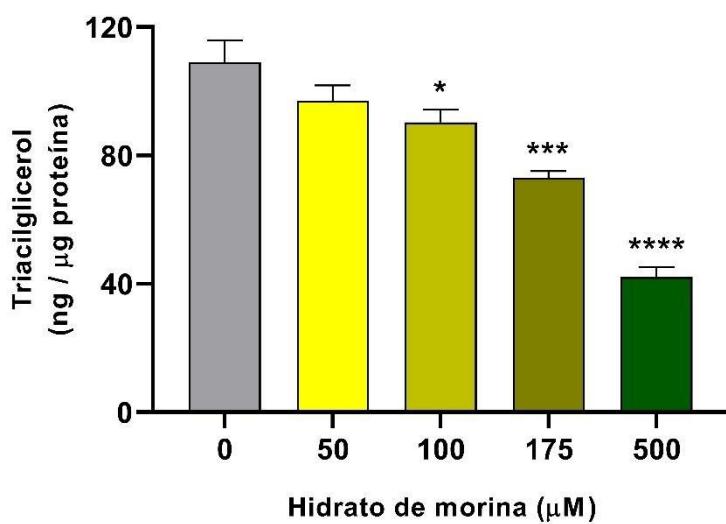
Nos ensaios de quantificação de TAG e de expressão gênica, as comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância unidirecional, seguida da aplicação dos testes de significância apropriados para detecção de diferenças entre as concentrações testadas. Já para os ensaios de quantificação de carboidratos e de produção de peróxido de hidrogênio, foi empregado o teste t de Student para comparação direta entre os grupos controle e tratado. Em todos os casos, foi considerado como critério de significância estatística um valor de  $p < 0,05$ , sendo que as diferenças observadas nos experimentos atenderam a esse critério e, portanto, foram consideradas estatisticamente significativas.

## **10 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **10.1 O impacto do hidrato de morina no metabolismo lipídico**

Déficits no metabolismo lipídico afetam de maneira crítica a fisiologia dos insetos, uma vez que os TAG constituem a principal forma de armazenamento energético e são indispensáveis para processos como o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência em condições adversas (Alabaster et al., 2011; Arrese; Soulages, 2010; Gondim et al., 2018). A regulação adequada dos estoques de TAG é, portanto, essencial para a manutenção da homeostase, permitindo o equilíbrio entre o consumo energético basal e as demandas adicionais impostas por desafios ambientais ou químicos. Nesse contexto, avaliar como esses estoques lipídicos são modulados diante da exposição ao hidrato de morina representa uma estratégia fundamental para compreender os efeitos desse flavonoide sobre o metabolismo energético de *Ae. aegypti*.

Nossos resultados demonstraram que a mobilização dos estoques de TAG acompanhou diretamente os valores de concentração letal previamente relatados no Capítulo I, evidenciando um efeito dose-dependente do hidrato de morina sobre o metabolismo larval e estão evidenciados na figura 17. A concentração de 50 µM, correspondente à CL<sub>25</sub>, não promoveu alteração significativa nos estoques de TAG em relação ao grupo controle, sugerindo que, nesse nível de exposição, a energia armazenada ainda é suficiente para sustentar a homeostase metabólica. Já em 100 µM (CL<sub>40</sub>), foi registrada uma redução em torno de 17% nos estoques lipídicos, indicando o início de uma resposta adaptativa frente ao estresse químico. Essa tendência se intensificou em 175 µM (CL<sub>50</sub>), onde a diminuição ultrapassou 33%, refletindo um impacto mais severo sobre o metabolismo energético. Por fim, em 500 µM (CL<sub>75</sub>) verificou-se a redução mais acentuada, com cerca de 61% de depleção dos estoques de TAG, o que sugere uma redução drástica das reservas energéticas para enfrentar o estresse imposto pelo composto. Esse perfil de resposta reforça a correlação entre toxicidade letal e comprometimento metabólico, indicando que a perturbação lipídica é um dos principais mecanismos associados à ação do hidrato de morina em *Ae. aegypti*.



**Figura 17. Conteúdo de triacilglicerol em larvas de *Aedes aegypti* tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.** Larvas L3 foram submetidas a um tratamento de 24 h com diferentes concentrações de hidrato de morina, e o TAG total de toda a larva foi quantificado e normalizado para proteínas totais. Os valores representam a média de quatro réplicas biológicas independentes  $\pm$  EPM ( $n = 12$ ). As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA unidirecional ( $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$  e  $****p < 0,0001$ ).

Variações no conteúdo de TAG causadas pelo estresse já foram relatadas na literatura. O estresse causado por uma alta densidade larval em *Ae. aegypti* gera um aumento na ocorrência de TAG em pupas e adultos, além de gerar um aumento no tamanho corporal de mosquitos adultos (Silva et al., 2020). Por outro lado, a supressão de uma dieta energética durante a vida adulta de mosquitos gerou uma grande redução nos estoques de TAG após 3 dias e levou à mortalidade após 7 dias (Dos Santos et al., 2024). O uso do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* causou mortalidade do besouro *Callosobruchus maculatus*, além de reduzir os níveis de TAG e ácidos graxos totais em cerca de 60%, prejudicando assim a fertilidade das fêmeas tratadas (Alves et al., 2019, 2015). Além disso, sabe-se que os lipídios são mobilizados durante a depressão imunológica como fonte de energia para a biogênese de membranas em locais de infecções e hemócitos, apoiando outras funções imunológicas em corpos adiposos (Arrese; Soulages, 2010; Wrońska et al., 2023).

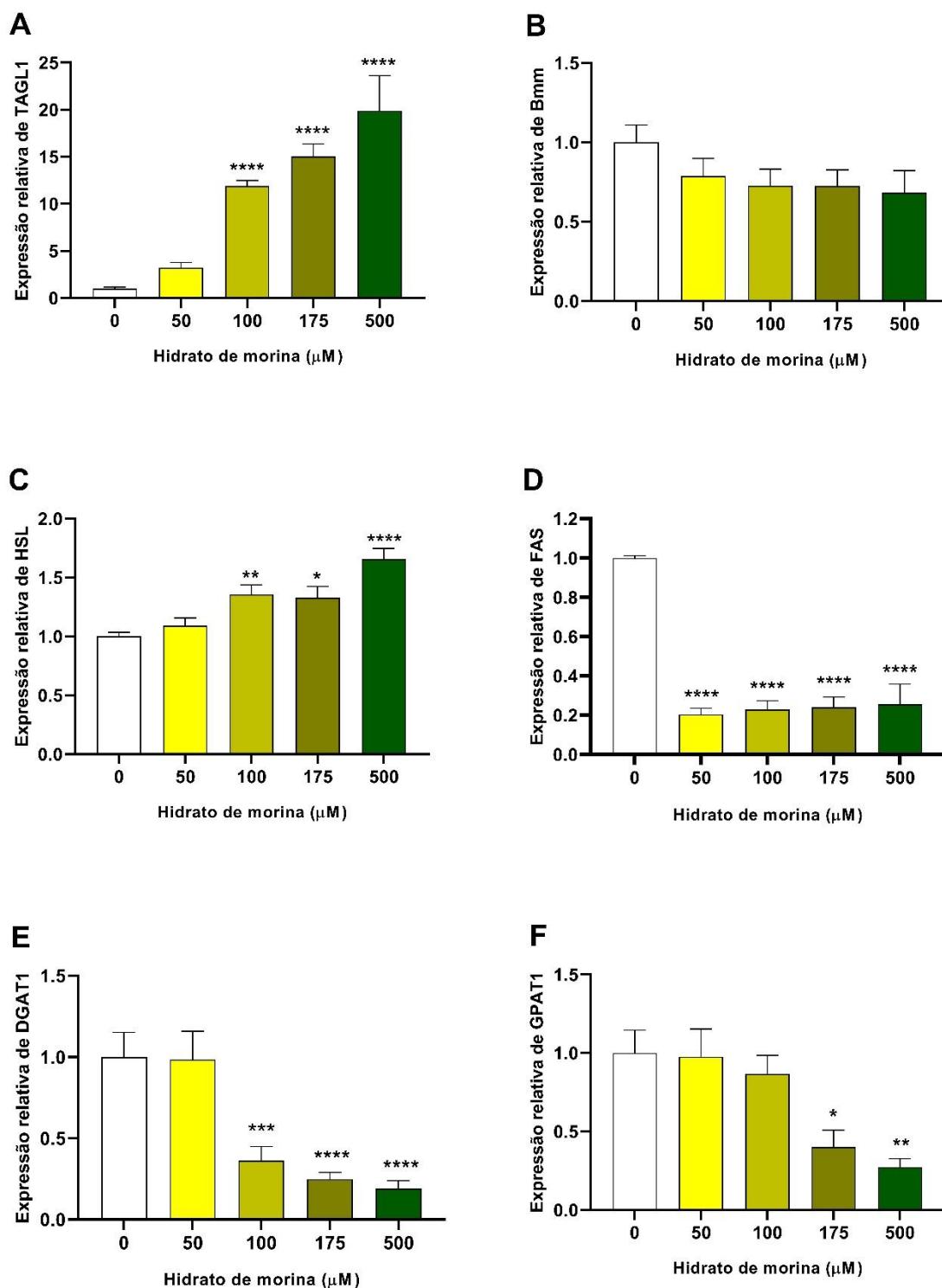
A análise das enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação dos estoques de TAG é fundamental para a elucidação de como o tratamento com hidrato de morina. Essas enzimas regulam o fluxo de lipídios dentro das células e determinam se os estoques energéticos serão acumulados, mobilizados ou redirecionados para outras vias metabólicas. Assim, investigar o funcionamento desses alvos moleculares é essencial para entender como substâncias químicas modulam o metabolismo lipídico.

Para entender a contribuição das enzimas envolvidas, os níveis de expressão de diferentes genes relacionados ao metabolismo lipídico (Figura 18) foram avaliados em larvas tratadas com hidrato de morina por 24 h. Selecionamos proteínas com ação lipolítica, entre elas: Bmm e TAGL1, ambas envolvidas na hidrólise de TAG (Dos Santos et al., 2024; Grönke et al., 2005; Heier; Kühnlein, 2018); e a HSL, que atua na degradação de DAG em resposta a estímulos hormonais (Gondim et al., 2018; Heier; Kühnlein, 2018). Além disso, foram avaliadas três enzimas associadas à síntese lipídica: FAS1, que catalisa a formação de ácidos graxos (Alabaster et al., 2011); a DGAT1, responsável pela conversão de DAG em TAG por esterificação com ácidos graxos (Heier; Kühnlein, 2018); e a GPAT1, que catalisa a etapa inicial da síntese de TAG e atua como enzima limitante da via de novo na formação de glicerofosfolipídios (Yamashita et al., 2014).

A expressão da TAGL1 manteve-se estável em larvas tratadas por 24h com 50 µM de hidrato de morina quando comparada ao grupo controle, sugerindo que concentrações mais baixas do composto não são suficientes para desencadear respostas significativas nessa via lipolítica. Contudo, em concentrações superiores a 100 µM, foi observada uma indução altamente significativa na expressão da enzima, com aumentos de aproximadamente 11 vezes em 175 µM e ultrapassando 15 vezes em 500 µM (Figura 18A). Esse padrão claro e dependente da dose indica que TAGL1 é um dos principais alvos metabólicos sob a ação do hidrato de morina, desempenhando papel essencial na mobilização de reservas energéticas.

Esses achados ganham força quando relacionados aos resultados de quantificação de triacilgliceróis (Figura 17), que demonstraram uma redução progressiva dos estoques lipídicos nas mesmas condições. A correlação direta entre a maior expressão de TAGL1 e a diminuição dos níveis de TAG reforça o papel dessa lipase como reguladora central da resposta catabólica em *Ae. aegypti*, assegurando a liberação rápida de ácidos graxos para sustentar processos metabólicos sob condições de estresse químico. Essa mobilização de TAG pode representar um

mecanismo adaptativo imediato frente à toxicidade do hidrato de morina, permitindo que as larvas tentem manter sua homeostase energética.



**Figura 18. Expressão de genes do metabolismo lipídico em larvas de *Aedes aegypti* tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.** Os níveis de expressão de triacilglicerol

lipase 1 (A), lipase de Brummer (B), lipase hormônio sensível (C), sintase de ácidos graxos (D), diacilglicerol aciltransferase 1 (E) e glicerol-3-fosfato aciltransferase (F) foram relativos aos valores de larvas a 0 µM (1,0). Os níveis de expressão foram normalizados pelos genes de referência, actinal 1 e  $\alpha$ -tubulina. Os valores são relatados como a porcentagem da expressão de pico e representam a média de quatro réplicas biológicas independentes  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). As diferenças estatísticas relativas ao controle (0 µM) foram determinadas usando ANOVA unidirecional (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Em contrapartida, a bmm, também envolvida na hidrólise de TAG, não apresentou variações significativas em nenhum dos tratamentos testados (Figura 18B). Essa ausência de resposta sugere que bmm não é sensível ao estresse agudo provocado pelo hidrato de morina, possivelmente devido ao seu papel diferenciado no metabolismo lipídico. Enquanto TAGL1 é modulada rapidamente em resposta a mudanças energéticas súbitas, bmm é tradicionalmente associada a condições de jejum prolongado ou estados nutricionais crônicos (Grönke et al., 2005, 2007).

A distinção entre os perfis de expressão de TAGL1 e bmm destaca a especificidade da resposta metabólica de *Ae. aegypti* ao hidrato de morina. A ativação expressiva da TAGL1, combinada à ausência de alterações em bmm, revela um cenário no qual diferentes lipases atuam em contextos fisiológicos distintos: a primeira regulando a homeostase energética em situações de estresse imediato, e a segunda associada a pressões crônicas relacionadas à dieta. Esses resultados não apenas elucidam a ação do hidrato de morina no metabolismo lipídico, mas também fornecem sustentação sobre a regulação diferencial de enzimas-chave na manutenção da sobrevivência larval.

A HSL apresentou um perfil de expressão distinto em comparação às demais lipases analisadas. Em 50 µM de hidrato de morina, não foram observadas diferenças em relação ao grupo controle, sugerindo que, em concentrações baixas, o composto não é capaz de elevar a expressão dessa enzima. Entretanto, em concentrações de 100 µM e 175 µM, registrou-se aumentos de aproximadamente 34%, superando 65% em 500 µM (Figura 18C). Esses resultados indicam uma ativação progressiva e dependente da dose, consistente com o papel da HSL em respostas metabólicas rápidas, sobretudo na hidrólise de DAG sob estímulo hormonal (Fredrikson; Tornqvist; Belfrage, 1986; Holm, 2003).

Do ponto de vista fisiológico, a ativação de HSL em doses mais elevadas de morina pode refletir uma adaptação metabólica crítica, na qual a mobilização de DAGs funciona como resposta compensatória ao déficit energético acentuado. Dessa forma, a HSL se mostra um componente-chave do balanço energético larval, atuando não apenas na quebra de lipídios já disponíveis, mas também na manutenção da plasticidade metabólica frente a um ambiente químico hostil que também se reflete na expressão de proteínas de síntese lipídica.

A redução de mais de 75% na expressão de FAS1 em todas as concentrações testadas é um dos achados mais marcantes deste estudo (Figura 18D). Essa enzima desempenha papel central na síntese de ácidos graxos, etapa essencial para a formação de lipídios estruturais e de reserva em insetos (Kaczmarek et al., 2024). O fato de que até mesmo a concentração de 50  $\mu$ M, que não impacta diretamente a viabilidade larval (como visto no capítulo I), já tenha causado supressão significativa, sugerindo que o FAS1 é extremamente sensível ao hidrato de morina, refletindo um bloqueio metabólico precoce. Esse padrão de resposta indica que a morina não apenas induz efeitos letais em doses altas, mas também compromete funções metabólicas em concentrações subletais, podendo afetar a aptidão de longo prazo dos insetos.

Esse resultado ganha relevância considerando que os ácidos graxos não são apenas reservas energéticas, mas também participam de processos fisiológicos diversos, incluindo a formação de membranas e a manutenção da homeostase metabólica (Arrese; Soulages, 2010). Em insetos, alterações nas vias lipogênicas podem impactar a disponibilidade de substratos essenciais para a síntese de lipídios estruturais e para a regulação do balanço energético (Heier; Kühnlein, 2018). Assim, a redução de FAS1 observada neste estudo sugere que o hidrato de morina compromete não apenas a capacidade de armazenar TAG, mas também pode limitar a provisão de ácidos graxos necessários para funções celulares básicas. Outro ponto de relevância é que a literatura já relatou a capacidade da morina em inibir a atividade enzimática da FAS em modelos animais *in vitro* (Li & Tian, 2004), e nossos resultados sugerem que esse mecanismo pode ser conservado a nível de expressão gênica, configurando um possível alvo molecular do composto.

Outro ponto importante é que a inibição da FAS força as larvas a mobilizarem seus estoques de TAG para suprir as demandas energéticas. Como observado, o consumo acentuado de TAG acompanha a queda de FAS1, reforçando a hipótese de que a degradação dos lipídios de reserva compensa, ao menos parcialmente, a perda da via anabólica. Essa transição de um metabolismo predominantemente de síntese para um estado catabólico sustentado indica um

redesenho metabólico imposto pelo hidrato de morina, em que os estoques energéticos acumulados se tornam a principal fonte para manter a homeostase diante do bloqueio biossintético.

A consistência desse efeito é reforçada pela análise de outras enzimas da via lipídica. A redução, entre 65 e 80%, nos níveis de DGAT1 em concentrações superiores a 100 µM (Figura 18E) sugere um comprometimento adicional na etapa final da síntese de TAG. Essa enzima é essencial para a esterificação de DAG em TAG, e sua supressão restringe de forma crítica a capacidade do inseto de repor estoques energéticos (Heier; Kühnlein, 2018). Assim, o impacto da morina não se restringe ao bloqueio inicial da via (FAS1), mas se estende também às etapas finais, criando um bloqueio completo no fluxo biossintético.

De maneira semelhante, a redução significativa de GPAT1 em concentrações acima de 175 µM (Figura 18F) demonstra que a morina afeta também a etapa limitante da síntese *de novo* de glicerolipídios, necessária tanto para a formação de TAG, quanto de membranas celulares (Yu et al., 2018). A relação direta observada entre a expressão de GPAT1 e as reservas de TAG, corroborada por estudos em *R. prolixus* que mostram queda drástica nos estoques lipídicos após silenciamento dessa proteína (Alves-Bezerra et al., 2017), reforça que a morina compromete de forma sistêmica as vias de armazenamento energético. Esse resultado amplia a compreensão do mecanismo de ação do composto, sugerindo que ele provoca uma desregulação global da biogênese lipídica em insetos.

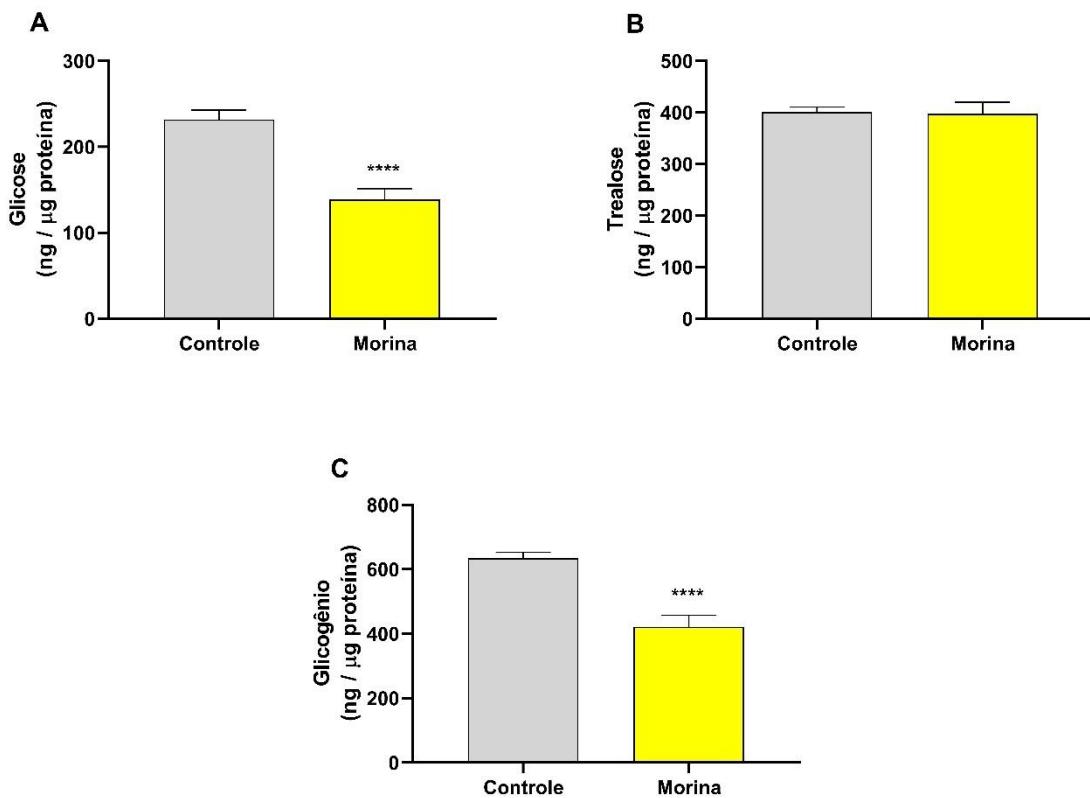
Assim, ao integrar os resultados de TAGL1, HSL, FAS1, DGAT1 e GPAT1, fica evidente que o hidrato de morina atua gera a inibição das vias de síntese e hidrólise lipídica, desde a produção inicial de ácidos graxos até a formação final de TAG, além de elevar a degradação do TAG já estabelecido. Essa repressão generalizada da lipogênese, associada ao aumento da mobilização de reservas previamente acumuladas, cria um estado metabólico de depleção progressiva, que pode explicar tanto os efeitos letais em concentrações elevadas quanto os potenciais impactos subletais em doses mais baixas. Dessa forma, a morina se destaca como um modulador metabólico profundo, com efeitos que ultrapassam a simples toxicidade larval e atingem a fisiologia básica do inseto.

## 10.2 O impacto do hidrato de morina no metabolismo de carboidratos

Os carboidratos são reservas energéticas de rápida mobilização em insetos, essenciais para manter funções fisiológicas como locomoção, alimentação, atividade neural, manutenção da hemolinfa e resposta ao estresse (Arrese; Soulages, 2010; Hou et al., 2015; Kunieda et al., 2006; Mattila; Hietakangas, 2017). Eles se encontram em formas livres, como a glicose, dissacarídicas realizando o transporte energético na forma de trealose, e polissacarídicas, como é o caso do glicogênio que serve como reserva de longo prazo no corpo gorduroso e outros tecidos (Arrese; Soulages, 2010). A regulação desses estoques é fundamental para a homeostase energética que depende de balanço entre síntese desses compostos e sua degradação. Sob essa regulação pode sofrer alterações que afetam sobrevivência e desempenho (Thompson, 2003).

O desafio com hidrato de morina com os efeitos vistos anteriormente também impactou o metabolismo de carboidratos. A glicose total apresentou redução de mais 40% no grupo tratado com 175  $\mu$ M de hidrato de morina em relação ao controle (Figura 19A), enquanto o glicogênio foi depletado em mais de 33,5% (Figura 19C). Por outro lado, a trealose manteve-se inalterada (Figura B). Os valores foram normalizados por proteína, o que indica que as mudanças refletem variações reais nas reservas de carboidratos e não apenas diferenças de tamanho ou massa das amostras.

Fisiologicamente, a queda marcante na glicose combinada com a depleção expressiva do glicogênio indica um deslocamento do balanço energético em direção ao catabolismo, ou as larvas estão consumindo glicogênio (glicogenólise) e glicose livre em ritmo muito maior para suprir demandas imediatas de ATP, ou há inibição das vias de reposição (glicogênese e gliconeogênese) que normalmente mantêm esses níveis. Em insetos, o glicogênio é uma reserva central utilizada rapidamente durante picos de demanda energética e para manutenção metabólica sob estresse (Wigglesworth, 1942). Músculos e outros tecidos consumidores podem baixar rapidamente glicogênio para sustentar atividade e sobrevivência (Arrese; Soulages, 2010; Bretscher; O'Connor, 2020). A magnitude da redução (~40% glicose, ~33,5% glicogênio) sugere que a exposição de 24 h ao composto impõe uma pressão energética considerável nas larvas, não só uma alteração marginal.

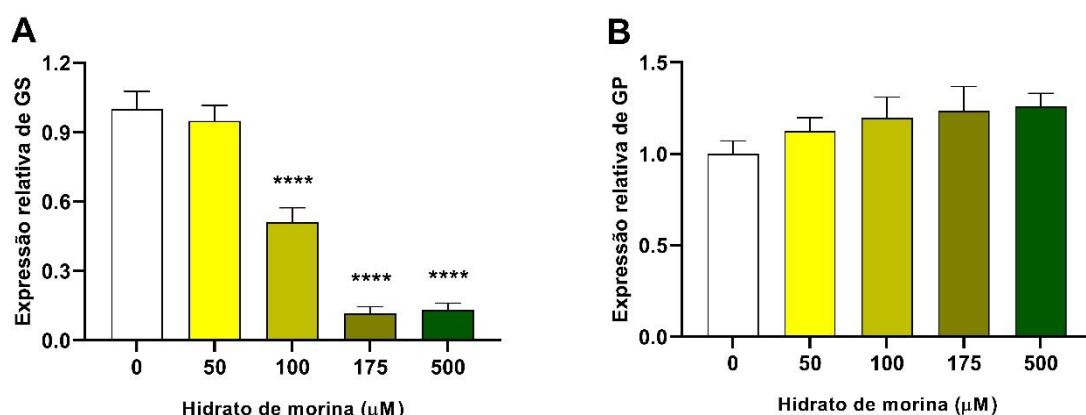


**Figura 19. Níveis de carboidratos em larvas tratadas com hidrato de morina.** Larvas L3 foram submetidas a um tratamento de 24 h com 175  $\mu$ M de hidrato de morina. O conteúdo de glicose (A), trealose (B) e glicogênio (C) foi quantificado e normalizado para proteínas totais. Os valores representam a média de quatro réplicas biológicas independentes  $\pm$  EPM ( $n = 16$ ). As diferenças estatísticas foram determinadas por Teste T (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

A manutenção da trealose apesar da redução de glicose e glicogênio é biologicamente plausível: trealose é o principal açúcar hemolinfático e costuma ser rigidamente regulada para preservar homeostase hemolinfática, integridade neural e tolerância a estresses (Tevatiya et al., 2020; Thompson, 2003). A estabilidade da trealose sugere que vias que sintetizam (TPS e TPP) ou que controlam sua degradação (trealase) não foram afetadas pelo hidrato de morina, ou que exista prioridade fisiológica em manter trealose circulante em troca do glicogênio.

Além dos estoques de carboidratos livres e armazenados, investigamos também o impacto do hidrato de morina sobre enzimas-chave do metabolismo glicogênico. A GS,

responsável pela polimerização de glicose em glicogênio e considerada a principal enzima reguladora da síntese desse polissacarídeo, apresentou uma forte redução de expressão em concentrações superiores a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 20A). A queda foi de quase 50% em 100  $\mu\text{M}$  e se manteve drasticamente baixa em 175 e 500  $\mu\text{M}$  (cerca de 87%), sugerindo que o composto exerce um efeito direto ou indireto sobre a via de armazenamento de carboidratos. A inibição de GS representa um ponto crítico, uma vez que essa enzima é essencial para a manutenção energética de insetos, particularmente em fases de desenvolvimento intensivo como o estágio larval, quando as reservas precisam sustentar a metamorfose (Murphy; Wyatt, 1965; Wigglesworth, 1942).



**Figura 20. Expressão de genes do metabolismo do glicogênio em larvas de *Aedes aegypti* tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.** Os níveis de expressão de Glicogênio sintase (A) e Glicogênio fosforilase (B) são relativos aos valores de larvas a 0  $\mu\text{M}$  (1,0). Os níveis de expressão foram normalizados pelos genes de referência, actinal e  $\alpha$ -tubulina. Os valores são relatados como a porcentagem da expressão de pico e representam a média de quatro réplicas biológicas independentes  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). As diferenças estatísticas relativas ao controle (0  $\mu\text{M}$ ) foram determinadas usando ANOVA unidirecional (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Esses resultados são consistentes com estudos que demonstram o papel essencial da GS na regulação do balanço energético em insetos. Por exemplo, a supressão da expressão de GS em mosquitos *Culex pipiens* durante a diapausa levou a uma redução acentuada nos estoques de glicogênio e lipídios, comprometendo a sobrevivência e a adaptação metabólica (Sim;

Denlinger, 2013). Em *Harmonia axyridis*, a privação alimentar resultou em depleção rápida de glicogênio associada a alterações na atividade de GS, indicando que a enzima responde de forma sensível a condições de estresse energético (Shi et al., 2017). Além disso, estudos mostram que a regulação da GS em insetos está frequentemente associada a sinais hormonais que controlam a síntese de glicogênio em resposta ao estado nutricional (Chowański et al., 2021).

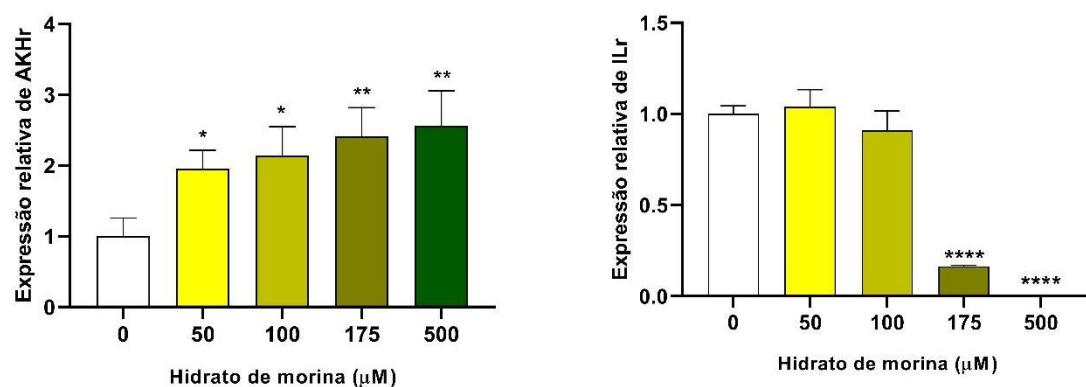
Em contraste, a GP, que catalisa a etapa limitante da degradação do glicogênio liberando glicose-1-fosfato, não apresentou variações significativas de expressão em nenhuma das concentrações de hidrato de morina testadas (Figura 20B). A manutenção da expressão relativa de GP sugere que a via catabólica para mobilização de glicogênio permanece funcional, enquanto a via anabólica de síntese está prejudicada. Esse padrão de resposta indica uma assimetria regulatória, onde o hidrato de morina compromete a reposição de glicogênio, mas preserva sua degradação, resultando em um desequilíbrio favorável ao consumo das reservas. Situações semelhantes foram descritas em outros insetos sob estresse químico ou ambiental, nos quais a redução da síntese e o aumento relativo da mobilização de glicogênio refletem uma priorização de energia imediata para sobrevivência (Arrese; Soulages, 2010; Mattila; Hietakangas, 2017).

Portanto, nossos resultados indicam que o hidrato de morina promove um forte bloqueio na via de síntese de glicogênio ao reduzir drasticamente a expressão de GS, sem afetar significativamente a expressão de GP. Esse desequilíbrio sugere que o composto compromete a capacidade de reposição das reservas de carboidratos, forçando a mobilização de glicose livre e o consumo de TAG como fontes alternativas de energia.

### **10.3 O impacto do hidrato de morina em reguladores hormonais**

A contribuição das vias de sinalização para a síntese e mobilização do metabolismo energético também foi avaliada por meio da expressão dos receptores de hormônios-chave em larvas de *Ae. aegypti* tratadas com hidrato de morina. O balanço metabólico em insetos é regulado, em grande parte, pela oposição entre os ILPs, que promovem o armazenamento de nutrientes, e o AKH, que estimula a mobilização de carboidratos e lipídios (Gulia-Nuss et al., 2011; Nässel; Broeck, 2015; Sharma; Nuss; Gulia-Nuss, 2019).

Nos ensaios realizados, observamos que a expressão do AKHr aumentou de forma progressiva com o tratamento, atingindo aproximadamente o dobro dos níveis do grupo controle em 50 e 100  $\mu$ M e chegando a valores 140% e 155% superiores nos grupos tratados com 175 e 500  $\mu$ M, respectivamente (Figura 21A). Esse perfil sugere um estímulo à mobilização energética, compatível com os efeitos previamente descritos do AKH, que atua de maneira análoga ao glucagon em mamíferos, promovendo glicogenólise e lipólise (Lorenz; Gäde, 2009; Toprak, 2020). Além disso, AKH é conhecido por induzir a ativação de lipases como TAGL1, bmm e HSL, ao mesmo tempo em que reprime enzimas lipogênicas, como DGAT1 e GPAT1, ampliando o desbalanço em direção ao catabolismo (Alves-Bezerra et al., 2016; Arrese; Soulages, 2010).



**Figura 21. Expressão de genes do metabolismo do glicogênio em larvas de *Aedes aegypti* tratadas com diferentes concentrações de hidrato de morina.** Os níveis de expressão de receptor de hormônio adipocinético (A) e receptor semelhante à insulina (B) são relativos aos valores de larvas a 0  $\mu$ M (1,0). Os níveis de expressão foram normalizados pelos genes de referência, actinal e  $\alpha$ -tubulina. Os valores são relatados como a porcentagem da expressão de pico e representam a média de quatro réplicas biológicas independentes  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). As diferenças estatísticas relativas ao controle (0  $\mu$ M) foram determinadas usando ANOVA unidirecional (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Em contraste, a expressão do ILr sofreu reduções abruptas em concentrações mais elevadas de hidrato de morina. Em 175  $\mu$ M, a expressão caiu para cerca de 16% do nível observado no controle, e em 500  $\mu$ M praticamente não foi detectada, com valores próximos de zero (Figura 21B). Considerando que a ativação de ILr estimula a via AKT, a qual inibe a lipólise e move a lipogênese (Chowański et al., 2021; Sharma; Nuss; Gulia-Nuss, 2019), a supressão tão acentuada da expressão de ILr observada em nossos experimentos sugere que o

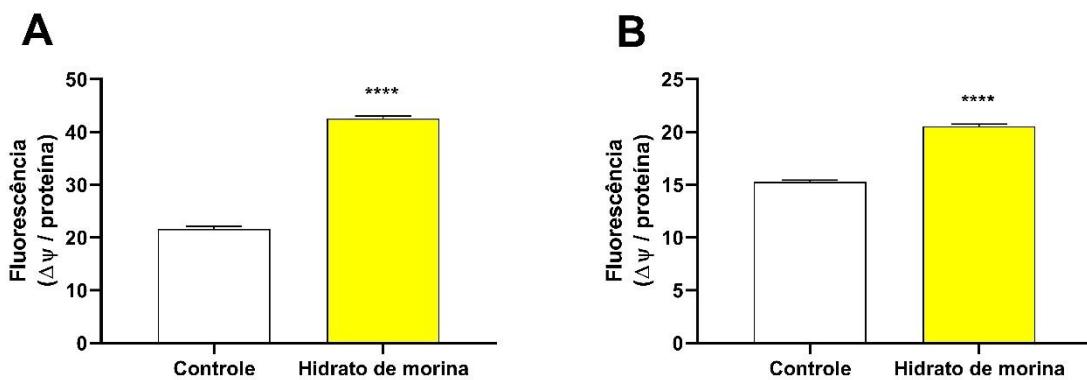
hidrato de morina compromete severamente a sinalização anabólica. Esse efeito está de acordo com estudos funcionais em *Tribolium castaneum*, nos quais a supressão de ILr resultou em elevada mortalidade larval e redução da fecundidade (Sang et al., 2016), bem como em *Ae. aegypti*, onde a manipulação da via insulin-like levou a perdas significativas nas reservas energéticas dos ovos e à diminuição da viabilidade da prole (Gulia-Nuss et al., 2011).

Assim, a elevação progressiva da expressão de AKHr, combinada com a forte repressão de ILr, revela que o hidrato de morina direciona o metabolismo larval para um estado catabólico persistente, caracterizado por aumento da mobilização de reservas energéticas e inibição das vias de síntese. Esse desequilíbrio pode explicar, em parte, os efeitos drásticos observados sobre os níveis de TAG, glicose e glicogênio, sugerindo que a ação do composto envolve não apenas efeitos sobre enzimas metabólicas, mas também uma modulação profunda das vias hormonais de regulação energética.

#### **10.4 O impacto do hidrato de morina, um antioxidante causador de estresse oxidativo**

Embora os flavonoides, como a morina, sejam amplamente reconhecidos por sua ação antioxidante, evidências crescentes apontam que, em determinadas condições celulares e ambientais, esses compostos podem atuar como pró-oxidantes, induzindo o acúmulo de ROS (Galati; O'Brien, 2004; Procházková; Boušová; Wilhelmová, 2011). Esse comportamento paradoxal é frequentemente associado à capacidade dos flavonoides de interagir com íons metálicos de transição e com componentes mitocondriais, modulando a produção de peróxido de hidrogênio e outras ROS (Boots; Haenen; Bast, 2008).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com hidrato de morina levou a um aumento significativo da produção de peróxido de hidrogênio tanto em homogeneizado de larvas inteiras quanto no intestino de *Ae. aegypti* (Figura 22). Em larvas inteiras (Figura 22A), a fluorescência indicativa de peróxido foi aproximadamente duas vezes maior em relação ao grupo controle. No intestino (Figura 22B), observou-se aumento de cerca de 35% em relação ao basal, confirmando que o trato digestivo é uma das principais fontes de ROS após a exposição ao composto. Esse achado sugere que, apesar de suas propriedades antioxidantes descritas em sistemas *in vitro*, a morina pode induzir estresse oxidativo em condições fisiológicas complexas, como as encontradas em organismos vivos.



**Figura 22. Produção de peróxido de hidrogênio em larvas inteiras e no intestino de *Aedes aegypti* após exposição ao hidrato de morina.** Em A há a representação da produção de peróxido em homogeneizado de larvas inteiras, enquanto em B há a representação da produção em homogeneizado de intestino de larvas após o tratamento de 24h de hidrato de morina. As diferenças estatísticas em relação ao controle (0 $\mu\text{M}$  de hidrato de morina) foram determinados usando Teste T. Valores são representados como média de 3 réplicas biológicas independentes  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). Asteriscos representam diferenças significativas em relação ao controle (0  $\mu\text{M}$ ), onde \*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

O aumento da produção de ROS observado aqui pode estar intimamente relacionado às alterações metabólicas previamente descritas neste trabalho. A ativação do receptor de AKH e a supressão da sinalização via ILr indicam um predomínio de processos catabólicos e aumento da mobilização energética. Esse desbalanço pode intensificar o fluxo de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial, favorecendo a produção de ROS (Boots; Haenen; Bast, 2008; Murphy, 2009). Da mesma forma, a redução dos níveis de TAG, glicose e glicogênio observados nas larvas sugere que a utilização exacerbada de lipídios como fonte energética pode gerar um metabolismo mais oxidativo, uma vez que a redução de substratos energéticos tem sido associada ao aumento da produção de ROS e ao comprometimento da capacidade antioxidante em insetos (Pompka; Szulińska; Kafel, 2022).

É importante destacar que a indução de ROS por flavonoides já foi relatada em diferentes modelos biológicos. Em células tumorais humanas, por exemplo, a morina demonstrou comportamento pró-oxidante em determinadas condições, promovendo apoptose

mediada por ROS e ativação de vias de estresse oxidativo (Park et al., 2014). Além disso, estudos recentes demonstraram que o estresse oxidativo em *Spodoptera exigua* pode estar diretamente ligado ao desequilíbrio energético e à mobilização de reservas, visto que a depleção de substratos energéticos potencializa a vulnerabilidade oxidativa (Pompka; Szulińska; Kafel, 2022). Portanto, o aumento de peróxido observado em nossas análises provavelmente reflete não apenas um efeito direto do hidrato de morina sobre o metabolismo oxidativo, mas também um efeito indireto decorrente do estresse metabólico induzido pelo desequilíbrio energético documentado em nossas análises bioquímicas e moleculares.

No contexto do intestino de insetos, o aumento da produção de ROS representa um fator crítico de disfunção tecidual. Estudos clássicos já apontaram que o excesso de espécies reativas pode comprometer tecidos metabolicamente ativos, como o corpo gorduroso e o epitélio intestinal, resultando em alterações na integridade das membranas celulares, na oxidação de lipídios e proteínas e, consequentemente, na redução da viabilidade celular larval (Ahmad, 1995; Felton; Summers, 1995). No caso específico do epitélio intestinal, o estresse oxidativo pode danificar diretamente os enterócitos, levando à perda da função das microvilosidades e à redução da capacidade de absorção de nutrientes essenciais, como carboidratos, lipídios e aminoácidos. Esse comprometimento não apenas limita o aporte energético necessário para sustentar o desenvolvimento larval, mas também pode desencadear respostas inflamatórias locais e acelerar a apoptose das células intestinais, enfraquecendo ainda mais a homeostase metabólica. Assim, os aumentos de ROS observados em nossos experimentos sugerem que o intestino pode estar sendo um dos principais alvos do hidrato de morina, onde o estresse oxidativo compromete simultaneamente a integridade tecidual e a eficiência na absorção de nutrientes, impactando diretamente a sobrevivência e a aptidão das larvas de *Ae. aegypti*.

Os resultados aqui obtidos reforçam essa hipótese, uma vez que a exposição ao hidrato de morina reduziu de forma expressiva os níveis de TAG, glicose e glicogênio. Esses achados sugerem que a disfunção intestinal causada pelo estresse oxidativo pode ter contribuído para a queda nas reservas energéticas, comprometendo tanto a absorção quanto o armazenamento de nutrientes. Assim, o intestino emerge como um ponto central de vulnerabilidade frente à ação pró-oxidante do hidrato de morina, e seu comprometimento funcional parece estar diretamente relacionado à redução da sobrevivência e da aptidão das larvas de *Ae. aegypti*.

## 11 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o hidrato de morina exerce um efeito multifacetado sobre o metabolismo energético de *Ae. aegypti*, atingindo de forma integrada os principais eixos de regulação: lipídios, carboidratos, vias hormonais e equilíbrio redox. A redução progressiva dos estoques de TAG, associada à ativação da lipase TAGL1 e à repressão de enzimas-chave da lipogênese, evidencia um cenário de depleção energética induzida por um redirecionamento metabólico forçado para o catabolismo. Esse efeito é reforçado pela supressão da FAS1, DGAT1 e GPAT1, que limita não apenas a capacidade de acumular energia em longo prazo, mas também a reposição de substratos essenciais para funções celulares básicas.

De modo convergente, a depleção de glicose e glicogênio, combinada à forte inibição da expressão da glicogênio sintase, sugere que o hidrato de morina compromete profundamente a via anabólica dos carboidratos. A manutenção relativa da trealose, entretanto, indica que o inseto prioriza a preservação da homeostase hemolinfática frente à perda de outras reservas. Esse desequilíbrio anabólico-catabólico parece estar vinculado à regulação hormonal, já que observamos indução da expressão do receptor de AKH e supressão drástica do receptor de ILPs, confirmando uma transição para um estado metabólico catabólico persistente.

Outro ponto central revelado pelos resultados é a indução de estresse oxidativo. Embora a morina seja reconhecida como antioxidante em diferentes contextos, aqui o composto induziu a produção de peróxido de hidrogênio, especialmente no intestino larval. Esse achado sugere que a sobrecarga catabólica e a mobilização excessiva de substratos energéticos intensificaram o metabolismo oxidativo, favorecendo a geração de ROS. No intestino, esse aumento parece comprometer a integridade dos enterócitos, reduzindo a absorção de nutrientes e agravando o déficit energético. Assim, o intestino emerge como um ponto crítico de vulnerabilidade, onde a ação pró-oxidante da morina pode interligar diretamente estresse metabólico, perda de reservas energéticas e mortalidade larval.

Em conjunto, esses resultados revelam que o hidrato de morina atua não apenas como um agente tóxico direto, mas também como um modulador metabólico profundo, capaz de reorganizar o balanço energético larval. Ao suprimir vias anabólicas, estimular vias catabólicas e induzir estresse oxidativo, o composto compromete simultaneamente a síntese, o armazenamento, a mobilização e a utilização de energia. Essa ação sistêmica ajuda a explicar a

relação clara entre concentração do composto, depleção metabólica e toxicidade observada. Portanto, a morina deve ser considerada não apenas por seus efeitos letais, mas também por seu potencial de afetar a fisiologia básica dos insetos em doses subletais, o que pode ter implicações diretas no controle populacional de *Ae. aegypti*.

## **CAPÍTULO III**

**Alterações metabólicas decorrentes da ação do hidrato de  
morina na incorporação de energia**

## **RESUMO**

A nutrição larval exerce papel central no desenvolvimento e na aptidão fisiológica de *Ae. aegypti*, influenciando diretamente crescimento, reservas energéticas e sobrevivência e pode ser modulada tanto pela disponibilidade de alimento quanto pela exposição a compostos bioativos, como o hidrato de morina. A investigação do perfil metabólico de insetos submetido a estresses é interessante para compreender o papel de diferentes compostos presentes no metabolismo através a integração coordenada de diferentes vias metabólicas fundamentais para a homeostase. O presente capítulo teve como objetivo avaliar de forma integrada os efeitos do hidrato de morina sobre parâmetros biológicos e sobre o perfil metabólico de larvas em diferentes condições nutricionais. Para isso, larvas foram expostas por 24 horas à concentração de 175 µM do flavonoide, na presença ou ausência de dieta e analisadas quanto ao crescimento, às reservas de proteínas, lipídios e carboidratos, bem como ao perfil metabolômico obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os resultados mostraram que o tratamento com hidrato de morina reduziu significativamente o tamanho larval, independentemente da oferta de alimento, indicando que o composto compromete a digestão e a absorção de nutrientes. As reservas energéticas apresentaram reduções expressivas, especialmente de proteínas e triacilgliceróis, configurando um padrão fisiológico semelhante ao jejum. A análise de carboidratos revelou diminuição acentuada de glicose, trealose e glicogênio, sugerindo bloqueio na incorporação de substratos de rápida utilização. A metabolômica indicou alterações profundas no equilíbrio bioquímico, incluindo depleção seletiva de aminoácidos essenciais e antioxidantes, acúmulo de glutamina e aspartato relacionados à detoxificação de nitrogênio, redução de intermediários do ciclo do ácido cítrico e queda nos níveis de lactato, evidenciando perda de flexibilidade energética. O aumento de ácido propanoico foi identificado como marcador adicional de estresse metabólico. Em conjunto, os dados demonstram que o hidrato de morina interfere de forma ampla na homeostase larval, reduzindo a capacidade de mobilização e armazenamento de energia, promovendo uma condição comparável ao jejum mesmo na presença de alimento e limitando o desenvolvimento, a sobrevivência e o potencial fisiológico do vetor.

## ABSTRACT

Larval nutrition plays a central role in the development and physiological fitness of *Ae. aegypti*, directly influencing growth, energy reserves, and survival, and can be modulated both by food availability and by exposure to bioactive compounds. Among these compounds, flavonoids stand out for their ability to interfere with intestinal absorption and energy metabolism, with morin hydrate emerging as a relevant candidate for studies in vector insects. The present study aimed to integratively evaluate the effects of morin hydrate on biological parameters and the metabolic profile of larvae under different nutritional conditions. To this end, larvae were exposed for 24 hours to 175 µM of the flavonoid, in the presence or absence of diet, and analyzed for growth, protein, lipid, and carbohydrate reserves, as well as for their metabolic profile assessed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The results showed that treatment with morin hydrate significantly reduced larval size, regardless of diet availability, indicating that the compound compromises nutrient digestion and absorption. Energy reserves were markedly reduced, particularly proteins and triacylglycerols, establishing a physiological pattern analogous to fasting. Carbohydrate analysis revealed a pronounced decrease in glucose, trehalose, and glycogen, suggesting impaired incorporation of readily available substrates. Metabolomic analysis indicated profound alterations in biochemical balance, including selective depletion of essential and antioxidant amino acids, accumulation of glutamine and aspartate related to nitrogen detoxification, reduction of tricarboxylic acid cycle intermediates, and a decrease in lactate levels, evidencing loss of metabolic flexibility. The increase in propanoic acid was identified as an additional marker of metabolic stress. Altogether, the data demonstrate that morin hydrate broadly disrupts larval homeostasis, reducing the capacity for energy mobilization and storage, inducing a fasting-like condition even in the presence of food, and ultimately limiting development, survival, and the physiological potential of the vector.

## **12 REFERENCIAL TEÓRICO**

A nutrição larval constitui um dos fatores mais determinantes para o desenvolvimento, capacidade vetorial e aptidão de *Ae. aegypti*, influenciando diretamente variáveis como tamanho corporal, reserva energética e expressão de hormônios regulatórios (Telang et al., 2006; Telang; Frame; Brown, 2007). Estudos demonstram que dietas com diferentes proporções de proteína e carboidrato durante os estágios larvais alteram o tempo de desenvolvimento, o tamanho adulto e o acúmulo de lipídios, glicogênio e proteínas, refletindo como a disponibilidade de alimento modela reservas energéticas essenciais (Caragata et al., 2014; Telang; Frame; Brown, 2007). Em *Ae. aegypti*, por exemplo, larvas privadas de alimento apresentam atraso no desenvolvimento, redução drástica no tamanho corporal e menor fecundidade na fase adulta, demonstrando que o balanço nutricional larval é determinante para a aptidão reprodutiva e sobrevivência (Kang et al., 2017).

O intestino médio desempenha papel central nesse processo, sendo o principal local de digestão, absorção e regulação metabólica. Ele atua como interface entre o ambiente e o metabolismo larval, determinando não apenas a eficiência de assimilação dos nutrientes ingeridos, mas também o direcionamento dessas reservas para crescimento, síntese de macromoléculas ou armazenamento energético em forma de lipídios e carboidratos (Clements, 2011; Taracena et al., 2018). Perturbações na fisiologia intestinal, seja por privação alimentar ou por exposição a compostos bioativos, podem comprometer a integridade epitelial, reduzir a absorção de nutrientes e desencadear respostas compensatórias no metabolismo energético, afetando diretamente a sobrevivência e a plasticidade fenotípica dos insetos (Shanbhag; Tripathi, 2009; Terra; Ferreira, 2011).

Além disso, a interação entre fatores nutricionais e estresse químico tem ganhado destaque na entomologia experimental. Compostos vegetais como flavonoides, presentes naturalmente em dietas ou aplicados como agentes inseticidas, podem atuar tanto como antioxidantes quanto como pró-oxidantes em insetos, afetando o equilíbrio redox, a função intestinal e, consequentemente, a capacidade de mobilizar e armazenar reservas energéticas (Felton; Summers, 1995; Perera et al., 2012). No caso específico da morina, estudos em modelos animais têm demonstrado sua capacidade de modular enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e glicídico (Li; Tian, 2004; Venkateish; Rajamanikandan; Perumal, 2024), embora pouco se saiba sobre seu impacto direto na fisiologia intestinal de mosquitos. Assim, a investigação do efeito combinado entre a presença ou ausência de alimento e o

tratamento com hidrato de morina oferece uma oportunidade para compreender como fatores nutricionais e químicos interagem no remodelamento do metabolismo energético e na integridade intestinal em *Ae. aegypti*.

## 12.1 O papel do intestino no metabolismo

O intestino médio representa o principal órgão de digestão e absorção em insetos, atuando como a interface essencial entre o alimento ingerido e a distribuição de nutrientes para os tecidos periféricos (Terra; Ferreira, 2011). É nesse tecido que ocorre a secreção de enzimas digestivas, a quebra de macromoléculas e o transporte transepitelial de açúcares, aminoácidos e lipídios para a hemolinfa, processos fundamentais para o crescimento e a manutenção da homeostase energética (Hakim; Baldwin; Smagghe, 2010; Lemaitre; Miguel-Aliaga, 2013). Alterações na integridade ou funcionalidade do intestino médio comprometem diretamente o aporte de nutrientes e podem impactar de forma crítica a sobrevivência larval.

A eficiência na digestão e absorção está intimamente associada à estrutura e função dos enterócitos e da matriz peritrófica, que protegem o epitélio contra agentes químicos e microrganismos (Lehane, 1997; Richards; Richards, 1977). Alterações nessas barreiras podem aumentar a permeabilidade intestinal e reduzir a eficiência de absorção de nutrientes essenciais, resultando em prejuízos no crescimento (Hegedus et al., 2009). Estudos mostram que disfunções no transporte de açúcares ou lipídios no intestino médio impactam a disponibilidade energética de forma sistêmica, afetando a mobilização de reservas no corpo gorduroso (Lemaitre; Miguel-Aliaga, 2013).

Diversos compostos bioativos vegetais têm sido descritos como indutores de alterações histopatológicas no epitélio intestinal, incluindo vacuolização, desorganização das microvilosidades e falhas na renovação celular, que resultam em prejuízo na eficiência digestiva e na absorção de nutrientes (Roel et al., 2010; Scudeler et al., 2014; Kilani-Morakchi et al., 2021). Além do efeito morfológico, evidências demonstram que fitocompostos também podem induzir a geração de ROS no intestino, desencadeando apoptose de enterócitos e comprometendo ainda mais a função digestiva (Lu et al., 2020; Liu et al., 2024)

Diversos trabalhos experimentais demonstram que o intestino é também um dos principais alvos de toxinas e compostos bioativos. Os cristais de *Bacillus thuringiensis*, por

exemplo, ligam-se a receptores do epitélio intestinal, promovendo lise celular, perda de integridade tecidual e, consequentemente, redução na capacidade de absorção de nutrientes (Bravo; Gill; Soberón, 2007; Vachon; Laprade; Schwartz, 2012). Situação semelhante é observada na exposição a pesticidas naturais e metabólitos secundários de plantas, que frequentemente causam desorganização epitelial e estresse oxidativo no intestino de larvas (de Oliveira Mendes et al., 2020; He et al., 2019).

Além de fatores químicos, a microbiota intestinal exerce papel essencial na regulação do metabolismo energético. Em *Ae. aegypti*, a abundância da dieta larval modula tanto a composição quanto o tamanho da microbiota do intestino e do habitat aquático, afetando diretamente o conteúdo de carboidratos, proteínas, glicogênio e lipídios armazenados (MacLeod; Dimopoulos; Short, 2021). Além de ser necessária para a fecundidade normal, longevidade e competência vetorial dos mosquitos adultos. Já foi relatado na literatura que mosquitos livres de microbiota apresentaram produção de ovos reduzida, metabolismo basal alterado, mas esses efeitos podiam ser parcialmente revertidos pela recolonização da flora intestinal (Harrison et al., 2023).

O intestino de insetos é altamente suscetível ao estresse oxidativo, especialmente em condições de privação alimentar ou exposição a agentes tóxicos. Em insetos, a infecção por microorganismo ou por agentes tóxicos eleva a peroxidação lipídica como resposta danos oxidativos gerados pelo desequilíbrio redox, evidenciando vulnerabilidade e perda da integridade celular onde, como resposta secundária, gera indivíduos com menor absorção nutricional e menores reservas de carboidratos (Kazek et al., 2020; Pompka; Szulińska; Kafel, 2022). Além disso, em *Chlosyne lacinia*, a transição larva-pupa foi acompanhada por alterações no metabolismo redox, incluindo aumento na atividade de enzimas antioxidantes e maior peroxidação lipídica, sugerindo que períodos críticos de remodelação fisiológica e possível restrição nutricional favorecem o estresse oxidativo nos tecidos do trato digestivo (Moreira; Hermes-Lima, 2024). Esses achados em conjunto indicam que, na ausência de alimento ou sob limitação de nutrientes, o intestino pode sofrer dano estrutural e funcional, comprometendo a absorção de nutrientes e agravando a depleção energética em insetos.

## 12.2 Metabolismo energético de insetos

O metabolismo energético em insetos é caracterizado por uma flexibilidade notável, que garante a manutenção das funções vitais mesmo em condições adversas de disponibilidade de nutrientes. Durante o desenvolvimento larval de mosquitos como *Ae. aegypti*, a alta taxa de crescimento e divisão celular demanda uma produção constante de ATP, o que é alcançado pela integração coordenada de diferentes vias metabólicas centrais. A glicólise representa a principal rota de degradação inicial da glicose, fornecendo piruvato como produto final e gerando pequenas quantidades de energia de forma rápida (Chapman, 2013). O piruvato pode, então, ser convertido em lactato em condições fermentativas ou direcionado para o ciclo do ácido cítrico, localizado nas mitocôndrias, onde é oxidado a CO<sub>2</sub> com a produção de equivalentes redutores como NADH e FADH<sub>2</sub> (Nation, 2016). Esses equivalentes são posteriormente utilizados na cadeia transportadora de elétrons para geração de ATP por fosforilação oxidativa, um processo altamente eficiente que sustenta as elevadas exigências energéticas associadas ao desenvolvimento larval (Clements, 2011).

Além da glicose obtida diretamente da dieta, os insetos utilizam reservas energéticas intermediárias que garantem a homeostase em situações de variação nutricional (Alqurashi; English; Wall, 2020; Singh; Brown, 1957). A trealose, dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, é o principal açúcar circulante na hemolinfa dos insetos e desempenha papel central como fonte rápida de energia (Thompson, 2003). Sua mobilização permite suprir de forma imediata tecidos com elevada demanda metabólica, como músculos e o próprio intestino médio, sendo essencial para manter o equilíbrio energético durante períodos de intensa atividade celular (Becker et al., 1996; Wang et al., 2020). O glicogênio, por sua vez, constitui a principal forma de armazenamento de carboidratos em insetos, sendo acumulado no corpo gorduroso e degradado em glicose quando necessário, especialmente em situações de jejum ou privação alimentar (Arrese; Soulages, 2010; Murphy; Wyatt, 1965; Wigglesworth, 1942).

Os lipídios representam a reserva energética mais densa e de longo prazo, sendo estocados no corpo gorduroso e mobilizados principalmente em fases de escassez alimentar ou durante a metamorfose, quando o organismo enfrenta elevadas demandas energéticas decorrentes da remodelação de tecidos (Arrese et al., 2001; Arrese; Soulages, 2010; Canavoso et al., 2001). Diferente dos carboidratos, que são rapidamente consumidos, os triacilgliceróis fornecem energia de forma mais gradual e sustentada, sendo oxidados no ciclo do ácido cítrico e na fosforilação oxidativa para suprir ATP em situações prolongadas de estresse (Gondim et

al., 2018). Essa dualidade entre reservas energéticas de curto prazo (glicose, trealose e glicogênio) e de longo prazo (lipídios) confere ao mosquito uma plasticidade metabólica fundamental para sua sobrevivência em ambientes onde a disponibilidade alimentar é variável.

Embora a utilização de carboidratos e lipídios seja predominante, as proteínas também podem desempenhar papel energético em insetos, especialmente em condições de privação alimentar ou estresse metabólico. Nesses contextos, o catabolismo proteico fornece esqueletos carbônicos de aminoácidos que podem ser convertidos em intermediários do ciclo do ácido cítrico, como piruvato, succinil-CoA ou oxaloacetato, assegurando a produção de ATP em situações críticas (Chapman, 2013; Nation, 2016; Scaraffia; Wells, 2003; Teulier et al., 2016). Além disso, a degradação de proteínas libera nitrogênio na forma de amônia, cuja detoxificação é realizada principalmente pela conversão em glutamina e aspartato, destacando a integração entre metabolismo energético e nitrogenado (Isoe; Scaraffia, 2013; Scaraffia et al., 2005). Em larvas de *Ae. aegypti*, a mobilização de proteínas e aminoácidos para suprir energia durante o jejum reflete uma estratégia adaptativa que garante a sobrevivência, ainda que às custas da redução das reservas destinadas ao crescimento e à síntese de biomoléculas estruturais.

O intestino médio assume papel central nesse contexto, funcionando como a principal interface entre o alimento ingerido e a distribuição de nutrientes para os tecidos periféricos (Terra; Ferreira, 2011). Nesse órgão, ocorre a secreção de enzimas digestivas, a degradação de macromoléculas e o transporte de açúcares, aminoácidos e lipídios para a hemolinfa (Hakim; Baldwin; Smagghe, 2010). Uma vez absorvidos, esses nutrientes podem ser direcionados ao crescimento, à síntese de macromoléculas ou ao armazenamento no corpo gorduroso (Taracena et al., 2018). Perturbações nesse equilíbrio, seja por privação alimentar ou por exposição a compostos bioativos que interfiram na digestão e absorção, comprometem a capacidade do inseto de acumular reservas energéticas adequadas, refletindo em atrasos no desenvolvimento, redução do tamanho corporal e diminuição da fecundidade adulta (Kang et al., 2017).

Em síntese, o metabolismo energético de insetos, como *Ae. aegypti*, é sustentado por um sistema integrado de vias bioquímicas que convertem carboidratos, lipídios e proteínas em energia, equilibrando o uso de reservas de curto e longo prazo conforme as exigências fisiológicas. Essa plasticidade garante que o inseto consiga não apenas crescer em ambientes ricos em nutrientes, mas também sobreviver e completar seu ciclo de vida em condições de estresse nutricional ou químico. Dessa forma, compreender como essas vias se ajustam em

resposta a fatores externos é essencial para desvendar os mecanismos que regulam o desenvolvimento e a sobrevivência larval.

### 12.3 Aminoácidos como reguladores metabólicos

Os aminoácidos desempenham papel fundamental no metabolismo energético de insetos, não apenas como precursores na síntese de proteínas, mas também como importantes substratos para a geração de energia em situações de alta demanda ou de estresse nutricional. Durante o desenvolvimento larval de *Ae. aegypti*, a intensa divisão celular e a rápida taxa de crescimento exigem flexibilidade metabólica, e a utilização de aminoácidos como fontes alternativas de energia é uma característica marcante desse processo (Hakim; Baldwin; Smagghe, 2010; Nation, 2016). Além de suprirem o ciclo do ácido cítrico por meio de intermediários anapleróticos, determinados aminoácidos participam diretamente da regulação de vias bioquímicas, atuando como sinalizadores metabólicos capazes de ajustar o balanço entre anabolismo e catabolismo. Dessa forma, os perfis de aminoácidos livres no organismo não apenas refletem o estado nutricional, mas também constituem indicadores da capacidade adaptativa do inseto frente a condições ambientais variáveis (Scaraffia et al., 2005; Taracena et al., 2018).

A prolina é um dos aminoácidos mais relevantes no metabolismo de insetos, reconhecida por sua função como combustível preferencial em tecidos com alta demanda energética (Scaraffia; Wells, 2003; Teulier et al., 2016). Embora seu papel como substrato oxidativo seja mais estudado em adultos durante o voo, há evidências de que em larvas de mosquitos esse aminoácido também seja utilizado em rotas anapleróticas para sustentar o ciclo do ácido cítrico, especialmente em situações de restrição alimentar (Scaraffia; Wells, 2003). Além de seu valor energético, a prolina participa na regulação do equilíbrio redox celular, uma vez que sua oxidação está acoplada à produção de NADPH, contribuindo para a defesa contra espécies reativas de oxigênio (Moreira; Hermes-Lima, 2024). Assim, a prolina cumpre funções duplas, servindo tanto como substrato energético quanto como modulador da homeostase oxidativa.

A alanina, por sua vez, desempenha papel estratégico como aminoácido glicogênico. Ela participa do chamado ciclo glicose-alanina, no qual transporta grupos amino dos tecidos periféricos para o corpo gorduroso, onde é transaminada a piruvato e pode ser convertida

novamente em glicose por gliconeogênese (Adeva-Andany et al., 2014). Esse ciclo permite a manutenção da glicemia e da produção de energia mesmo quando os carboidratos dietéticos estão escassos, além de atuar como mecanismo de redistribuição de nitrogênio durante períodos de privação alimentar. Em mosquitos, esse processo garante um suprimento energético alternativo, mantendo a integridade do metabolismo central em momentos de estresse (Gondim et al., 2018).

A glutamina se destaca como o principal aminoácido associado ao metabolismo nitrogenado em mosquitos. Ela atua como forma segura de transporte e armazenamento de nitrogênio, prevenindo a toxicidade da amônia liberada durante o catabolismo proteico (Isoe; Scaraffia, 2013; Scaraffia et al., 2005). Em condições de estresse nutricional, sua síntese é intensificada pela ação da glutamina sintetase, funcionando como regulador da homeostase de nitrogênio (Cruzat et al., 2018). Além disso, a glutamina é precursora de glutamato e pode alimentar diretamente o ciclo do ácido cítrico, desempenhando papel energético adicional (Wu, 2013). Essa versatilidade explica por que, em análises metabolômicas, a glutamina tende a se acumular em larvas submetidas ao jejum, refletindo uma estratégia de adaptação que alia detoxificação de nitrogênio e suporte energético (Horvath; Dagan; Scaraffia, 2021).

O aspartato complementa essa rede metabólica ao atuar como intermediário essencial na conexão entre o metabolismo de aminoácidos, o ciclo do ácido cítrico e a biossíntese de nucleotídeos (Scaraffia, 2016). Formado pela transaminação do oxaloacetato, o aspartato participa tanto da reposição de intermediários anapleróticos quanto da doação de nitrogênio para rotas biossintéticas críticas, como a produção de purinas e pirimidinas (Cooper; Jeitner, 2016). Em insetos submetidos ao jejum, seu acúmulo sugere um papel adaptativo na manutenção da atividade metabólica, funcionando como elo entre o metabolismo de carbono e de nitrogênio (Liu; Sutter; Tu, 2021). Dessa forma, o aspartato assume função regulatória, não apenas sustentando a bioenergética celular, mas também garantindo a continuidade de processos anabólicos essenciais para o desenvolvimento larval.

Em conjunto, prolina, alanina, glutamina e aspartato exemplificam como os aminoácidos exercem funções além da síntese proteica, atuando como combustíveis e sinalizadores do estado metabólico. Essa multifuncionalidade confere aos mosquitos uma notável plasticidade fisiológica, permitindo que ajustem suas rotas bioquímicas frente a diferentes pressões ambientais, desde a restrição nutricional até a exposição a compostos bioativos que afetam a absorção e utilização de nutrientes.

## 12.4 Metabolismo do nitrogênio e detoxificação de derivados da hidrólise proteica

O metabolismo do nitrogênio em insetos representa um eixo fundamental da fisiologia, pois a degradação de proteínas durante o crescimento, o jejum ou sob condições de estresse metabólico libera grandes quantidades de amônia, um composto altamente tóxico que precisa ser rapidamente convertido em formas menos tóxicas (Isoe; Scaraffia, 2013). Ao contrário de vertebrados que excretam ureia ou ácido úrico em maior proporção, mosquitos como *Ae. aegypti* utilizam estratégias baseadas na assimilação da amônia em moléculas transportadoras de nitrogênio, especialmente glutamina e aspartato, que permitem tanto o armazenamento seguro quanto a utilização anaplerótica desse subproduto (Isoe; Scaraffia, 2013; Scaraffia et al., 2005). Essa via de detoxificação garante a manutenção da homeostase celular e evita o acúmulo de amônia livre na hemolinfa, condição que comprometeria a integridade fisiológica do inseto.

A glutamina ocupa papel central nesse processo por funcionar como principal reservatório de nitrogênio em insetos (Xue et al., 2022). Sua síntese ocorre pela ação da enzima glutamina sintetase, que incorpora o grupo amônio ao glutamato, produzindo uma molécula altamente solúvel e não tóxica capaz de circular na hemolinfa e ser transportada para tecidos periféricos (Felig et al., 1969). Essa estratégia é particularmente importante durante o jejum, quando o catabolismo proteico é intensificado para suprir energia, resultando em maior produção de nitrogênio livre (Scaraffia, 2016). Além de sua função detoxificante, a glutamina participa da regulação do balanço redox, sendo precursora do glutamato e, consequentemente, da síntese de glutatona, um dos principais antioxidantes celulares dos insetos (Ahmad; Pardini, 1990).

O aspartato, formado a partir da transaminação do oxaloacetato, também é um intermediário essencial na detoxificação de nitrogênio. Ele atua como doador de grupos amino em vias biossintéticas, especialmente na síntese de nucleotídeos, e serve como elo entre o metabolismo energético e nitrogenado (Cooper; Jeitner, 2016). Durante períodos de intensa degradação proteica, como em condições de privação alimentar ou exposição a compostos bioativos, o acúmulo de aspartato reflete a adaptação metabólica necessária para manter a anaplerose do ciclo do ácido cítrico e ao mesmo tempo manejar o excesso de nitrogênio liberado pela proteólise (Liu; Sutter; Tu, 2021).

Assim, a detoxificação dos derivados da hidrólise proteica em insetos envolve uma integração estreita entre metabolismo energético e nitrogenado. O acoplamento da degradação

de proteínas à síntese de moléculas como glutamina e aspartato assegura não apenas a neutralização da amônia, mas também a manutenção de vias biossintéticas e anapleróticas cruciais para o desenvolvimento larval. Esse equilíbrio garante que larvas de *Ae. aegypti* possam sustentar seu crescimento mesmo sob condições de estresse, demonstrando a importância estratégica do metabolismo do nitrogênio para sua sobrevivência.

## 12.5 Estresse oxidativo e metabolismo redox em insetos

O metabolismo energético intenso característico das larvas de insetos, aliado à exposição a fatores estressores como jejum ou compostos xenobióticos, frequentemente leva a um aumento da produção de ROS (Misra et al., 2011). Essas moléculas são geradas principalmente durante o transporte de elétrons na mitocôndria, quando parte do oxigênio consumido é reduzido de forma incompleta, resultando na formação de radicais livres (Gautam; Sharma; Trivedi, 2023). Em condições normais, a produção de ROS está associada ao funcionamento celular e pode atuar inclusive como sinalizadora em processos fisiológicos (Lennicke; Cochemé, 2020). Entretanto, quando a geração dessas espécies excede a capacidade antioxidante do organismo, ocorre um desequilíbrio redox que compromete a integridade das células, desencadeando peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA (Felton; Summers, 1995). Em insetos, esse estresse oxidativo pode ser intensificado por restrição alimentar, que limita a disponibilidade de substratos energéticos, e pela exposição a compostos bioativos, como flavonoides, que modulam diretamente o metabolismo mitocondrial e a geração de radicais (Gautam; Sharma; Trivedi, 2023; Hay et al., 2020; Pompka; Szulińska; Kafel, 2022).

O intestino médio e o corpo gorduroso representam dois dos principais alvos de ROS em insetos. O epitélio intestinal, responsável pela absorção de nutrientes e pela barreira contra microrganismos e toxinas, é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo (Bai et al., 2021; Khan; Kojour; Han, 2023). A produção exacerbada de ROS pode induzir apoptose de enterócitos, vacuolização e desorganização das microvilosidades, reduzindo a eficiência da digestão e absorção de nutrientes (Bai et al., 2021; Roel et al., 2010). Já o corpo gorduroso, órgão funcionalmente análogo ao fígado e ao tecido adiposo em vertebrados, é diretamente afetado pela peroxidação lipídica, que compromete suas reservas de triacilgliceróis e glicogênio, essenciais para sustentar o metabolismo em fases de jejum ou metamorfose (Arrese;

Soulages, 2010; Kazek et al., 2020). Dessa forma, a produção excessiva de ROS, induzida por carência nutricional ou xenobióticos, interfere tanto na absorção quanto no armazenamento de energia, impactando a sobrevivência e o desenvolvimento larval.

Para contrabalançar os danos causados pelo estresse oxidativo, insetos desenvolveram um arsenal de sistemas antioxidantes endógenos. Entre eles, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-S-transferases (GSTs), que atuam em conjunto para neutralizar radicais livres e prevenir o acúmulo de espécies reativas (Hemingway; Ranson, 2000; Rivero et al., 2011). A SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez é decomposto em água e oxigênio pela ação da catalase, evitando sua conversão em radicais hidroxila altamente tóxicos. As GSTs, por sua vez, utilizam a glutationa reduzida (GSH) para conjugar e detoxificar xenobióticos, além de atuarem na proteção contra peroxidação lipídica (Ahmad; Pardini, 1990). O equilíbrio entre esses sistemas é crucial para a manutenção da integridade do intestino médio e do corpo gorduroso, funcionando como linha de defesa contra os efeitos deletérios de ROS gerados tanto endogenamente quanto em resposta a fatores ambientais.

Estudos recentes evidenciam que períodos críticos do ciclo de vida dos insetos, como a transição larva-pupa, estão associados a aumento na atividade de enzimas antioxidantes, sugerindo que a regulação redox é essencial para o sucesso do desenvolvimento (Moreira; Hermes-Lima, 2024). Em *Ae. aegypti*, tanto a restrição alimentar quanto a exposição a metabólitos secundários de plantas foram descritas como condições capazes de induzir forte estresse oxidativo no intestino e no corpo gorduroso (Gautam; Sharma; Trivedi, 2023). Assim, a manutenção da homeostase redox depende da atuação coordenada de múltiplos mecanismos antioxidantes, que asseguram a proteção contra ROS e preservam a funcionalidade de órgãos-chave para o metabolismo energético.

## **13 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do hidrato de morina em condições de presença e ausência de alimento sobre parâmetros biológicos e o perfil metabólico de larvas de *Ae. aegypti*, integrando os impactos no crescimento larval, nas reservas energéticas (proteínas, triacilgliceróis e carboidratos) e na reorganização da homeostase bioquímica, de modo a compreender como o flavonoide influencia a sobrevivência, o desenvolvimento e a fisiologia desse vetor.

### **13.1 Objetivos específicos**

- Mensurar parâmetros biológicos avaliando o efeito do hidrato de morina, em associação com a disponibilidade ou ausência de alimento, sobre o tamanho larval e possíveis atrasos no desenvolvimento;
- Quantificar reservas energéticas através da determinação conteúdo de proteínas totais, TAG e carboidratos nas larvas submetidas às diferentes condições experimentais, verificando a influência do flavonoide na mobilização e no armazenamento energético;
- Caracterizar o perfil metabolômico analisando os efeitos do hidrato de morina sobre o metabolismo larval, identificando alterações em aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos e ácidos orgânicos;
- Investigar a integração metabólica, interpretando como o hidrato de morina, em interação com o estado nutricional, reorganiza vias centrais do metabolismo, incluindo o ciclo do ácido cítrico, a glicólise, a fermentação lática, o metabolismo nitrogenado e a defesa antioxidante;
- Relacionar parâmetros biológicos e metabólicos, integrando os dados obtidos para compreender de que forma as alterações metabólicas se refletem em sobrevivência, reservas energéticas, desenvolvimento e potencial fisiológico das larvas.

## **14 METODOLOGIA**

### **14.1 Tratamento com hidrato de morina com a disponibilização de ração**

Conforme detalhado no Capítulo 1, as condições de criação larval e preparo das soluções de hidrato de morina seguiram protocolos previamente padronizados de modo a garantir a reproduutibilidade dos experimentos. Entretanto, neste capítulo é importante destacar que todos os ensaios foram conduzidos após 24 horas de exposição a 175 µM do flavonoide mesclado a presença de uma dieta rica energeticamente (Tabela 3). A nomenclatura dos tratamentos foi padronizada para melhor visualização gráfica e escrita: C+ refere-se ao grupo controle alimentado com ração, C- refere-se ao grupo controle sob jejum, M+ refere-se ao grupo tratado com 175 µM de hidrato de morina com ração e M- refere-se ao grupo tratado com hidrato de morina sem ração.

**Tabela 3. Valores nutricionais da ração de gato.**

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Energia (Kcal)	3740 kcal/kg
Proteína bruta	320 g/kg
Cinzas	85 g/kg
Gordura bruta	80 g/kg
Fibra bruta	45 g/kg
Fósforo	8000 mg/kg
Potássio	7000 mg/kg
Cálcio	6000 mg/kg
Taurina	1000 mg/kg
Zinco	100 mg/kg
Ferro	80 mg/kg
Vitamina A	5000 UI/kg

Fonte: Whiskas

## **14.2 Medicação do tamanho larval**

O comprimento larval foi determinado por meio de mensurações realizadas em um microscópio estereoscópico Olympus SZX16, acoplado a um sistema de captura de imagens conectado a um computador. As imagens obtidas foram processadas e arquivadas utilizando o software Olympus cellSens (versão 4.3), o qual permitiu não apenas a visualização detalhada, mas também a padronização das medidas realizadas. Para cada condição experimental, foram selecionadas e analisadas 15 larvas em cada uma das quatro repetições independentes, garantindo-se uma amostragem mínima representativa de cada tratamento.

A aferição do comprimento foi conduzida de forma individualizada, registrando-se a distância linear entre a extremidade anterior da cápsula cefálica e a região posterior delimitada pelas papilas anais. Esse procedimento assegurou a uniformidade dos critérios de medição entre os diferentes grupos analisados. As mensurações foram realizadas diretamente no software, que dispõe de uma escala integrada calibrada ao sistema óptico, eliminando a necessidade de estimativas visuais e conferindo maior precisão e reproduzibilidade aos dados coletados.

## **14.3 Quantificação de carboidratos**

Para a determinação dos níveis de glicose, trealose e glicogênio foram utilizados quatro grupos amostrais de larvas (C+, C-, M+ e M-). Em cada tratamento, pools de 10 larvas previamente expostas ao hidrato de morina foram coletados e homogeneizados em 200 µL de água destilada gelada com o auxílio de micropistilo estéril, mantendo as amostras em gelo para evitar degradações. Foram realizadas cinco réplicas biológicas independentes por grupo.

O protocolo utilizado foi o adaptado de Van Handel (1985) descrito no capítulo II, utilizando uma reação de antrona para gerar variação colorimétrica e comparar com uma curva padrão específica para cada carboidrato.

## **14.4 Quantificação de triacilglicerol**

Para a determinação dos níveis de TAG foram utilizados quatro grupos amostrais de larvas (C+, C-, M+ e M-). Em cada tratamento, pools de 10 larvas previamente expostas ao hidrato de morina foram coletados e homogeneizados em 200 µL de água destilada gelada com

o auxílio de micropistilo estéril, mantendo as amostras em gelo para evitar degradações. Foram realizadas cinco réplicas biológicas independentes por grupo.

O conteúdo de TAG foi quantificado com kit enzimático comercial de triglicerídeos (Bioclin®), conforme instruções do fabricante. Brevemente, 10 µL do homogeneizado foram incubados com 200 µL de reagente em microplacas a 37 °C por 30 minutos, e a absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro de microplacas. A quantificação foi realizada a partir de curva padrão de triglicerídeos, e os valores foram normalizados pela concentração de proteínas totais de cada réplica.

#### **14.5 Análise do perfil metabólico**

A extração dos metabólitos seguiu protocolo adaptado de (Lisec et al., 2006), amplamente utilizado em metabolômica de insetos. As amostras após 24h sob o tratamento experimental específico foram homogeneizadas por 5 min em etanol absoluto, contendo 60 µL de ribitol (0,2 µg/µL) como normalizador interno. O processo de extração foi conduzido em termomixer a 950 rpm por 15 min a 70 °C. Após centrifugação e partição, 300 µL da fase polar foi recuperada, concentrada a vácuo até secagem completa e armazenada a -80 °C para evitar degradação oxidativa.

A derivatização dos extratos seguiu dois estágios: inicialmente, 40 µL de metoxiamina hidroclorídrica em piridina foi adicionada e incubada por 2 h a 37 °C, permitindo a estabilização de grupamentos carbonílicos por formação de oximas. Em seguida, adicionaram-se 70 µL de MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida) e a mistura foi agitada por mais 30 min a 37 °C, etapa necessária para silarização dos grupos hidroxila e carboxila, aumentando a volatilidade e estabilidade térmica dos metabólitos para análise em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS).

As amostras derivatizadas (0,5 µL) foram injetadas em GC-MS (Shimadzu QP2010 Plus), utilizando injeção em modo split (1:20), de forma a evitar sobrecarga da coluna e saturação do detector. A separação dos compostos ocorreu em coluna capilar de sílica fundida (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm ID) contendo 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano como fase estacionária, adequada para análise de metabólitos polares após derivatização. As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor a 230 °C, gás de arraste hélio (1,0 mL/min), programa de aquecimento iniciando em 70 °C por 5 min, seguido de aumento de 5 °C/min até

290 °C, mantida por 20 min. A interface e a câmara de ionização foram mantidas a 310 °C e 250 °C, respectivamente.

A detecção foi realizada em espectrômetro de massas por impacto eletrônico a 70 eV, operando em modo varredura no intervalo 40–800 m/z, com taxa de 0,5 scans/. Para garantir robustez na identificação, uma série de alcanos (C8–C40) foi utilizada como padrão de índice de retenção e os picos foram comparados com espectros da biblioteca NIST 2008 e de padrões autênticos processados nas mesmas condições. Por fim, a área de cada composto identificado foi normalizada pela área gerada pelo ribitol.

#### **14.6 Análise estatística**

As representações gráficas e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), assegurando a representação adequada da variabilidade entre os grupos analisados, com exceção dos resultados de tamanho larval que foram expressos na forma de medianas.

Em todos os ensaios foi utilizado a ANOVA unidirecional, seguida da aplicação dos testes de significância apropriados para detecção de diferenças entre as concentrações testadas. Com exceção aos resultados de tamanho larval, onde foi empregado o teste de Kruskal-wallis. Em todos os casos, foi considerado como critério de significância estatística um valor de  $p < 0,05$ , sendo que as diferenças observadas nos experimentos atenderam a esse critério e, portanto, foram consideradas estatisticamente significativas.

## **15 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

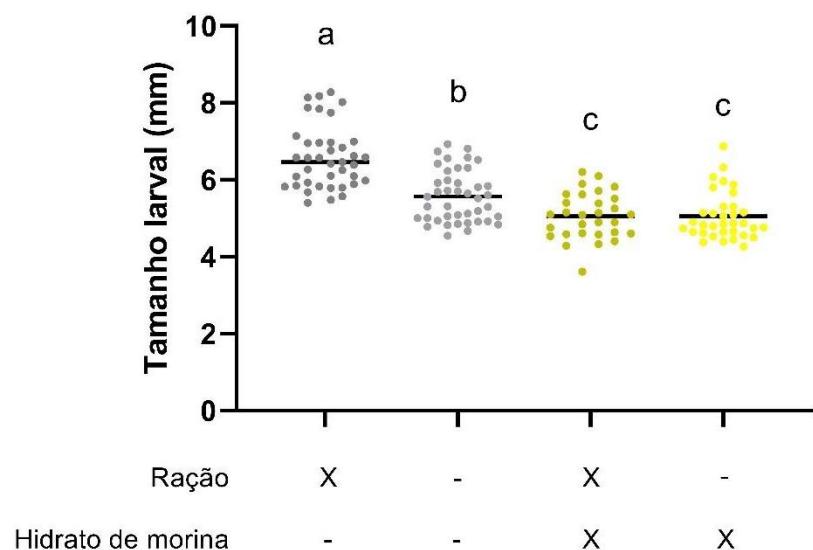
Nos resultados apresentados nos capítulos I e II, o tratamento com hidrato de morina por 24h em larvas de *Ae. aegypti* efeitos sobre a sobrevivência, desenvolvimento e reservas energéticas. Esses resultados indicam que a incorporação de energia pode estar sendo comprometida. A partir dos dados obtidos, há indicativos que células intestinais e a absorção dos nutrientes foram comprometidas. Para investigar essa hipótese de forma mais aprofundada, neste capítulo o tratamento todos os ensaios foram realizados com a CL<sub>50</sub> calculada no capítulo I, 175 µM de hidrato de morina e mesclamos o tratamento com ração altamente proteica para verificarmos se houve a incorporação de nutrientes.

### **15.1 Alterações no crescimento larval de *Aedes aegypti* em resposta ao hidrato de morina: evidências de limitação nutricional**

A análise do tamanho larval evidenciou um impacto direto tanto na ausência de dieta quanto da presença do hidrato de morina sobre o desenvolvimento de *Ae. aegypti*. O grupo controle, mantido exclusivamente com ração por 24h, apresentou a maior mediana de comprimento, refletindo condições ideais de crescimento (Figura 23). A privação alimentar reduziu mais de 14% o tamanho das larvas, demonstrando o efeito esperado da carência de substratos energéticos no crescimento corporal (Figura 23). No entanto, os grupos tratados com hidrato de morina, independentemente da presença de ração, exibiram tamanhos significativamente menores, semelhantes entre si e inferiores ao controle negativo, apresentando redução média de mais de 23% do tamanho em relação ao controle com ração.

Os flavonoides já foram descritos interagindo com as enzimas digestivas de animais e insetos e podem inibir atividades enzimáticas responsáveis pela degradação de carboidratos, proteínas e lipídios no lúmen intestinal (Cao; Chen, 2012). As relações estrutura-atividade indicam que grupos hidroxila e padrões de substituição em flavonoides influenciam fortemente a capacidade de inibir α-amilases e α-glucosidases in vitro, sugerindo um mecanismo plausível pelo qual flavonoides ingeridos ou presentes no ambiente larval reduziriam a eficiência da digestão de carboidratos (Cao; Chen, 2012). Revisões sobre compostos vegetais com atividade inseticida também destacam que constituintes fenólicos e flavonoides frequentemente suprimem atividades de proteases e amilases em larvas de insetos, o que se associa a redução do aproveitamento nutritivo e ao retardo do crescimento (Senthil-Nathan, 2020; Silvério et al.,

2020), o que corrobora com os dados que obtivemos após 24h de tratamento com hidrato de morina (Figura 23).



**Figura 23. Tamanho larval de *Aedes aegypti* submetido a tratamento cruzado entre dieta padrão e exposição ao hidrato de morina.** A presença de ração e hidrato de morina foi sinalizado com (X) e a ausência dos mesmos com (-). Os pontos representam os valores do tamanho de cada indivíduo que teve seu tamanho aferido e a linha representa a mediana de quatro repetições independentes em cada condição experimental. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos estabelecidas a partir do teste de Kruskal-Wallis, onde  $p < 0.05$ .

Em mosquitos, a digestão no intestino médio depende de uma cascata de proteases e outras enzimas cuja expressão e atividade são reguladas por fatores hormonais e de desenvolvimento; a inibição ou modulação dessas enzimas compromete a degradação do alimento e a disponibilidade de nutrientes para absorção (He et al., 2021). Experimentos demonstraram que inibidores das proteases do intestino médio ou mutações que reduzem a atividade enzimática alteram a digestão e reduzem a fecundidade, evidenciando a sensibilidade do processo digestivo a bloqueios enzimáticos (He et al., 2021; Manzato et al., 2022).

Além da inibição direta de enzimas, compostos vegetais, incluindo flavonoides, podem induzir estresse oxidativo no epitélio intestinal, promovendo peroxidação lipídica, dano de

membrana e eventual desprendimento de células epiteliais, o que reduz a área absorptiva e a eficiência de captação de nutrientes (Hay et al., 2020; Pompka; Szulińska; Kafel, 2022). Estudos com lepidópteros expuseram que situações que elevam espécies reativas ou peroxidação lipídica (por exemplo privação nutricional, metais ou xenobióticos) levam à redução das reservas energéticas e a alterações histológicas no trato digestivo, comprometendo absorção e crescimento (Fan et al., 2024; Pompka; Szulińska; Kafel, 2022).

A microbiota intestinal também desempenha papel central na digestão e na disponibilização de nutrientes para mosquitos, contribuindo para a degradação de componentes do sangue e a liberação de metabólitos essenciais para a fecundidade; perturbações dessa comunidade, por antibióticos ou por compostos bioativos, reduzem a eficiência digestiva e a produção de ovos (Caragata; Tikhe; Dimopoulos, 2019; Gaio et al., 2011). Revisões recentes mostram ainda que alterações na composição microbiana influenciam vias metabólicas do hospedeiro e podem modular a disponibilidade de aminoácidos e outros substratos, impactando o balanço energético (Shi; Yu; Cheng, 2023).

Em conjunto, a literatura sustenta três mecanismos não mutuamente exclusivos pelos quais o hidrato de morina poderia reduzir o crescimento larval observado: (i) inibição enzimática direta no lúmen intestinal (reduzindo quebra de polissacarídeos e proteínas); (ii) dano oxidativo ao epitélio intestinal (reduzindo superfície e capacidade de absorção); e (iii) desregulação da microbiota que suporta a digestão e o metabolismo nutritivo do mosquito. Esses mecanismos explicam porque larvas expostas a morina apresentaram redução de tamanho mesmo quando ração estava disponível: a presença de substrato não garante absorção se as etapas de hidrólise, integridade epitelial ou suporte microbiano estiverem comprometidos.

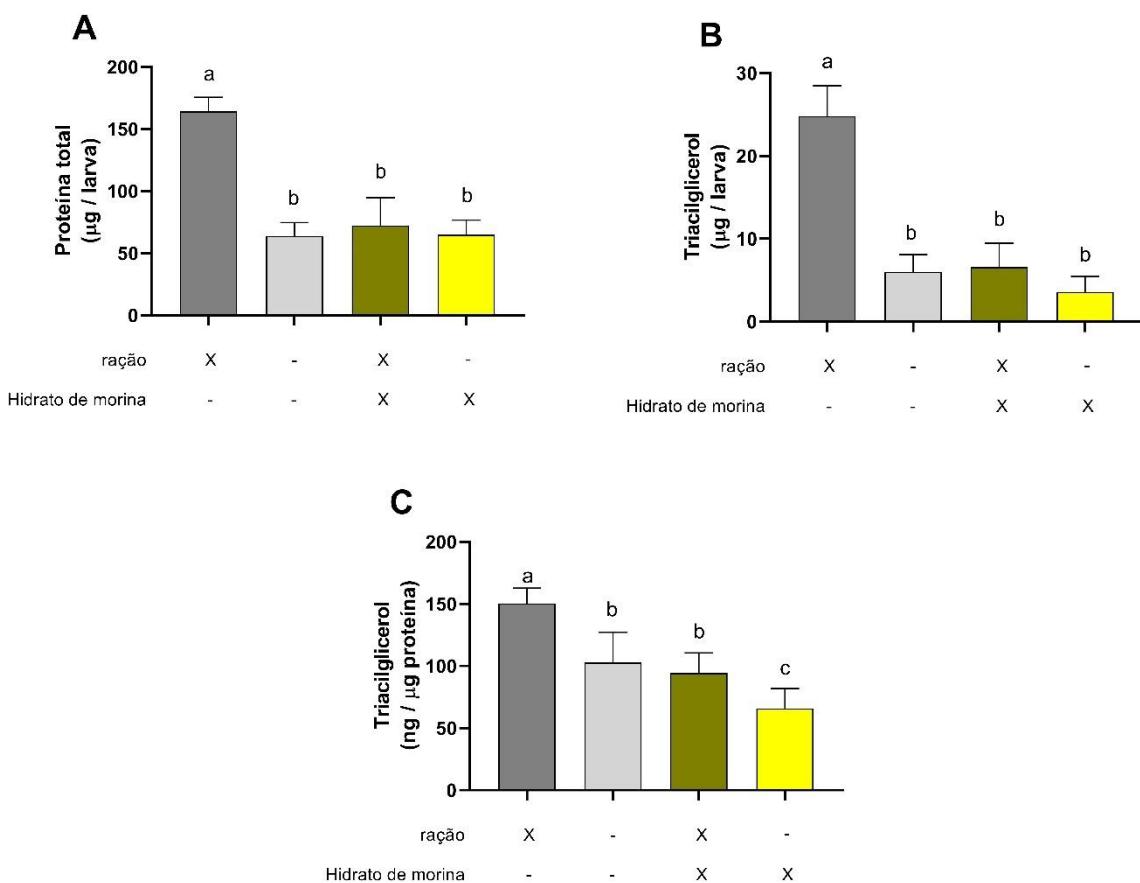
Para testar diretamente essa hipótese em *Ae. aegypti*, estudos futuros deveriam aferir (a) a atividade das principais enzimas digestivas do intestino médio (amilases, lipases, proteases) após exposição larval a hidrato de morina; (b) a morfologia e integridade do epitélio intestino médio por histologia e marcadores de apoptose/peroxidação lipídica; e (c) alterações na composição e função da microbiota intestinal por sequenciamento 16S rRNA e análises metagenômicas, correlacionando esses dados com medidas de absorção (por exemplo incorporação de precursores marcados).

## **15.2 Interferência do hidrato de morina na absorção e metabolismo energético de *Aedes aegypti***

Considerando que o tamanho larval foi reduzido não apenas pela ausência de dieta, mas também pela presença do hidrato de morina, mesmo quando a ração estava disponível, tornou-se necessário avaliar diretamente o metabolismo energético em *Ae. aegypti*. Para isso, foram mensurados os níveis de proteínas totais, triacilgliceróis, glicose, trealose e glicogênio nas quatro condições experimentais utilizadas anteriormente. Essa abordagem permite investigar se a redução do crescimento está associada a limitações na absorção ou utilização dos nutrientes, e se o flavonoide exerce efeito independente da oferta alimentar, alterando diretamente a disponibilidade de reservas energéticas essenciais ao desenvolvimento.

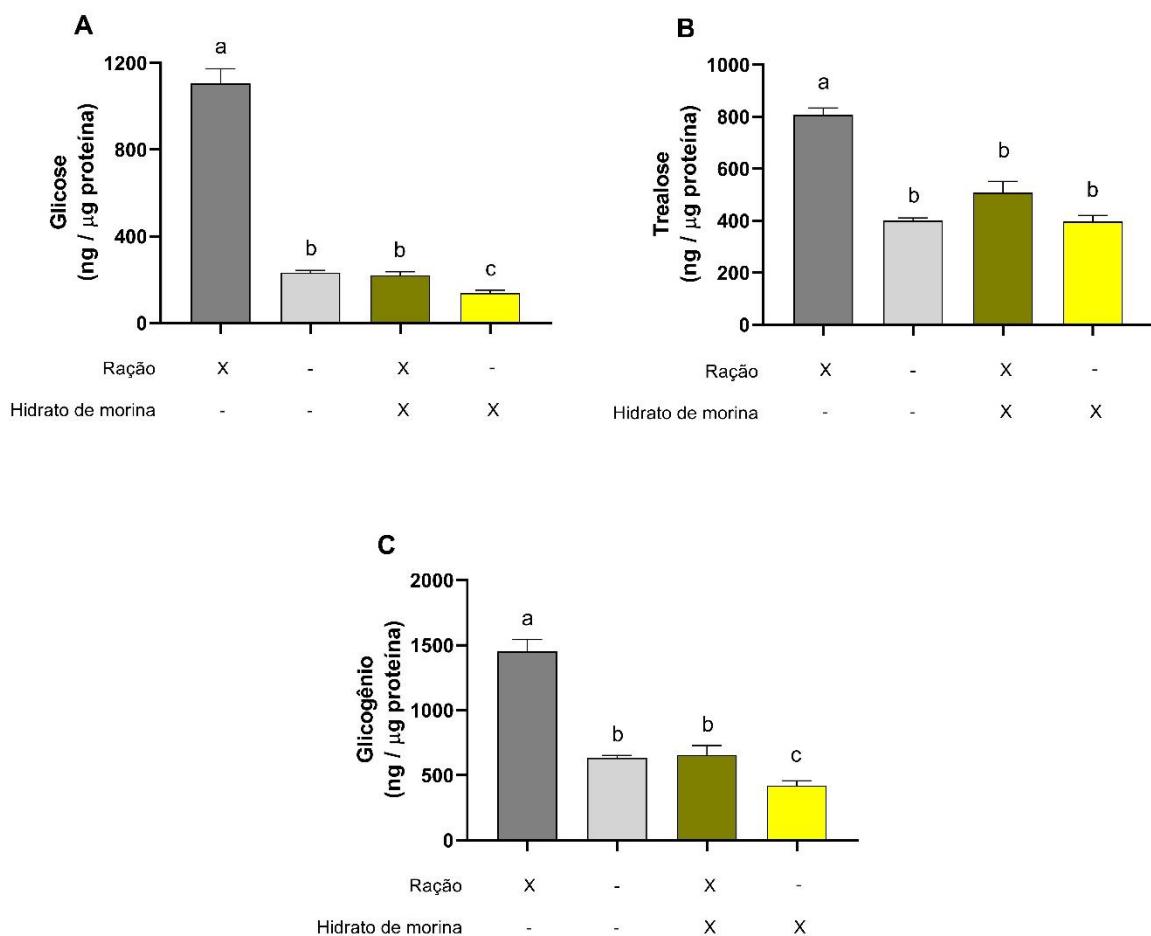
A quantificação de proteínas totais revelou diferenças marcantes entre os tratamentos (Figura 24A). O grupo controle alimentado com ração apresentou os maiores valores, com média próxima a 164 µg/larva, aproximadamente 145% maior que demais grupos. Em contraste, tanto a privação alimentar quanto a exposição ao hidrato de morina, independentemente da presença de ração, resultaram em valores reduzidos e estatisticamente semelhantes entre si. Esse padrão evidencia que a presença do flavonoide compromete a disponibilidade proteica das larvas de forma comparável ao jejum.

De forma similar, os níveis absolutos de TAG seguiram um padrão comparável ao das proteínas (Figura 24B). O grupo controle alimentado apresentou a maior concentração (24,8 µg/larva), enquanto os grupos sob jejum ou tratados com hidrato de morina, independentemente da oferta de ração, exibiram reduções expressivas, com valores próximos entre si (em média 5,4 µg/larva). Esses achados indicam que tanto a privação alimentar quanto a presença do flavonoide prejudicam o acúmulo de reservas lipídicas. A análise do TAG normalizado pelas proteínas totais, entretanto, revelou um panorama adicional (Figura 24C). Apesar de todos os grupos submetidos ao estresse (jejum ou hidrato de morina) apresentarem redução em relação ao controle alimentado (redução em torno de um terço em relação ao controle com ração), o tratamento com hidrato de morina sem ração mostrou queda ainda mais acentuada (cerca de 55%). Esse dado sugere que o efeito do composto pode ser potencializado pela carência nutricional, reduzindo de forma desproporcional os estoques de TAG em relação à massa proteica larval.



**Figura 24.** Níveis de proteínas totais e triacilglicerol em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tratamento cruzado entre dieta padrão e exposição ao hidrato de morina. A presença de ração e hidrato de morina está indicada por (X) e a ausência por (-). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro repetições independentes. Em A são destacados os níveis de proteínas totais, em B os níveis de triacilglicerol e em C os níveis de triacilglicerol normalizados por proteínas totais. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos estabelecidas por ANOVA unidirecional, onde  $p < 0,05$ .

A análise dos níveis de carboidratos evidencia um forte impacto tanto da ausência de dieta quanto da exposição ao hidrato de morina sobre o metabolismo energético das larvas de *Ae. aegypti* (Figura 25). A glicose foi o metabólito mais drasticamente afetado (Figura 25A), apresentando valores significativamente mais elevados no grupo controle alimentado em comparação a todos os demais. Tanto o jejum quanto o tratamento com hidrato de morina reduziram fortemente sua disponibilidade, sendo o efeito mais severo observado quando ambas as condições foram combinadas.



**Figura 25. Quantificação de carboidratos em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tratamento cruzado entre dieta padrão e exposição ao hidrato de morina.** A presença de ração e hidrato de morina está indicada por (X) e a ausência por (-). As barras representam a média ± erro padrão de quatro repetições independentes. Em A são destacados os níveis de Glicose, em B os níveis de trealose e em C os níveis glicogênio. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos estabelecidas por ANOVA unidirecional, onde  $p < 0,05$ .

A trealose, principal açúcar circulante nos insetos e um dos principais substratos energéticos para músculos e tecidos em atividade intensa, também foi reduzida de forma significativa nos grupos privados de dieta ou expostos ao flavonoide (Figura 25B). Embora não tenham sido detectadas diferenças expressivas entre os grupos submetidos ao jejum ou ao hidrato de morina, a redução consistente em relação ao controle alimentado sugere que ambos

os fatores restringem a manutenção da trealose hemolinfática, comprometendo o suprimento energético sistêmico.

O glicogênio acompanhou o mesmo padrão observado anteriormente (Figura 25C). Considerado o principal polímero de reserva rápida em insetos, apresentou níveis elevados apenas no grupo controle alimentado, sendo significativamente reduzido nos demais. O efeito mais pronunciado ocorreu novamente no grupo submetido à combinação de hidrato de morina e ausência de dieta, destacando a ação potencializada do flavonoide em condições de estresse nutricional.

De forma geral, proteínas e carboidratos representam reservas energéticas de mobilização imediata em insetos, especialmente nos estágios larvais caracterizados por vida curta, intensa diferenciação celular e elevadas taxas de crescimento (Chapman, 2013; Nation, 2016). A glicose, a trealose e o glicogênio são prontamente utilizados para sustentar a alta demanda metabólica, diferindo dos lipídios, que constituem reservas de longo prazo, mobilizadas em situações de jejum prolongado ou durante a metamorfose, quando o organismo enfrenta intensas remodelações celulares e elevada demanda energética (Arrese; Soulages, 2010; Canavoso et al., 2001). O fato de os grupos tratados com hidrato de morina apresentarem estoques reduzidos, mesmo com a presença de dieta, concorda com os dados obtidos no capítulo II, onde há um indicativo que o composto pode comprometer a absorção intestinal e/ou a síntese de reservas energéticas, levando as larvas a um estado fisiológico análogo ao jejum e justificam os efeitos de redução do tamanho larval observado na figura 23.

### **15.3 Análise do perfil metabólico**

A caracterização abrangente das alterações no metabolismo primário de larvas expostas por 24 horas ao tratamento cruzado entre dieta padrão e exposição ao hidrato de morina foi conduzida por meio de análise metabolômica utilizando CG-MS. Diferentemente das análises bioquímicas direcionadas a classes específicas de moléculas, como proteínas totais, triacilgliceróis, glicogênio, glicose e trealose, a abordagem metabolômica não direcionada possibilitou a identificação de um conjunto mais diversificado de metabólitos, revelando padrões de reorganização metabólica associados ao tratamento. Essa estratégia é especialmente relevante em estudos com insetos, pois permite observar modificações sutis e interdependentes

no metabolismo, que não seriam captadas por metodologias convencionais de análise de biomoléculas isoladas.

A análise inicial revelou centenas de picos cromatográficos, contudo, a maioria correspondia a ruídos provenientes dos solventes utilizados na derivatização ou a diferentes formas de um mesmo composto. Para compostos detectados em mais de uma forma derivatizada, com múltiplas ligações trimetilsilil (TMS), suas áreas foram somadas e tratados como uma única entidade química. Após essa filtragem, foram identificados 44 metabólitos, distribuídos em quatro grandes classes: 19 aminoácidos, 15 ácidos orgânicos, 6 carboidratos e 2 compostos nitrogenados.

### **15.3.1 Perfil de aminoácidos em larvas de *Aedes aegypti***

Os aminoácidos identificados possuem uma ampla diversidade estrutural considerando o grupo radical da cadeia lateral que são encontrados mais comumente (Tabela 4). Foram identificados 5 aminoácidos apolares/alifáticos que possuem uma natureza hidrofóbica, sendo eles: Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina e prolina. Além deste, foram identificados 3 aromáticos: Fenilalanina, Tirosina e Triptofano. Também foram identificados 5 aminoácidos com o radicais polares não-carregados: Serina, Treonina, Cisteína, Asparagina e Glutamina, 2 carregados negativamente: Aspartato e Glutamato e 2 carregados positivamente: Lisina, histidina e a ornitina.

De forma geral, os mais abundantes foram tirosina (em média 1,76), glutamina (em média 0,725), lisina (em média 0,66), histidina (em média 0,57) e glutamato (em média 0,5). Esses resultados contrastam com o perfil encontrado por (Jiménez-Martínez et al., 2025), em seu trabalho foi realizada uma análise percentual utilizando apenas 12 aminoácidos como padrão de referência e os mais abundantes no estágio L4 de *Ae. aegypti* foram alanina (24,16%), prolina (13,19%), leucina (13,06%), arginina (12,43%) e tirosina (11,2%). Essa divergência pode ser explicada por diferentes fatores metodológicos. Primeiramente, no estudo referido foram utilizados apenas 12 aminoácidos como padrões de referência, enquanto no presente trabalho foi identificado um número mais amplo de compostos, incluindo glutamina, lisina, histidina e glutamato, que não estavam contemplados na análise anterior. Além disso,

diferenças no preparo das amostras, nos parâmetros cromatográficos e nos métodos de derivatização podem alterar a eficiência de detecção e quantificação.

**Tabela 4 Aminoácidos identificados na análise relativa do perfil metabólico.**

TR médio	Compostos identificados	C+	C-	M+	M-
8,2028	Alanina	0,662 ± 0,15a	0,185 ± 0,02b	0,615 ± 0,21a	0,106 ± 0,03b
12,36	Valina	0,123 ± 0,03a	0,006 ± 0,005b	0,016 ± 0,003b	0,012 ± 0,002b
12,463	Leucina	0,066 ± 0,001a	0,0013 ± 0,001b	0,042 ± 0,01a	0,0084 ± 0,006b
13,103	Isoleucina	0,164 ± 0,01a	0,026 ± 0,01b	0,212 ± 0,06a	0,011 ± 0,002b
14,8845	Prolina	0,621 ± 0,15a	0,029 ± 0,003b	0,603 ± 0,19a	0,103 ± 0,02b
17,064	Glicina	0,29 ± 0,03a	0,13 ± 0,03b	0,096 ± 0,02bc	0,033 ± 0,01c
18,714	Serina	0,193 ± 0,03a	0,079 ± 0,06ab	0,213 ± 0,06a	0,014 ± 0,003b
19,445	Treonina	0,552 ± 0,052a	0,017 ± 0,004c	0,243 ± 0,04b	0,021 ± 0,004c
22,799	Aspartato	0,047 ± 0,02b	0,445 ± 0,02a	0,038 ± 0,002b	0,0767 ± 0,02b
24,968	Ornитина	0,092 ± 0,03a	0,076 ± 0,01a	0,036 ± 0,007ab	0,021 ± 0,008b
25,115	Glutamato	0,52 ± 0,08a	0,58 ± 0,01a	0,7 ± 0,12a	0,203 ± 0,04b
25,177	Fenilalanina	0,188 ± 0,03a	0,002 ± 0,001b	0,135 ± 0,02a	0,006 ± 0,002b
25,3775	Asparagina	0,108 ± 0,02a	0,026 ± 0,002b	0,02 ± 0,004b	0,004 ± 0,001b
28,488	Glutamina	0,375 ± 0,19b	1,331 ± 0,31a	0,595 ± 0,06b	0,599 ± 0,21b
30,667	Lisina	1,037 ± 0,28a	1,022 ± 0,18a	0,3 ± 0,02b	0,288 ± 0,08b
30,991	Cisteína	0,498 ± 0,06a	0,197 ± 0,05b	0,494 ± 0,05a	0,018 ± 0,003c
31,515	Histidina	1,001 ± 0,19a	0,391 ± 0,03bc	0,636 ± 0,06ab	0,251 ± 0,06c
31,858	Tirosina	2,336 ± 0,21a	1,857 ± 0,23a	1,86 ± 0,06a	1,005 ± 0,27b
36,849	Triptofano	0,012 ± 0,002a	0,0003 ± 0,0003b	0,009 ± 0,002a	0,0002 ± 0,0001b

Obs<sub>1</sub>: após ± o SEM de cada grupo é apresentado

Obs<sub>2</sub>: após o erro padrão, as letras representando as diferenças estatísticas

### 15.3.1.1. Impacto da restrição alimentar no perfil de aminoácidos

A ausência de alimento no grupo controle submetido ao jejum (C-) promoveu alterações marcantes no perfil de aminoácidos livres em larvas de *Ae. aegypti* em comparação ao grupo alimentado (C+), onde são observadas alterações em 14 dos 19 aminoácido identificados. O jejum provocou a redução de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, glicina, treonina,

fenilalanina, asparagina, cisteína, histidina e triptofano, além de gerar o aumento de aspartato e glutamina (Tabela 4).

A redução de alanina ( $0,662 \pm 0,15$  em C+ para  $0,185 \pm 0,02$  em C-), valina ( $0,123 \pm 0,03$  para  $0,006 \pm 0,005$ ), leucina ( $0,066 \pm 0,001$  para  $0,0013 \pm 0,001$ ) e isoleucina ( $0,164 \pm 0,01$  para  $0,026 \pm 0,01$ ) no grupo em jejum (C-) em comparação ao alimentado (C+) sugere uma mobilização coordenada desses aminoácidos para sustentar o metabolismo energético durante a carência de nutrientes. Enquanto valina, leucina e isoleucina constituem os aminoácidos de cadeia ramificada, catabolizados inicialmente nos tecidos periféricos e capazes de alimentar o ciclo do ácido cítrico via succinil-CoA ou acetil-CoA (Harper; Miller; Block, 1984; Neinast; Murashige; Arany, 2019), a alanina atua como um importante aminoácido glicogênico, participando do ciclo glicose-alanina, no qual é transaminada a piruvato e transporta grupos amino ao corpo gorduroso para neoglicogênese (Adeva-Andany et al., 2014; Felig et al., 1969; Felig, 1973). Assim, a queda simultânea desses quatro aminoácidos reflete a intensa utilização do esqueleto carbônico para geração de energia em condições de estresse metabólico, destacando a relevância desses compostos como substratos de rápida mobilização para manutenção da homeostase durante a privação alimentar.

De modo semelhante, a redução de prolina, glicina e treonina pode estar relacionada à sua mobilização como substratos oxidativos. Em mosquitos, a prolina tem papel central como combustível para o voo e para o metabolismo energético geral, sendo oxidada no ciclo do ácido cítrico (Scaraffia; Wells, 2003; Teulier et al., 2016). A glicina e a treonina, por sua vez, são importantes na manutenção do equilíbrio redox, atuando como doadores de carbono e nitrogênio em vias anapleróticas (Hubbard; Murray; Perdew, 2015). A queda desses aminoácidos sugere forte mobilização para sustentar vias de produção de energia e síntese de glutatona, especialmente em uma condição de estresse como o jejum.

A redução de fenilalanina, histidina e triptofano indica que aminoácidos aromáticos e essenciais também foram direcionados para metabolismo energético ou processos de adaptação ao estresse. Esses compostos são precursores de neurotransmissores e intermediários bioativos (Matthews, 2007; Wu, 2013; Xue et al., 2022), mas em situações de privação nutricional podem ser catabolizados para fornecer intermediários como fumarato e acetoacetato. O consumo de histidina, em especial, pode estar associado à sua conversão em glutamato via histidase e ao papel no balanço ácido-base (Wu, 2013).

A redução dos níveis de asparagina e cisteína nas larvas submetidas ao jejum indica a mobilização desses aminoácidos como fontes alternativas de energia em condições de limitação nutricional. A asparagina pode ser rapidamente hidrolisada a aspartato por ação da asparaginase, sendo posteriormente convertida em oxaloacetato, que atua como intermediário anaplerótico no ciclo do ácido cítrico, sustentando a geração de ATP em tecidos metabolicamente ativos (Yuan et al., 2024). Já a cisteína pode ser degradada a piruvato, entrando diretamente na via glicolítica ou no ciclo do ácido cítrico, além de contribuir para a manutenção do equilíbrio redox por meio da síntese de glutationa (Koirala; Moural; Zhu, 2022; Misra et al., 2011). Em insetos, essa mobilização adquire relevância adicional, uma vez que a rápida demanda energética durante o desenvolvimento larval exige fontes diversificadas de substratos, especialmente quando carboidratos e lipídios se tornam limitados (Scaraffia; Wells, 2003). Assim, a queda nos níveis de asparagina e cisteína reflete não apenas a utilização dessas moléculas para geração de energia, mas também uma adaptação metabólica essencial para garantir a sobrevivência durante períodos de escassez alimentar.

O aumento dos níveis de aspartato ( $0,047 \pm 0,02$  em C+ para  $0,445 \pm 0,02$  em C-) e glutamina ( $0,375 \pm 0,19$  para  $1,331 \pm 0,31$ ) em larvas de *Ae. aegypti* submetidas ao jejum de 24 horas sugere um rearranjo metabólico voltado para o equilíbrio do metabolismo de carbono e nitrogênio. A glutamina, reconhecida como principal forma de transporte e detoxificação de amônia em insetos, tende a se acumular em condições de catabolismo proteico, funcionando como um reservatório seguro de nitrogênio liberado pela degradação de outros aminoácidos (Scaraffia et al., 2005). Além disso, sua síntese está associada à ação da glutamina sintetase, enzima altamente responsiva a flutuações no balanço de nitrogênio, permitindo manter a homeostase durante períodos de limitação nutricional (Cruzat et al., 2018). O aspartato, por sua vez, pode se acumular como consequência da intensa atividade de transaminases, que canalizam nitrogênio proveniente do glutamato para oxaloacetato, produzindo aspartato como intermediário central na conexão entre metabolismo de aminoácidos, ciclo do ácido cítrico e biossíntese de nucleotídeos (Liu; Sutter; Tu, 2021). Assim, enquanto outros aminoácidos são rapidamente consumidos como substratos energéticos, a manutenção ou acúmulo de glutamina e aspartato reflete uma estratégia metabólica para manejar excedentes de nitrogênio e sustentar rotas anapleróticas essenciais durante o jejum.

De forma geral, os resultados demonstram que a restrição alimentar impõe às larvas de *Ae. aegypti* uma reprogramação metabólica caracterizada pela mobilização de múltiplos

aminoácidos como substratos energéticos e, simultaneamente, pelo acúmulo seletivo de glutamina e aspartato. Esse padrão evidencia um balanço dinâmico entre catabolismo e preservação de rotas-chave, no qual a degradação de aminoácidos essenciais e não essenciais sustenta a produção de energia e o equilíbrio redox, enquanto glutamina e aspartato atuam como pontos de convergência do metabolismo de carbono e nitrogênio, assegurando tanto a detoxificação de amônia quanto a reposição de intermediários do ciclo do ácido cítrico. Assim, o perfil observado reflete uma adaptação metabólica estratégica, que maximiza a utilização de recursos internos e garante a sobrevivência larval frente à escassez de nutrientes.

### **15.3.1.2. Efeitos do hidrato de morina em larvas alimentadas**

O tratamento com hidrato de morina em larvas de *Ae. aegypti* alimentadas (M+) provocou alterações claras no perfil de aminoácidos livres quando comparado ao controle alimentado (C+). Observou-se redução em aminoácidos como a valina ( $0,123 \pm 0,03$  em C+ para  $0,016 \pm 0,003$  em M+), glicina ( $0,29 \pm 0,03$  para  $0,096 \pm 0,02$ ), treonina ( $0,552 \pm 0,05$  para  $0,243 \pm 0,04$ ), asparagina ( $0,108 \pm 0,02$  para  $0,02 \pm 0,004$ ) e lisina ( $1,037 \pm 0,28$  para  $0,3 \pm 0,02$ ), indicando um impacto generalizado sobre a homeostase de aminoácidos.

A valina, um aminoácido de cadeia ramificada, desempenha papel central no fornecimento de energia para tecidos em crescimento rápido, podendo ser oxidada no ciclo do ácido cítrico após transaminação para  $\alpha$ -cetoácidos (Harper; Miller; Block, 1984). Sua redução em M+ sugere que o hidrato de morina pode ter acelerado o seu catabolismo para suprir energia, possivelmente em resposta a um estado metabólico de estresse imposto pelo flavonoide, como já observado em outros modelos animais expostos a compostos fenólicos (Panche; Diwan; Chandra, 2016). De forma similar, a lisina, um aminoácido essencial envolvido na síntese de proteínas estruturais e na modificação pós-traducional de histonas, apresentou níveis reduzidos em M+. Esse resultado é particularmente relevante, pois flavonoides podem interferir na absorção intestinal de aminoácidos essenciais através da interação com transportadores de membrana (Manach et al., 2004), sugerindo que o hidrato de morina pode ter limitado a biodisponibilidade de lisina mesmo na presença de dieta.

A glicina, envolvida na síntese de glutatona e no metabolismo de porfirinas e purinas (Wu, 2014), é também um importante aminoácido osmoprotetor em insetos (Locasale, 2013).

A glicina também participa da biossíntese de glutatona, essencial para o equilíbrio redox celular (Misra et al., 2011). A queda em M+ pode refletir maior consumo para sustentar mecanismos antioxidantes e de detoxificação, uma vez que flavonoides podem gerar desbalanço redox e demandar maior produção de glutatona reduzida (Sanz; Stefanatos, 2008). A treonina, precursora de glicina e acetil-CoA, também participa na manutenção do metabolismo energético e proteico. Sua redução sugere que a via de conversão para glicina e piruvato pode ter sido intensificada em M+, aumentando a drenagem desse aminoácido para suprir rotas metabólicas compensatórias (Kalhan; Hanson, 2012).

A asparagina é um aminoácido condicionalmente essencial em organismos de rápido crescimento, importante para o metabolismo nitrogenado e como forma de armazenamento e transporte de nitrogênio (Yuan et al., 2024). A redução de seus níveis pode estar relacionada à mobilização para síntese de aspartato e subsequente entrada no ciclo do ácido cítrico, reforçando a hipótese de que o hidrato de morina impôs uma maior dependência das larvas em substratos de aminoácidos para sustentar energia celular.

Além disso, a queda de aminoácidos em M+ dialoga com estudos que mostram o impacto de compostos fenólicos na absorção intestinal. Flavonoides são capazes de interagir com transportadores de aminoácidos e modular a permeabilidade da membrana, reduzindo a taxa de assimilação de nutrientes (Li; Paxton, 2013). Em larvas de mosquitos, já foi demonstrado que dietas contendo compostos fenólicos comprometem a eficiência digestiva e reduzem a taxa de crescimento (Barbehenn; Peter Constabel, 2011). Assim, é plausível que o hidrato de morina esteja interferindo tanto na absorção quanto no metabolismo subsequente desses compostos nitrogenados.

Em conjunto, os dados indicam que a morina, mesmo na presença de alimento, reduz o pool de aminoácidos essenciais e não essenciais em *Ae. aegypti*, impactando rotas de crescimento, manutenção da barreira intestinal e metabolismo intermediário. Essa ação sugere um efeito metabólico profundo que pode comprometer a capacidade das larvas de acumular reservas para o desenvolvimento subsequente.

### **15.3.1.3 Sinergia entre jejum e hidrato de morina**

No grupo de larvas submetidas simultaneamente à ausência de alimento e ao tratamento com hidrato de morina (M-), observou-se um perfil ainda mais acentuado de depleção de aminoácidos quando comparado ao controle em jejum (C-). Glicina ( $0,13 \pm 0,03$  em C- para  $0,033 \pm 0,01$  em M-), aspartato ( $0,445 \pm 0,02$  para  $0,0767 \pm 0,02$ ), glutamato ( $0,58 \pm 0,01$  para  $0,203 \pm 0,04$ ), glutamina ( $1,331 \pm 0,31$  para  $0,599 \pm 0,21$ ), lisina ( $1,022 \pm 0,18$  para  $0,288 \pm 0,08$ ), cisteína ( $0,197 \pm 0,05$  para  $0,018 \pm 0,003$ ) e tirosina ( $1,857 \pm 0,23$  para  $1,005 \pm 0,27$ ) apresentaram reduções expressivas, revelando um efeito sinérgico entre a restrição alimentar e a presença do flavonoide. Esses dados indicam que houve impacto intensificado pelo hidrato de morina que afetou a disponibilidade de compostos nitrogenados.

O aspartato e o glutamato desempenham papéis centrais no metabolismo energético e nitrogenado, participando diretamente do ciclo do ácido cítrico, da transaminação e como substratos para a síntese de outros aminoácidos e nucleotídeos (Cooper; Jeitner, 2016). Em condições de jejum, ambos já tendem a ser mobilizados para sustentar a gliconeogênese e a produção de energia. Contudo, a queda mais acentuada em M- indica que o hidrato de morina pode ter exacerbado a drenagem dessas vias, seja por aumento da demanda energética ou por comprometimento da homeostase redox, uma vez que flavonoides são conhecidos moduladores do metabolismo mitocondrial e podem afetar a atividade de enzimas chave do ciclo do ácido cítrico (Kicinska; Jarmuszkiewicz, 2020; Sanz; Stefanatos, 2008).

A glutamina, por sua vez, é um aminoácido altamente versátil, atuando como doador de nitrogênio para síntese de nucleotídeos, precursor de glutamato e substrato importante para células de alta taxa proliferativa (Cruzat et al., 2018; Wu, 2013). Sua redução em M- sugere que o hidrato de morina pode ter acelerado sua conversão em glutamato e, consequentemente, em intermediários do ciclo do ácido cítrico, ampliando a depleção já induzida pelo jejum. Esse esgotamento pode comprometer processos anabólicos essenciais ao crescimento larval, como síntese de proteínas e ácidos nucleicos.

A tirosina, aminoácido aromático derivado da fenilalanina, além de compor proteínas estruturais, também é precursora de catecolaminas e quinonas envolvidas na melanização, processo crucial para a imunidade de insetos (Nappi; Christensen, 2005). A redução de seus níveis no grupo M- pode refletir tanto uma maior utilização para sustentar respostas de estresse oxidativo, possivelmente intensificadas pela ação do hidrato de morina (Gautam; Sharma;

Trivedi, 2023), quanto um redirecionamento para a produção de metabólitos fenólicos envolvidos na defesa.

A redução de cisteína, glicina e serina em M- reforça a hipótese de que esses aminoácidos estejam sendo consumidos preferencialmente em rotas de sobrevivência celular. Ambos integram o ciclo do carbono de um só e são cruciais para síntese de nucleotídeos, o que é essencial para a manutenção de células em divisão, mesmo em condições de escassez (Locasale, 2013). Estudos com *D. melanogaster* demonstraram que a privação alimentar leva à reprogramação do metabolismo de um carbono e ao redirecionamento de cisteína, serina e glicina para a síntese de glutatona, protegendo contra estresse oxidativo induzido pelo jejum (Misra et al., 2011). No grupo M-, a adição da morina parece intensificar esse desvio, diminuindo ainda mais a concentração detectável desses aminoácidos no metaboloma.

Outro ponto importante é que a presença do flavonoide pode ter reduzido ainda mais a eficiência de absorção residual de aminoácidos. Estudos mostram que polifenóis inibem transportadores intestinais e reduzem a taxa de recuperação de nutrientes mesmo quando estes estão em baixas concentrações (Barbehenn; Peter Constabel, 2011; Li; Paxton, 2013). Isso ajuda a explicar porque, em M-, a queda foi mais acentuada do que em C-, sugerindo que a morina age de forma aditiva ou sinérgica ao jejum, comprometendo tanto a captação quanto a conservação interna dos aminoácidos.

Portanto, a redução conjunta desses aminoácidos em M- sugere que o hidrato de morina não apenas reforçou o impacto do jejum sobre o metabolismo basal, mas também pode ter induzido um desbalanço no metabolismo nitrogenado e oxidativo das larvas. Esse efeito pode contribuir para o enfraquecimento da sobrevivência e da capacidade de desenvolvimento, reforçando a vulnerabilidade metabólica de *Ae. aegypti* frente à combinação de estresse nutricional e exposição ao flavonoide.

#### **15.3.1.4 Aminoácidos energéticos e rotas de detoxificação**

Os aminoácidos relacionados ao metabolismo energético e à defesa antioxidante apresentaram alterações consistentes entre os tratamentos. Os que são destacados abaixo são os que são associados comumente ao metabolismo energético e a reações antioxidantes.

O glutamato, por exemplo, manteve níveis relativamente altos em C+ ( $0,52 \pm 0,08$ ), em C- ( $0,58 \pm 0,01$ ) e, principalmente, em M+ ( $0,7 \pm 0,12$ ), mas sofreu uma grande queda em M- ( $0,203 \pm 0,04$ ). O papel central do glutamato em insetos está ligado tanto ao metabolismo energético quanto à neurotransmissão. Esse aminoácido é precursor direto de  $\alpha$ -cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico, permitindo a conexão entre metabolismo de aminoácidos e produção de energia (Clements, 2011; Nation, 2016). Níveis reduzidos de glutamato sob jejum estão associados à mobilização de reservas energéticas e à reprogramação do metabolismo central para sustentar a sobrevivência (Zhang et al., 2019). A queda observada em M- sugere que além do jejum, o flavonoide pode ter comprometido a capacidade de manter fluxos adequados no ciclo do ácido cítrico.

A glutamina apresentou um padrão de ocorrência muito particular. Apresentou manutenção dos seus níveis em C+ ( $0,375 \pm 0,19$ ), M+ ( $0,595 \pm 0,06$ ) e M- ( $0,599 \pm 0,21$ ), porém, se mostrou significativamente aumentada em C- ( $1,331 \pm 0,31$ ), o que sugere acúmulo decorrente da captação de nitrogênio livre resultante da degradação proteica em jejum. Esse fenômeno já foi descrito em mosquitos e outros insetos, nos quais a glutamina atua como forma de transporte e armazenamento de nitrogênio sob estresse nutricional (Scaraffia, 2016; Scaraffia et al., 2005; Timmermann; Briegel, 1999). Contudo, nos grupos tratados com morina os valores retornaram a patamares mais baixos, próximos aos do controle alimentado. Isso sugere que as aminas derivadas da degradação proteica não foram canalizadas para formação de glutamina, mas redirecionadas para outras vias metabólicas, possivelmente ligadas à detoxificação e conjugação de compostos fenólicos (Ahmad; Pardini, 1990; Misra et al., 2011). Portanto, enquanto em C- a glutamina parece desempenhar papel central na homeostase nitrogenada, em M- a morina altera esse equilíbrio, desviando o nitrogênio para rotas de defesa metabólica.

No caso da prolina, além de sua função estrutural, ela tem papel relevante como combustível em insetos. Os dados observados nos grupos alimentados se mostraram muito superiores aos grupos em jejum. No grupo C+ foi observado  $0,621 \pm 0,15$  e em M+ foi observado  $0,603 \pm 0,19$ , enquanto que em C- ocorreu  $0,029 \pm 0,003$  e em M-  $0,103 \pm 0,02$ . Diversas espécies utilizam a prolina como substrato energético preferencial em tecidos com alta demanda, como músculo de voo (Briegel; Knüsel; Timmermann, 2001; Teulier et al., 2016). Embora larvas de *Ae. aegypti* não apresentem voo, a prolina também pode ser direcionada para rotas anapleróticas, alimentando o ciclo do ácido cítrico ou para a musculatura responsável pelo movimento natatorial (Scaraffia; Wells, 2003). A redução de prolina nos grupos em jejum

indica que esse aminoácido pode estar sendo rapidamente mobilizado como substrato energético não sendo afetado pelo hidrato de morina, mas sim pela ausência de nutrientes.

O aspartato apresentou valores relativamente baixos em C+ ( $0,047 \pm 0,02$ ), mas um aumento expressivo em C– ( $0,445 \pm 0,02$ ), voltando a níveis reduzidos em M+ ( $0,038 \pm 0,002$ ) e M– ( $0,0767 \pm 0,02$ ). Esse padrão sugere que o acúmulo de aspartato em C– pode estar associado a um gargalo metabólico decorrente da intensificação do ciclo do ácido cítrico, já que o aspartato é precursor direto do oxaloacetato por transaminação (Clements, 2011). Em insetos sob jejum, a mobilização de aminoácidos glicogênicos para sustentar a produção energética é amplamente relatada (Scaraffia et al., 2005). Assim, o aumento de aspartato em C– sugere utilização ampliada de aminoácidos como fonte de anaplerose para o ciclo do ácido cítrico.

Outra possível explicação é a maior participação do aspartato no metabolismo de nitrogênio e na biossíntese de nucleotídeos que são particularmente ativos durante o jejum e em condições de estresse, quando produtos nitrogenados precisam ser rapidamente redistribuídos para manter o equilíbrio celular (Isoe; Scaraffia, 2013; Scaraffia et al., 2005) A ausência de acúmulo em M– sugere que a morina redireciona o fluxo do aspartato para outras rotas, possivelmente ligadas à conjugação de compostos fenólicos ou a ajustes redox, reduzindo sua disponibilidade para sustentar a anaplerose.

A cisteína apresentou níveis detectáveis em C+ ( $0,498 \pm 0,06$ ), com redução em C– ( $0,197 \pm 0,05$ ), manutenção em M+ ( $0,494 \pm 0,05$ ) e queda acentuada em M– ( $0,103 \pm 0,02$ ). Esse comportamento é consistente com seu papel como substrato energético e precursor essencial na síntese de glutationa, um dos principais antioxidantes celulares em insetos. A glutationa atua provendo energia, porém, também é associado tanto no controle de ROS quanto na detoxificação de xenobióticos (Ahmad; Pardini, 1990; Frampton et al., 2006). A diminuição dos níveis de cisteína, glicina e glutamato em condições de jejum e, sobretudo, sob tratamento com morina, indica provável utilização intensificada dessa via.

Estudos em *D. melanogaster* mostraram que a depleção de cisteína está diretamente ligada ao aumento da síntese de glutationa em resposta a compostos fenólicos e pesticidas (Koirala; Moural; Zhu, 2022; Misra et al., 2011). Em mosquitos, a atividade das enzimas GSTs, dependentes de cisteína e glutationa, é um dos mecanismos-chave para lidar com estresse oxidativo e detoxificação de xenobióticos (Hemingway; Ranson, 2000; Rivero et al., 2011). Dessa forma, a queda de cisteína em M– sugere que a morina atua como indutor de estresse

oxidativo, aumentando a demanda por glutatona e, consequentemente, o consumo de seu precursor.

Em conjunto, os resultados sugerem que aminoácidos tradicionalmente associados ao metabolismo energético e à defesa antioxidante são intensamente mobilizados em *Ae. aegypti* sob jejum, e que o tratamento com morina intensifica essa mobilização. Isso pode comprometer a disponibilidade de intermediários para o ciclo do ácido cítrico e reduzir a capacidade antioxidante das larvas, afetando seu desenvolvimento e sobrevivência.

### 15.3.2 Perfil de ácidos orgânicos: bioenergética e rotas centrais

Foi detectado um número ligeiramente menor de ácidos orgânicos, quando comparados com os aminoácidos. No total foram identificados 15 ácidos orgânicos: ácido lático, ácido oxaloacético, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido piroglutâmico, ácido málico, ácido 2-oxoglutárico, ácido fosfórico, ácido propanoico, ácido cítrico, ácido glucônico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido xanturênico (Tabela 5). A maior parte deles está relacionado ao metabolismo energético (ácido lático, ácido oxaloacético, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido 2-oxoglutárico e ácido cítrico), outros estão relacionados ao metabolismo de aminoácidos (ácido piroglutâmico e ácido xanturênico), dois estão envolvidos com o metabolismo de carboidratos (ácido glucônico e ácido fosfórico) e dois são ácidos graxos (ácido palmítico e ácido esteárico), além do ácido propanoico (propionato) que é produto da oxidação dos ácidos graxos.

Tabela 5 Ácidos orgânicos identificados na análise relativa do perfil metabólico.

TR médio	Compostos identificados	C+	C-	M+	M-
9,528	Ácido lático	1,81 ± 0,3a	0,915 ± 0,13b	0,972 ± 0,18b	0,2974 ± 0,11c
12,132	Ácido oxaloacético	0,063 ± 0,007a	0,025 ± 0,003b	0,055 ± 0,007a	0,031 ± 0,004b
12,219	Ácido pirúvico	0,048 ± 0,01	0,044 ± 0,02	0,029 ± 0,007	0,016 ± 0,005
17,246	Ácido succínico	0,335 ± 0,04a	0,098 ± 0,005b	0,231 ± 0,03a	0,107 ± 0,02b
18,14	Ácido fumárico	0,029 ± 0,001a	0,02 ± 0,001b	0,027 ± 0,001a	0,006 ± 0,001c
21,976	Ácido piroglutâmico	0,003 ± 0,005b	*	0,027 ± 0,005a	0,022 ± 0,1a
22,051	Ácido málico	0,882 ± 0,05a	0,387 ± 0,04b	0,681 ± 0,038a	0,272 ± 0,06b

24,101	Ácido 2-oxoglutárico	0,939 ± 0,1a	0,582 ± 0,21b	0,939 ± 0,13a	0,451 ± 0,1b
28,787	Ácido fosfórico	0,041 ± 0,01b	0,078 ± 0,01b	0,159 ± 0,02a	0,165 ± 0,02a
29,444	Ácido propanoico	0,026 ± 0,003b	0,025 ± 0,003b	0,102 ± 0,02a	0,085 ± 0,02a
29,632	Ácido cítrico	0,244 ± 0,1b	0,651 ± 0,13a	0,314 ± 0,12b	0,736 ± 0,25a
32,695	Ácido glucônico	0,023 ± 0,01	0,024 ± 0,008	0,016 ± 0,005	0,008 ± 0,003
33,574	Ácido palmítico	0,047 ± 0,02a	0,003 ± 0,001b	0,049 ± 0,001a	0,027 ± 0,008b
37,082	Ácido esteárico	0,017 ± 0,006	0,012 ± 0,001	0,016 ± 0,002	0,009 ± 0,002
37,734	Ácido xanturênico	0,042 ± 0,01	0,043 ± 0,01	0,034 ± 0,008	0,024 ± 0,004

Obs1: após ± o erro padrão de cada grupo é apresentado

Obs2: após o erro padrão, as letras representando as diferenças estatísticas

\* não identificado em nenhuma das réplicas

De maneira geral, o perfil de ácidos orgânicos em larvas de *Ae. aegypti* mostrou padrões distintos em resposta ao jejum e ao tratamento com morina. Os compostos associados ao metabolismo energético, como ácido láctico (lactato), ácido oxaloacético (oxaloacetato), ácido pirúvico (piruvato), ácido succínico (succinato), ácido fumárico (fumarato), ácido málico (malato), ácido 2-oxoglutárico ( $\alpha$ -cetoglutarato) e ácido cítrico (citrato) foram particularmente sensíveis às condições experimentais, refletindo ajustes diretos na glicólise, na fermentação e no ciclo do ácido cítrico. Além disso, metabólitos relacionados ao catabolismo de aminoácidos, como ácido piroglutâmico (5-oxoprolina), também apresentaram alterações relevantes, sugerindo mudanças na conexão entre metabolismo nitrogenado e energético. Ácidos ligados ao metabolismo de carboidratos, como o glucônico e o fosfórico, e os ácidos graxos detectados (palmítico e esteárico) completam esse panorama, indicando que múltiplas rotas metabólicas foram moduladas de forma coordenada. Esse conjunto de resultados aponta para uma reorganização ampla do metabolismo intermediário, em que tanto a restrição nutricional quanto a exposição à morina atuam como fatores que remodelam os fluxos metabólicos.

Essas variações refletem ajustes metabólicos associados tanto à privação alimentar quanto à exposição ao hidrato de morina. Em insetos, os níveis de ácidos orgânicos são altamente dinâmicos, respondendo rapidamente a mudanças na oferta de substratos energéticos e na atividade de vias oxidativas (Nation, 2016; Scaraffia; Wells, 2003). A redução dos intermediários do ciclo do ácido cítrico sugere maior utilização anaplerótica desses compostos em condições de estresse nutricional, enquanto a queda do lactato pode indicar um

redirecionamento metabólico para maximizar a eficiência energética. Esse panorama global evidencia que tanto o jejum quanto a presença do flavonoide induzem reorganizações profundas no metabolismo energético das larvas de *Ae. aegypti*.

### **15.3.2.1 Alterações na glicólise e fermentação**

A análise metabolômica revelou diferenças significativas nos níveis relativos de lactato, porém, não apresentou no ácido pirúvico entre os grupos experimentais avaliados. As larvas do grupo controle alimentado (C+) apresentaram a maior abundância de ácido lático ( $1,81 \pm 0,3$ ), enquanto valores intermediários foram observados em C– ( $0,915 \pm 0,13$ ) e M+ ( $0,972 \pm 0,18$ ). O grupo tratado com morina e privado de alimento (M–) exibiu a menor concentração ( $0,2974 \pm 0,11$ ). Esses resultados demonstram que a disponibilidade de nutrientes e a exposição ao hidrato de morina influenciam fermentativo nas larvas de *Ae. aegypti* sem afetar o produto final da glicólise.

A ausência de diferenças significativas nos níveis de piruvato sugere que, embora a glicólise prossiga até sua etapa final, a regulação subsequente do destino metabólico desse intermediário é o ponto de maior sensibilidade às condições experimentais. Em insetos, o piruvato pode ser direcionado para múltiplas vias, incluindo a fermentação láctica, a oxidação via ciclo do ácido cítrico ou a conversão em alanina e outros metabólitos (Khrapunov et al., 2021; Petchampai et al., 2019). Assim, a estabilidade relativa de suas concentrações pode refletir um equilíbrio dinâmico entre rotas metabólicas concorrentes, enquanto o lactato, como produto terminal da fermentação, expressa de forma mais direta as variações no fluxo fermentativo.

O padrão observado indica que a alimentação sustenta a atividade da lactato desidrogenase, resultando em maior acúmulo de lactato, fenômeno já descrito em tecidos de *Drosophila melanogaster* em condições de abundância nutricional (Tennessee et al., 2011). Em contraste, a privação alimentar reduziu significativamente as concentrações desse metabólito, corroborando evidências de que o jejum força larvas de mosquitos a recorrerem às reservas lipídicas como fonte energética, diminuindo a dependência da fermentação de glicose (Arrese; Soulages, 2010).

O efeito do hidrato de morina é particularmente relevante, pois reduziu os níveis de lactato mesmo quando havia disponibilidade de ração (M+). Esse resultado sugere que o flavonoide interfere na disponibilidade energética e, consequentemente, reduzindo estoques energéticos de curto prazo. Além disso, como observado anteriormente, o hidrato de morina altera o metabolismo lipídico em *Ae. aegypti*, comprometendo a utilização eficiente das reservas lipídios, proteínas e carboidratos (Figuras 24 e 25), limitando a flexibilidade metabólica necessária para sustentar a fermentação em condições de estresse.

Resultados semelhantes foram encontrados em larvas expostas a inseticidas, nas quais a redução do metabolismo glicolítico foi acompanhada por alteração no perfil energético global (Singh et al., 2022). Além disso, a supressão da helicase Dhx15 em células de *Ae. aegypti* demonstrou que a diminuição da expressão de genes glicolíticos está diretamente associada à redução da produção de lactato, sem alterar significativamente o piruvato intracelular (Machado et al., 2022). Esses achados reforçam que o lactato é um marcador sensível de ajustes metabólicos em resposta a fatores ambientais ou químicos, ao passo que o piruvato tende a manter-se em níveis relativamente estáveis devido à sua centralidade no metabolismo intermediário. Portanto, os resultados obtidos indicam que a interferência do hidrato morina, somada à privação nutricional, compromete diretamente a fermentação lática, limitando sua capacidade de gerar energia rápida por meio dessa via.

### **15.3.2.2 Ciclo do ácido cítrico**

Os intermediários do ciclo do ácido cítrico mostraram alterações marcantes entre os grupos experimentais, refletindo ajustes nas rotas oxidativas frente ao jejum e ao tratamento com morina. O  $\alpha$ -cetoglutarato apresentou níveis de ocorrência maiores nos grupos alimentados com ração ( $0,939 \pm 0,1$  em C+ e  $0,939 \pm 0,13$  em M+), enquanto que os grupos em jejum apresentaram redução independente do tratamento com hidrato de morina ( $0,582 \pm 0,21$  em C- e  $0,451 \pm 0,1$  em M-). O succinato foi mais abundante no grupo C+ ( $0,335 \pm 0,04$ ) e sofreu quedas progressivas no jejum ( $0,098 \pm 0,005$ ) e em M- ( $0,107 \pm 0,02$ ), sugerindo maior utilização dessa molécula para sustentar o fluxo anaplerótico do ciclo. O fumarato, por outro lado, foi detectado em níveis muito baixos em todos os tratamentos, porém, com redução significativa sob jejum ( $0,029 \pm 0,001$  em C+ para  $0,02 \pm 0,001$  em C-), se intensificando mais ainda com adição do hidrato de morina ( $0,006 \pm 0,001$  em M-). Reforçando sua condição de

intermediário transitório rapidamente convertido em malato, que, por sua vez, apresentou redução significativa em C- e M- (de  $0,882 \pm 0,05$  em C+ para  $0,387 \pm 0,04$  e  $0,0272 \pm 0,06$ , respectivamente), indicando mobilização acelerada dessa molécula para regeneração de oxaloacetato, que também apresentou comportamento similar (redução de  $0,063 \pm 0,007$  em C+ para  $0,025 \pm 0,003$  em C- e  $0,031 \pm 0,004$  em M-).

O citrato, molécula que marca a entrada de acetil-CoA no ciclo, apresentou comportamento distinto, mantendo-se relativamente estável entre os grupos alimentados ( $0,244 \pm 0,1$  em C+ e  $0,314 \pm 0,12$  em M+) e elevando-se nos grupos sub jejum ( $0,651 \pm 0,13$  em C- e  $0,736 \pm 0,25$  em M-), o que pode indicar um gargalo em função da alta síntese decorrente da intensificação da mobilização de reservas endógenas que alimentam a produção de acetil-CoA, resultando em maior fluxo pela citrato sintase e consequente acúmulo desse intermediário. Esse fenômeno já foi descrito em insetos submetidos à restrição alimentar, nos quais a oxidação de substratos alternativos leva ao incremento de citrato como marcador de maior atividade oxidativa e de redirecionamento metabólico para sustentar a produção energética (Scaraffia; Wells, 2003; Tennessen et al., 2011). Assim, o aumento do citrato nos grupos em jejum reflete principalmente a intensificação do fluxo energético derivado da quebra de reservas, sem um efeito direto da morina sobre essa via.

Na literatura, o succinato é reconhecido não apenas como intermediário energético, mas também como molécula sinalizadora envolvida na regulação de vias de resposta ao estresse em insetos (Tennessen et al., 2011). A queda observada sugere que a combinação de jejum e morina pode limitar esse papel duplo. O malato, por sua vez, está intimamente ligado à regeneração de NADH e à sustentação da fosforilação oxidativa, sendo fundamental para o balanço energético larval (Scaraffia; Wells, 2003). A redução consistente desse metabólito em condições de estresse aponta para uma limitação na capacidade oxidativa das larvas.

Em conjunto, os resultados indicam que o ciclo do ácido cítrico é fortemente impactado tanto pelo jejum, com redução de intermediários essenciais e possíveis bloqueios parciais em etapas-chave. Isso implica não apenas em menor geração de equivalentes redutores para a cadeia respiratória, mas também em limitações no fornecimento de precursores biossintéticos, comprometendo a homeostase metabólica das larvas. Em todos os casos, o hidrato de morina não apareceu como um modulador dentre esses compostos, tendo apenas papéis secundários aqui.

### **15.3.2.3 Associações com o metabolismo de aminoácidos**

Entre os ácidos orgânicos relacionados ao metabolismo de aminoácidos, foram identificados o ácido piroglutâmico e o ácido xanturênico (Tabela 5). O ácido xanturênico não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, mantendo níveis próximos em C+ ( $0,042 \pm 0,01$ ), C– ( $0,043 \pm 0,01$ ), M+ ( $0,034 \pm 0,008$ ) e M– ( $0,024 \pm 0,004$ ). Por outro lado, o ácido piroglutâmico exibiu um padrão distinto, com baixa detecção em C+ ( $0,003 \pm 0,005$ b) e ausência em C–, mas aumento expressivo nos grupos tratados com morina, tanto em M+ ( $0,027 \pm 0,005$ a) quanto em M– ( $0,022 \pm 0,1$ a).

O ácido piroglutâmico, também conhecido como 5-oxoprolina, é formado a partir do metabolismo do glutamato e glutamina, bem como do turnover da glutationa (Koirala; Moural; Zhu, 2022; Lv et al., 2019). Sua elevação em larvas expostas ao hidrato de morina sugere uma intensificação da utilização da via da glutationa, que pode estar sendo recrutada para sustentar a defesa antioxidante frente ao estresse oxidativo induzido por compostos fenólicos. Esse padrão é consistente com trabalhos que mostram o acúmulo de piroglutamato em insetos e outros organismos submetidos a condições de maior demanda redox, nas quais a reciclagem da glutationa se torna crítica para neutralizar espécies reativas de oxigênio (Franco; Cidlowski, 2012; Kumar et al., 2003). Dessa forma, os resultados reforçam a hipótese de que o hidrato de morina promove desequilíbrios oxidativos, induzindo a mobilização de rotas ligadas à glutationa.

Já o ácido xanturênico, derivado do metabolismo do triptofano pela via da quinurenina, é reconhecido em insetos por desempenhar funções diversas, incluindo regulação imune e modulação do estresse oxidativo (Dillon; Dillon, 2004; Hubbard; Murray; Perdew, 2015; Pawlak et al., 2002). Além disso, tem sido descrito como indutor do desenvolvimento do *Plasmodium* no intestino de mosquitos, relacionando-se diretamente com a competência vetorial (Billker et al., 1998). No entanto, a ausência de diferenças significativas entre os grupos em nosso estudo sugere que o metabolismo do triptofano via ácido xanturênico não foi substancialmente modulado nem pelo jejum nem pela exposição à morina. Isso indica que, ao contrário do piroglutâmico, o xanturênico pode não ser um marcador sensível das alterações metabólicas observadas neste contexto experimental.

Em síntese, enquanto o ácido xanturênico manteve-se estável entre os tratamentos, o aumento do ácido piroglutâmico nos grupos tratados com hidrato de morina aponta para um

papel central da via da glutationa no enfrentamento do estresse oxidativo induzido por esse composto.

#### **15.3.2.4 Metabolismo de carboidratos**

A análise metabolômica revelou que o ácido glucônico não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo que essa via não foi substancialmente modulada pelo jejum ou pela exposição ao hidrato de morina. O ácido glucônico resulta da oxidação da glicose, sendo um intermediário associado à via das pentoses-fosfato e à geração de NADPH, essencial para processos biossintéticos e defesa antioxidante (Mattila; Hietakangas, 2017; Nation, 2016). A estabilidade dos níveis observados pode indicar que, mesmo sob estresse nutricional ou químico, o fluxo basal da glicose oxidase e da via das pentoses é mantido, provavelmente para assegurar o fornecimento de poder redutor necessário à manutenção da homeostase celular, como já relatado em insetos submetidos a estresse oxidativo (Scaraffia; Wells, 2003).

Em contraste, o ácido fosfórico apresentou variação significativa entre os tratamentos, com níveis mais elevados em grupos tratados com hidrato de morina ( $0,159 \pm 0,02$  em M+ e  $0,165 \pm 0,02$  em M-) em comparação aos respectivos controles ( $0,041 \pm 0,01$  em C+ e  $0,078 \pm 0,01$  em C-). O ácido fosfórico está diretamente ligado ao metabolismo energético, participando de processos fundamentais como a fosforilação de açúcares (formação de glicose-6-fosfato, por exemplo), o turnover de ATP/ADP e a modificação pós-traducional de proteínas por fosforilação (Berg et al., 2019; Tennesen et al., 2011). O aumento observado na presença do hidrato de morina pode refletir um alto turnover energético, compatível com a maior demanda por fosforilação de proteínas regulatórias durante a resposta ao estresse metabólico induzido. Além disso, esse padrão pode estar relacionado à ativação de rotas redox dependentes da via da glutationa, como forma de enfrentar o estresse oxidativo associado ao tratamento (Koirala; Moural; Zhu, 2022; Misra et al., 2011).

De forma integrada, esses resultados sugerem que, enquanto o metabolismo do ácido glucônico permanece estável para garantir suporte mínimo ao balanço redox, o ácido fosfórico funciona como um marcador mais sensível da pressão metabólica exercida pelo hidrato de morina, indicando que o composto intensifica a mobilização de vias dependentes de

fosforilação, tanto em larvas alimentadas quanto em jejum. Assim, o ácido fosfórico pode ser interpretado como um indicador do desequilíbrio energético e regulatório imposto pela exposição ao flavonoide.

### 15.3.2.5 Ácidos graxos

A análise dos ácidos graxos e um derivado revelou padrões distintos entre os tratamentos. O ácido palmítico apresentou níveis significativamente mais elevados nos grupos alimentados ( $0,047 \pm 0,02$  em C+ e  $0,049 \pm 0,001$  em M+), em comparação aos grupos em jejum ( $0,003 \pm 0,001$  em C- e  $0,027 \pm 0,008$  em M-). Esse resultado indica que a presença de dieta é o fator determinante para o acúmulo desse ácido graxo, independentemente da exposição ao hidrato de morina. Por se tratar de um ácido graxo saturado de 16 carbonos amplamente distribuído em membranas biológicas e em reservas lipídicas de insetos, sua maior disponibilidade nos grupos alimentados reflete o aporte nutricional direto proveniente da ração, corroborando estudos que apontam o ácido palmítico como um dos principais componentes dos estoques energéticos de mosquitos (Arrese; Soulages, 2010; Canavoso et al., 2001).

O ácido esteárico, por sua vez, não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, sugerindo que seu metabolismo em larvas de *Ae. aegypti* é menos responsivo tanto ao jejum quanto à exposição ao hidrato de morina. Esse padrão pode estar associado ao papel mais estrutural desse ácido graxo de 18 carbonos em membranas celulares, com menor mobilização metabólica frente a variações de dieta, conforme relatado em perfis lipídicos de outros insetos (Majerowicz; Gondim, 2013; Stanley-Samuelson et al., 1988).

Já o ácido propanoico apresentou elevação significativa nos grupos expostos ao hidrato de morina ( $0,102 \pm 0,02$  em M+ e  $0,085 \pm 0,02$  em M-) em relação aos controles ( $0,026 \pm 0,003$  em C+ e  $0,025 \pm 0,003$  em C-). Esse resultado sugere que a presença do flavonoide pode ter interferido em rotas metabólicas associadas à degradação de aminoácidos e carboidratos, resultando na maior produção desse ácido de cadeia curta. Estudos prévios indicam que o ácido propanoico pode se originar do catabolismo de aminoácidos como a valina e do metabolismo secundário de carboidratos, sendo frequentemente associado a condições de estresse metabólico (Halarnkar; Blomquist, 1989; Zhang et al., 2019b). Assim, o aumento observado pode refletir

uma disfunção metabólica desencadeada pela ação do hidrato de morina, levando à ativação de vias alternativas para suprimento energético.

Em conjunto, esses resultados indicam que, enquanto o ácido palmítico responde primariamente à disponibilidade de dieta, o ácido esteárico se mantém estável frente às condições experimentais, e o ácido propanoico se destaca como um possível biomarcador da ação do hidrato de morina sobre o metabolismo larval de *Ae. aegypti*.

### 15.3.3 Compostos nitrogenados e carboidratos

Os compostos nitrogenados e carboidratos desempenham papel central na manutenção da homeostase metabólica em insetos, atuando tanto no fornecimento de energia quanto na regulação de processos fisiológicos essenciais. Enquanto os carboidratos representam a principal fonte energética e estão diretamente ligados à mobilização das reservas de glicogênio e à regulação da glicemia via hemolinfa, os compostos nitrogenados refletem a dinâmica do metabolismo proteico, incluindo processos de desaminação, detoxificação e produção de poliaminas, fundamentais para crescimento e diferenciação celular (Berg et al., 2019; Nation, 2016). Assim, alterações nesses metabólitos podem indicar ajustes finos na forma como os insetos lidam com estresses nutricionais e químicos.

Na presente análise foram identificados sete compostos principais: dois nitrogenados (ureia e putrescina) e cinco carboidratos (glicose, manose, mio-inositol, trealose e maltose), além do eritro-hexofuranose, que se relaciona ao metabolismo de açúcares (Tabela 5). Esses compostos representam pontos-chave do balanço energético e da regulação nitrogenada, permitindo avaliar como o jejum e a exposição à morina modulam a homeostase larval.

#### 15.3.3.1 Metabolismo do nitrogênio

Foram detectados dois compostos principais associados ao metabolismo do nitrogênio: ureia e putrescina (Tabela 6). A ureia apresentou maior concentração nos grupos alimentados ( $0,367 \pm 0,05$  em C+ e  $0,279 \pm 0,03$  em M+), mas sofreu redução significativa no grupo em jejum ( $0,142 \pm 0,02$ ) e valores ainda mais baixos foram observados no grupo tratado com

hidrato de morina sob jejum ( $0,023 \pm 0,009$ ). Já a putrescina não apresentou diferenças estatísticas.

**Tabela 6. Compostos nitrogenados e carboidratos identificados na análise relativa do perfil metabólico.**

TR médio	Compostos identificados	C+	C-	M+	M-
15,155	Ureia	$0,367 \pm 0,05a$	$0,142 \pm 0,02b$	$0,279 \pm 0,03a$	$0,023 \pm 0,009c$
27,609	Putrecina	$0,071 \pm 0,03$	$0,066 \pm 0,02$	$0,075 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,01$
29,855	Eritrotetofuranose	$0,031 \pm 0,01$	$0,052 \pm 0,001$	$0,037 \pm 0,01$	$0,016 \pm 0,008$
31,416	Glicose	$2,218 \pm 0,41a$	$1,078 \pm 0,23b$	$1,604 \pm 0,23ab$	$0,568 \pm 0,1c$
31,758	Manose	$0,772 \pm 0,17a$	$0,679 \pm 0,06a$	$0,307 \pm 0,05b$	$0,213 \pm 0,05b$
34,977	Mio-inusitol	$0,031 \pm 0,02$	$0,024 \pm 0,001$	$0,025 \pm 0,005$	$0,024 \pm 0,01$
45,669	Trealose	$4,429 \pm 0,47a$	$1,396 \pm 0,14c$	$2,667 \pm 0,12b$	$1,083 \pm 0,19c$
46,069	Maltose	$0,143 \pm 0,02a$	$0,015 \pm 0,005b$	$0,027 \pm 0,005b$	$0,003 \pm 0,002b$

Obs1: após  $\pm$  o erro padrão de cada grupo é apresentado

Obs2: após o erro padrão, as letras representando as diferenças estatísticas

A presença de ureia em insetos está associada principalmente à excreção de nitrogênio excedente resultante da degradação de aminoácidos (Nation, 2016; Scaraffia; Wells, 2003). Os níveis mais altos nos grupos alimentados refletem maior disponibilidade de substratos nitrogenados provenientes da dieta. Em contraste, o jejum reduz a produção de ureia, possivelmente porque os aminoácidos passam a ser direcionados preferencialmente para a geração de energia, limitando a desaminação e, consequentemente, a formação desse composto. O fato de que o hidrato de morina não alterou os níveis de ureia no grupo alimentado, mas intensificou sua queda em M-, sugere que o flavonoide interfere na capacidade de detoxificação nitrogenada quando as larvas já se encontram sob estresse nutricional. Isso pode indicar uma sobrecarga das vias alternativas de eliminação de nitrogênio, como a produção de ácido úrico, mecanismo já descrito em mosquitos durante o metabolismo proteico (Scaraffia et al., 2005).

No caso da putrescina, trata-se de uma poliamina derivada da descarboxilação da ornitina, com funções amplamente relacionadas ao crescimento celular, estabilização de

membranas e proteção contra estresse oxidativo (Gilbert; Gill, 2010; Pegg, 2016). A ausência de diferenças marcantes entre os grupos indica que as larvas mantêm certa estabilidade na biossíntese de poliaminas, mesmo em condições adversas, dado seu papel essencial para a viabilidade celular. Apesar de não ocorrer redução da putrecina, a redução observada na ornitina em M- (tabela 6) sugere que a combinação de jejum e morina pode comprometer a disponibilidade de poliaminas, limitando tanto a proliferação celular quanto mecanismos de defesa antioxidante, como já descrito em outros insetos sob estresse metabólico (Madeo et al., 2018).

Assim, os resultados indicam que, enquanto a ureia reflete de forma clara a influência do estado nutricional e revela uma intensificação do déficit nitrogenado sob o hidrato de morina, a putrescina demonstra um possível gargalo na regulação das poliaminas quando estresse nutricional e químico são combinados. Em conjunto, essas alterações sugerem impacto tanto na capacidade de detoxificação quanto na manutenção da integridade celular das larvas.

### **15.3.3.2 Metabolismo de açúcares**

Os resultados do perfil metabólico demonstraram alterações expressivas nos açúcares das larvas de *Ae. aegypti* submetidas aos diferentes tratamentos (Tabela 6), além disso, padrões muito similares aos observados na quantificação dos carboidratos que foram discutidos anteriormente (Figura 25). A glicose apresentou maiores concentrações no grupo controle alimentado ( $2,218 \pm 0,41$ ), com redução significativa no grupo controle submetido ao jejum ( $1,078 \pm 0,23$ ), enquanto que o grupo tratado com hidrato de morina e alimentados não apresentou diferença estatística em relação ao controle ( $1,604 \pm 0,23$ ), o grupo M- apresentou redução mais intensa do que os demais grupos ( $0,568 \pm 0,1$ ). A trealose, principal açúcar circulante em insetos, também foi reduzida de forma acentuada nos grupos em jejum ( $1,396 \pm 0,14$  em C- e  $1,083 \pm 0,19$  em M-) quando comparados ao grupo controle alimentado ( $4,429 \pm 0,47$ ), enquanto o grupo M+ manteve níveis intermediários ( $2,667 \pm 0,12$ ). Já a manose apresentou reduções estatísticas ligadas à presença do hidrato de morina, apresentando  $0,772 \pm 0,17$  em C+ e  $0,679 \pm 0,06$  em C-, enquanto que os grupos tratados com o flavonoide apresentaram  $0,307 \pm 0,05$  em M+ e  $0,213 \pm 0,05$  em M-. Diferentemente, a maltose teve um padrão de ocorrência diferente, apresentando valores mais elevados em C+ e fortes reduções

nos demais grupos. A abundância de eritrotetrofuranose e mio-inusitol não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos testados.

A manutenção de glicose elevada em C+ está de acordo com o papel central desse monossacarídeo no suprimento energético imediato dos insetos, servindo como substrato preferencial para vias glicolíticas e para a síntese de trealose (Thompson, 2003). A queda observada em C- confirma a mobilização das reservas de glicogênio durante o jejum, padrão também descrito em larvas de *Bombyx mori*, onde a glicose plasmática decai de forma rápida diante da privação alimentar (Masumura et al., 2000). Já a redução mais acentuada em M- sugere que o hidrato de morina intensifica a demanda metabólica ou interfere em rotas de mobilização de açúcares, semelhante ao observado em *Drosophila melanogaster* quando exposta a compostos fenólicos, que alteram a homeostase glicêmica por meio da modulação do hormônio adipocinético (Isabel et al., 2005; Lee; Park, 2004).

A trealose, por sua vez, apresentou padrão clássico de depleção em jejum, corroborando seu papel como principal açúcar circulante em insetos (Becker et al., 1996). Em condições normais, a trealose funciona como “açúcar-tampão”, estabilizando os níveis de glicose na hemolinfa (Thompson, 2003). A queda intensa observada em C- e M- é consistente com achados em *Helicoverpa armigera*, onde a restrição alimentar reduz trealose concomitantemente ao aumento da atividade da trealase, enzima responsável por sua clivagem em glicose (Wang et al., 2020). A manutenção parcial em M+ sugere que, mesmo na presença do hidrato de morina, indivíduos alimentados conseguem sustentar níveis intermediários, possivelmente pela preservação parcial do metabolismo glicogênico.

A manose apresentou comportamento distinto, sendo modulada especificamente pelo tratamento com hidrato de morina, independentemente da dieta. Esse padrão pode estar relacionado ao papel da manose como precursor em processos de glicosilação de proteínas e no metabolismo de nucleotídeos açucarados, processos altamente sensíveis a estresses químicos (Walski et al., 2017). Embora estudos com insetos sejam mais escassos, dados em *D. melanogaster* mostram que distúrbios em vias de glicosilação impactam o desenvolvimento e a viabilidade (Aumiller; Jarvis, 2002). Assim, a queda de manose nos grupos tratados com hidrato de morina pode indicar que o flavonoide interfere nessas rotas, aumentando a demanda por esse monossacarídeo para funções estruturais e de detoxificação.

A maltose exibiu padrão de abundância elevado em C+, com reduções significativas em todos os demais grupos, sugerindo que sua disponibilidade está fortemente ligada à presença contínua de alimento. Em insetos, a maltose é um dissacarídeo resultante da digestão de amido e outros polissacarídeos vegetais, sendo rapidamente convertido em glicose por maltase no intestino (Ferreira et al., 2002). Dessa forma, sua baixa detecção em grupos submetidos ao jejum ou tratados com hidrato de morina reflete tanto a ausência de substrato dietético quanto possível alteração da digestibilidade em decorrência do composto fenólico.

Por fim, eritrotetofuranose e mio-inositol não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O mio-inositol é conhecido por atuar como regulador osmótico e precursor de fosfoinosítideos em insetos, enquanto a eritrotetofuranose é um intermediário pouco abundante, associado a vias secundárias do metabolismo de açúcares (Contreras et al., 2023; Rivera et al., 2021). A ausência de variação sugere que essas moléculas desempenham funções mais estáveis, não sendo significativamente moduladas nem pelo jejum nem pela morina.

Em síntese, os resultados evidenciam que o metabolismo de açúcares em larvas de *Ae. aegypti* é altamente sensível tanto ao estado nutricional quanto à exposição ao hidrato de morina. A glicose e a trealose se destacaram como principais marcadores do balanço energético, refletindo a capacidade dos insetos em ajustar rapidamente o fluxo metabólico frente ao jejum. Já a manose e a maltose revelaram-se mais responsivas à presença do flavonoide, indicando rotas de utilização diferenciadas. Por fim, a ausência de alterações significativas em compostos como mio-inositol e eritrotetofuranose sugere que tais metabólitos atuam de forma mais estável, possivelmente desempenhando funções estruturais ou regulatórias de longo prazo. Dessa forma, a integração desses perfis aponta para uma homeostase fina entre reservas energéticas, sinalização celular e respostas adaptativas, compondo um quadro complexo de como o metabolismo de carboidratos pode ser modulado em condições ambientais e químicas distintas.

#### **15.3.4 Integração metabólica e implicações biológicas**

A análise integrada do perfil metabólico revelou que a resposta das larvas de *Ae. aegypti* ao jejum e à exposição ao hidrato de morina envolve ajustes coordenados em múltiplas rotas centrais, refletindo uma reorganização global da homeostase bioenergética. Os resultados

demonstraram que tanto a privação alimentar quanto o flavonoide modulam de forma sinérgica o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos e ácidos orgânicos, promovendo um redirecionamento das vias catabólicas para sustentar a sobrevivência em condições de estresse.

No metabolismo energético, a redução consistente de intermediários do ciclo do ácido cítrico, associada à queda de lactato e malato, evidencia limitações na capacidade oxidativa e fermentativa das larvas. Esse quadro sugere que a manutenção da produção de energia passa a depender de rotas alternativas, como o catabolismo de aminoácidos e a geração de ácidos de cadeia curta, exemplificada pelo aumento de propionato em grupos tratados com morina. Em paralelo, o acúmulo de citrato em condições de jejum indica bloqueios parciais no ciclo, possivelmente relacionados à intensificação da mobilização de reservas endógenas.

No âmbito do metabolismo nitrogenado e antioxidante, destacam-se a redução de aminoácidos sulfurados e de um carbono (cisteína, glicina e serina) e o aumento do piroglutamato em grupos tratados com morina, sugerindo a ativação do eixo glutationa como estratégia de enfrentamento ao estresse oxidativo. Esse padrão reforça que o flavonoide intensifica a demanda por defesa redox, consumindo precursores essenciais e comprometendo o equilíbrio entre proteção antioxidante e geração de energia. Adicionalmente, o acúmulo seletivo de glutamina e aspartato em jejum aponta para um mecanismo de tamponamento do nitrogênio livre, enquanto a queda acentuada da ureia em M– reflete déficit na capacidade de detoxificação nitrogenada.

O metabolismo de açúcares também apresentou forte reorganização. A redução significativa de glicose e trealose em condições de jejum, exacerbada pela presença da morina, evidencia que a manutenção do balanço energético depende da rápida mobilização de carboidratos circulantes. O aumento do ácido fosfórico em grupos tratados com o flavonoide sugere, ainda, maior turnover de processos de fosforilação e alta pressão regulatória sobre enzimas-chave.

De forma integrada, esses achados indicam que a combinação de jejum e morina limita a flexibilidade metabólica das larvas, restringindo a eficiência na utilização de múltiplos substratos energéticos e comprometendo tanto a biossíntese quanto a defesa antioxidante. Esse colapso metabólico pode explicar a redução de sobrevivência, atraso no desenvolvimento e

diminuição das reservas lipídicas observados em experimentos complementares, reforçando o potencial do hidrato de morina como modulador negativo da fisiologia larval de *Ae. aegypti*.

#### 15.3.4.1 Efeitos integrados do jejum

A privação alimentar por 24 horas desencadeou uma reprogramação metabólica profunda das larvas, caracterizada pela mobilização coordenada de aminoácidos, ácidos orgânicos e carboidratos para sustentar a homeostase energética em condições de estresse nutricional. O jejum provocou a redução de 14 dos 19 aminoácidos identificados, incluindo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, glicina, treonina, fenilalanina, histidina, triptofano, asparagina e cisteína. Esse padrão reflete a utilização intensiva dos esqueletos carbônicos como substratos energéticos, com destaque para os aminoácidos de cadeia ramificada e a alanina, mobilizados para alimentar o ciclo do ácido cítrico ou sustentar a gliconeogênese (Adeva-Andany et al., 2014; Harper; Miller; Block, 1984; Neinast; Murashige; Arany, 2019).

Paralelamente, observou-se aumento significativo de glutamina e aspartato, indicando um rearranjo estratégico no metabolismo de nitrogênio. A glutamina acumulada funciona como forma de transporte e detoxificação da amônia liberada pelo catabolismo proteico (Cruzat et al., 2018; Scaraffia et al., 2005), enquanto o aspartato conecta o metabolismo de aminoácidos ao ciclo do ácido cítrico e à biossíntese de nucleotídeos (Liu; Sutter; Tu, 2021). Esses ajustes reforçam o papel dessas moléculas como pontos de convergência entre catabolismo energético e homeostase nitrogenada.

No metabolismo energético, o jejum resultou em queda significativa de intermediários do ciclo do ácido cítrico, como succinato, malato, oxaloacetato e  $\alpha$ -cetoglutarato, sugerindo maior utilização anaplerótica para sustentar a produção de ATP. Ao mesmo tempo, houve acúmulo de citrato, possivelmente associado à intensificação da mobilização de reservas energéticas e à sobrecarga da citrato sintase (Scaraffia; Wells, 2003; Tennesen et al., 2011). O lactato também sofreu redução expressiva, refletindo a diminuição da dependência da fermentação glicolítica em favor do uso de lipídios como fonte energética (Arrese; Soulages, 2010).

As reservas de carboidratos também foram mobilizadas de forma intensa. A glicose e a trealose apresentaram quedas significativas, confirmando seu papel como substratos de rápida

mobilização durante a privação alimentar (Becker et al., 1996; Thompson, 2003). Esse padrão é consistente com relatos em outros insetos, como *B. mori* e *H. armigera*, nos quais o jejum promove rápida redução da glicemia e depleção de trealose (Masumura et al., 2000).

Em conjunto, os dados evidenciam que o jejum impõe às larvas de *Ae. aegypti* um estado de estresse metabólico marcado pela drenagem de aminoácidos para rotas energéticas, pela reconfiguração do metabolismo nitrogenado e pela mobilização acelerada de carboidratos. Esses ajustes asseguram a sobrevivência larval a curto prazo, mas comprometem a biossíntese de macromoléculas e a manutenção do equilíbrio redox, reduzindo a capacidade de crescimento e desenvolvimento em condições de escassez de nutrientes.

#### **15.3.4.2 Efeitos integrados do hidrato de morina sobre o metabolismo energético**

A exposição ao hidrato de morina promoveu alterações metabólicas marcantes, mesmo na presença de alimento, evidenciando que o flavonoide atua como modulador negativo da homeostase energética e nitrogenada. Entre os aminoácidos, observou-se redução expressiva de valina, glicina, treonina, asparagina e lisina. A queda da valina, um aminoácido de cadeia ramificada associado ao suprimento energético via ciclo do ácido cítrico (Harper; Miller; Block, 1984), sugere intensificação de seu catabolismo em resposta ao estresse imposto pelo flavonoide. Já a redução de lisina, aminoácido essencial com papéis estruturais e epigenéticos, pode estar associada à interferência da morina na absorção intestinal de nutrientes, uma vez que flavonoides interagem com transportadores de membrana e modulam a permeabilidade intestinal (Li; Paxton, 2013; Manach et al., 2004).

A diminuição de glicina e treonina, ambas relacionadas à síntese de glutationa e ao equilíbrio redox (Kalhan; Hanson, 2012; Misra et al., 2011), sugere que o hidrato de morina intensifica a demanda antioxidant, redirecionando esses aminoácidos para a defesa contra estresse oxidativo. Esse padrão é corroborado pela elevação do piroglutamato nos grupos tratados, metabólito derivado do turnover da glutationa, que se acumula em condições de sobrecarga redox (Franco; Cidlowski, 2012; Koirala; Moural; Zhu, 2022). Assim, o hidrato de morina não apenas reduz a disponibilidade de precursores antioxidantes, como também induz maior consumo da glutationa, enfraquecendo a capacidade larval de lidar com desequilíbrios oxidativos.

No metabolismo de ácidos orgânicos, os efeitos do hidrato de morina foram evidenciados pela redução de lactato e pela elevação do ácido propanoico. A queda de lactato em larvas alimentadas tratadas com o flavonoide sugere supressão da via fermentativa, mesmo sem restrição de glicose, indicando limitação na flexibilidade metabólica (Machado et al., 2022; Singh et al., 2022). O aumento do propanoato, por sua vez, indica maior dependência do catabolismo de aminoácidos e carboidratos em condições de estresse metabólico, funcionando como marcador de desvio para rotas alternativas de suprimento energético (Halarnkar; Blomquist, 1989).

Alterações também foram observadas no metabolismo de açúcares, em especial na redução da manose e na elevação do ácido fosfórico. A queda da manose, presente tanto em larvas alimentadas quanto em jejum, sugere interferência do hidrato de morina em vias de glicosilação e no metabolismo de nucleotídeos açucarados, processos críticos para crescimento e viabilidade celular (Walski et al., 2017). O aumento do ácido fosfórico nos grupos tratados, por outro lado, reflete maior turnover energético e ativação de processos de fosforilação associados à resposta ao estresse (Koirala; Moural; Zhu, 2022; Tennessen et al., 2011).

No metabolismo nitrogenado, o hidrato de morina intensificou a redução da ureia em larvas sob jejum, sugerindo comprometimento da capacidade de eliminação de nitrogênio excedente. Esse achado reforça que o flavonoide sobrecarrega as vias de detoxificação, favorecendo o acúmulo de subprodutos nitrogenados e possivelmente redirecionando o fluxo para a produção de ácido úrico (Scaraffia et al., 2005).

Em síntese, os efeitos do hidrato de morina sobre o metabolismo larval de *Ae. aegypti* envolvem: (i) depleção seletiva de aminoácidos essenciais e antioxidantes; (ii) ativação da via da glutatona como resposta ao estresse oxidativo; (iii) limitação da fermentação lática e indução de rotas alternativas de energia; (iv) alterações na homeostase de açúcares e processos de glicosilação; e (v) comprometimento da detoxificação nitrogenada. Esses efeitos integrados comprometem a capacidade das larvas de acumular reservas e manter a homeostase, reduzindo seu potencial de desenvolvimento e sobrevivência.

## 16 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que o hidrato de morina exerce um impacto profundo sobre a fisiologia larval de *Ae. aegypti*, comprometendo de maneira integrada a absorção de nutrientes, a manutenção do metabolismo energético e a homeostase redox. Mesmo em condições de disponibilidade alimentar, as larvas expostas ao flavonoide apresentaram depleção acentuada de proteínas, carboidratos e lipídios, acompanhada por uma redução seletiva de aminoácidos essenciais e antioxidantes. Esse padrão sugere que a morina atua não apenas como inibidora da digestão e absorção intestinal, mas também como indutora de estresse oxidativo, forçando o redirecionamento de recursos metabólicos para rotas de defesa em detrimento de processos anabólicos e de crescimento.

A análise metabolômica revelou ainda a redução de intermediários do ciclo do ácido cítrico e da fermentação lática, associada ao aumento de metabólitos relacionados ao estresse oxidativo e ao catabolismo de aminoácidos. Esses achados reforçam que a morina limita a flexibilidade bioenergética das larvas, restringindo sua capacidade de utilizar múltiplos substratos para geração de ATP e comprometendo a eficiência do metabolismo basal. Tal reorganização metabólica aproxima o estado fisiológico das larvas tratadas ao observado em condições de jejum, explicando a redução no tamanho corporal, no acúmulo de reservas e no potencial de desenvolvimento.

Adicionalmente, a sinergia observada entre a restrição alimentar e o tratamento com morina demonstra que o estresse nutricional potencializa os efeitos deletérios do flavonoide, levando a uma depleção ainda mais severa de aminoácidos, reservas energéticas e compostos antioxidantes. Esse efeito combinado reforça a vulnerabilidade metabólica de *Ae. aegypti* frente a cenários de estresse múltiplo, indicando que a morina age como um disruptor metabólico capaz de enfraquecer significativamente a aptidão larval.

Em conjunto, esses resultados destacam o hidrato de morina como um composto de interesse para o controle de mosquitos vetores. Assim, a compreensão de seus mecanismos de ação contribui não apenas para o avanço da metabolômica aplicada à entomologia, mas também para o desenvolvimento de novas abordagens integradas no manejo de populações de mosquitos de importância médica.

## **17 DISCUSSÃO GERAL**

O presente trabalho oferece uma contribuição inédita ao demonstrar, de forma integrada, que o hidrato de morina exerce múltiplos efeitos sobre a biologia e o metabolismo energético de *Ae. aegypti*, abrangendo desde a mortalidade larval até a redução da suscetibilidade vetorial para o vírus Mayaro. Embora flavonoides já fossem reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras de processos metabólicos em diferentes organismos (Panche; Diwan; Chandra, 2016; Ullah et al., 2020), esta é a primeira evidência experimental de que o hidrato de morina pode atuar como agente larvicida, antifecundidade e antivetorial em mosquitos de importância médica. Tal achado amplia significativamente o entendimento sobre a interação entre metabólitos vegetais e insetos vetores, destacando novas perspectivas para o manejo sustentável de arboviroses.

Do ponto de vista científico, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que compostos naturais podem interferir de maneira seletiva em vias bioquímicas essenciais ao desenvolvimento dos mosquitos. O hidrato de morina provocou alterações no metabolismo energético, incluindo a redução de lipídios e carboidratos, além de interferir em processos hormonais associados à ecdisona e à bioenergética mitocondrial (Mitchell et al., 1993; Vandock; Mitchell; Fioravanti, 2012). Essa ação multifatorial ajuda a explicar a combinação de efeitos larvícidas, retardamento do desenvolvimento e diminuição da fertilidade observados. Ao evidenciar que o hidrato de morina atua em concentrações subletais alterando a homeostase do inseto, a tese contribui para a compreensão de mecanismos metabólicos de toxicidade que podem servir de base para o desenho de novos bioinseticidas ou moléculas análogas.

Sob a ótica aplicada, o estudo demonstra que o hidrato de morina apresenta eficácia significativa e seletividade ambiental, uma vez que não foram detectados efeitos tóxicos em camundongos mesmo em doses muito superiores às utilizadas nos ensaios com mosquitos. Esse perfil reforça seu potencial como alternativa natural aos inseticidas sintéticos, frequentemente associados a resistência populacional e riscos à saúde humana e à fauna não alvo (Moyes et al., 2017; Pavela et al., 2019). Além disso, a redução da suscetibilidade vetorial para o vírus Mayaro indica que o composto pode atuar em diferentes níveis da transmissão de arboviroses, combinando efeitos ecológicos e epidemiológicos. Em um cenário de resistência crescente a inseticidas químicos, os resultados desta tese fortalecem a busca por estratégias de controle baseadas em produtos naturais, de baixo impacto ambiental e compatíveis com programas de manejo integrado de vetores.

Por outro lado, é importante reconhecer limitações e desafios para a aplicação prática desses achados. Embora o hidrato de morina tenha se mostrado promissora em condições laboratoriais, sua eficácia em ambientes naturais depende de fatores como estabilidade química, formulação, custo de produção e impacto em ecossistemas aquáticos complexos. Estudos de campo e análises de viabilidade econômica são, portanto, etapas indispensáveis antes de sua incorporação em programas de saúde pública.

Em síntese, esta tese avança tanto no campo fundamental, ao elucidar mecanismos bioquímicos da interação entre flavonoides e mosquitos vetores, quanto no campo aplicado, ao propor um composto natural com potencial para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle de *Ae. aegypti*. Ao revelar que o hidrato de morina pode reduzir simultaneamente o desenvolvimento, a fertilidade e a suscetibilidade vetorial do mosquito, o trabalho abre caminhos para inovações em controle de arboviroses, alinhadas às demandas por soluções mais seguras, sustentáveis e ecologicamente responsáveis.

## **17.1 Integração dos efeitos biológicos e metabólicos**

Os resultados obtidos nos três capítulos desta tese revelam, de forma consistente, que o hidrato de morina exerce um conjunto integrado de efeitos biológicos e metabólicos sobre *Ae. aegypti*, que vão muito além da simples mortalidade larval. A análise conjunta dos experimentos demonstra uma convergência entre alterações no desenvolvimento, redução das reservas energéticas e comprometimento da reprodução, sugerindo que a ação do composto se dá por múltiplos mecanismos interdependentes.

No Capítulo I, foi demonstrado que a exposição larval ao hidrato de morina provoca mortalidade dose-dependente, atraso no desenvolvimento e redução significativa da fertilidade das fêmeas emergidas, mesmo quando tratadas em estágios juvenis. Esses achados indicam que o composto não apenas afeta a sobrevivência imediata, mas também exerce efeitos residuais que comprometem a aptidão populacional do mosquito, incluindo menor taxa de pupação, menor número de ovos viáveis e queda da suscetibilidade vetorial para o vírus Mayaro. O fato de fêmeas provenientes de larvas expostas apresentarem menor fertilidade reforça a ideia de que alterações precoces no metabolismo energético repercutem em fases posteriores do ciclo de vida, impactando a capacidade reprodutiva e a transmissão viral. Esse padrão está em

consonância com observações prévias de que o metabolismo energético é determinante para a fecundidade e a competência vetorial de mosquitos (Foster, 1995a; Valzania et al., 2019).

No Capítulo II, análises bioquímicas e moleculares confirmaram que tais efeitos biológicos estão diretamente associados a alterações profundas no metabolismo energético. Larvas tratadas exibiram depleção significativa de lipídios e carboidratos, além de mudanças em vias relacionadas as vias de síntese e hidrólise de TAG e glicogênio, além de receptores hormonais que culminaram no aumento do estresse oxidativo. Estudos prévios já sugeriam que flavonoides podem inibir enzimas-chave, como a ecdisona 20-monooxigenase e a transidrogenase mitocondrial, interferindo na metamorfose e na produção de energia celular (Mitchell et al., 1993; Vandock; Mitchell; Fioravanti, 2012). Os resultados desta tese reforçam esse mecanismo, mostrando que a redução das reservas de energia compromete não apenas a viabilidade larval, mas também o sucesso reprodutivo dos adultos, integrando metabolismo e reprodução em uma mesma rede de efeitos.

Por sua vez, o Capítulo III amplia a compreensão desses mecanismos ao mostrar que a interferência metabólica causada pelo hidrato de morina resulta em impactos fisiológicos sistêmicos, com alterações na incorporação da dieta que aprofundou as influências sob metabolismo de lipídios e carboidratos. Essa evidência reforça que a ação do composto não é restrita a um único alvo, mas sim multifatorial, atingindo processos essenciais à manutenção da homeostase energética. A conjugação desses efeitos (redução das reservas, aumento do estresse oxidativo e modulação de enzimas-chave) explica a combinação de efeitos larvicidas, retardamento do desenvolvimento e antifecundidade observados nos capítulos anteriores. Trabalhos anteriores já sugeriram que flavonoides podem atuar como moduladores metabólicos multifuncionais, interferindo em etapas críticas do ciclo de vida de insetos (Inaba et al., 2022; Rajkumar; Jebanesan, 2008).

Em conjunto, esses achados revelam que o hidrato de morina atua de maneira integrada ao longo de todo o ciclo de vida do mosquito: mata parte das larvas, enfraquece o metabolismo das sobreviventes, retarda a metamorfose e compromete a fertilidade dos adultos emergentes. Essa integração entre efeitos biológicos e metabólicos é particularmente relevante no contexto do controle vetorial, pois demonstra que mesmo exposições subletais podem reduzir drasticamente a capacidade populacional de *Ae. aegypti*. Além disso, o fato de o composto apresentar baixa toxicidade para mamíferos, como evidenciado pelos testes em camundongos, reforça seu potencial como ferramenta de manejo sustentável, em consonância com a tendência

de utilização de produtos naturais como alternativas menos impactantes no controle de vetores (Pavela et al., 2019; Santos et al., 2023).

Assim, a presente tese demonstra que a depleção das reservas energéticas constitui a base fisiológica para os efeitos larvicidas e antifecundidade do hidrato de morina. Ao interferir na incorporação e utilização de energia, o composto desencadeia um ciclo de perturbações que se estende da fase larval à adulta, comprometendo de forma duradoura a biologia do vetor. Essa visão integrada não apenas amplia a compreensão dos mecanismos de ação de flavonoides, como também abre perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de mosquitos baseadas em compostos naturais que atuem simultaneamente em múltiplos pontos críticos do ciclo de vida.

## 17.2 Mecanismos Moleculares e Bioquímicos

Os resultados desta tese demonstram que o hidrato de morina atua de forma multifacetada sobre o metabolismo energético e a sinalização hormonal de *Ae. aegypti*, ultrapassando o papel de um simples larvício. Em diferentes níveis de organização biológica, observou-se que o composto comprometeu a sobrevivência larval, retardou a pupação, reduziu a fecundidade e diminuiu a suscetibilidade vetorial, efeitos que, em conjunto, revelam uma profunda desestabilização da homeostase do inseto. Esses achados dialogam com a literatura que descreve os flavonoides como moléculas capazes de modular alvos metabólicos e hormonais essenciais em insetos (Pavela et al., 2019; Rajkumar; Jebanesan, 2008).

Um dos mecanismos mais consistentes foi a provável interferência na via da ecdisona. A inibição da ecdisona 20-monooxigenase por flavonoides já havia sido reportada em homogeneizados de *Ae. aegypti*, *D. melanogaster* e *M. sexta* (Mitchell et al., 1993), bem como a ação de compostos da mesma classe sobre a enzima Noppera-bo, crucial para a biossíntese desse hormônio (Inaba et al., 2022). Nossos resultados, que apontam atraso e bloqueio no processo de muda, reforçam a hipótese de que o hidrato de morina compromete diretamente a conversão de ecdisona em 20-hidroxyecdisona, prejudicando a transição larval e explicando a incapacidade de completar o desenvolvimento mesmo em condições nutricionais adequadas.

Outro eixo relevante foi a bioenergética mitocondrial. Estudos prévios demonstraram que a morina pode inibir a transidrogenase mitocondrial em larvas de *M. sexta*, comprometendo o balanço NADH/NADPH e a produção de ATP (Vandock; Mitchell; Fioravanti, 2012) . De

forma integrada, nossos experimentos revelaram a redução de triacilgliceróis, glicose e glicogênio nas larvas expostas, associada à ativação de lipases e à supressão de genes lipogênicos. Esse padrão é compatível com um estado metabólico catabólico induzido, semelhante ao jejum, no qual o inseto passa a mobilizar rapidamente suas reservas para suprir a demanda energética.

Essa depleção de lipídios e carboidratos tem implicações profundas para o fitness do mosquito. O corpo gorduroso, principal órgão de armazenamento energético, é essencial para sustentar tanto a metamorfose quanto a reprodução (Arrese; Soulages, 2010). A inibição da FAS pelo hidrato de morina, já relatada na literatura (Li; Tian, 2004), corrobora nossos achados de redução drástica nas reservas lipídicas, impactando diretamente a produção de ovos e a viabilidade da prole, como evidenciado no Capítulo I. Dessa forma, o hidrato de morina não compromete apenas a sobrevivência larval imediata, mas também a qualidade fisiológica dos adultos emergidos, reduzindo a fecundidade e a suscetibilidade vetorial de forma persistente.

Adicionalmente, nossos resultados se alinham ao que é descrito em contextos de privação nutricional. Estudos mostram que o jejum em mosquitos leva à ativação de vias catabólicas, aumento da lipólise e reorganização da sinalização hormonal, incluindo o eixo AKH–ILPs (Foster, 1995a; Gulia-Nuss et al., 2011; Valzania et al., 2019). O padrão observado no presente trabalho, com aumento da expressão do receptor de AKH e supressão de receptores de ILPs, sugere que o hidrato de morina induz um “estado de jejum químico”, forçando os insetos a priorizar a sobrevivência em detrimento da reprodução e do acúmulo de reservas.

Também é importante destacar que os efeitos do hidrato de morina vão além da toxicidade direta. Assim como observado para outros flavonoides com atividade antialimentar ou inseticida seletiva (Morimoto et al., 2003; Riddick, 2024), o composto atua como um desestabilizador sistêmico, combinando ação hormonal, metabólica e possivelmente pró-oxidativa. Esse perfil multifuncional reforça seu potencial como ferramenta para o manejo integrado de vetores, especialmente por apresentar seletividade e baixa toxicidade para mamíferos (Santos et al., 2023).

### 17.3 Implicações ecológicas e epidemiológicas

Os resultados também abordam implicações ecológicas e epidemiológicas, indicando que o hidrato de morina possui potencial como ferramenta de controle vetorial capaz de

impactar não apenas a sobrevivência do mosquito, mas também sua capacidade de transmitir arboviroses. A redução expressiva da suscetibilidade de *Ae. aegypti* para o vírus Mayaro, observada em fêmeas emergidas de larvas tratadas, demonstra que o composto pode interferir em etapas cruciais do ciclo de transmissão viral, diminuindo a prevalência e a carga viral em indivíduos expostos.

Uma hipótese plausível para explicar essa diminuição de suscetibilidade é que o hidrato de morina, além de alterar o metabolismo energético, possa provocar interferências bioquímicas ou lesões celulares no intestino médio, órgão-chave para a infecção inicial e a passagem do vírus para a hemolinfa. Alterações na integridade epitelial, no pH luminal ou em transportadores de nutrientes poderiam dificultar tanto a absorção do sangue (reduzindo a eficiência do repasto hematofágico e, consequentemente, a nutrição necessária para a replicação viral), quanto a translocação do vírus para os tecidos sistêmicos. Essa hipótese é coerente com a observação do aumento de que fêmeas expostas durante a fase larva apresentaram elevação do estresse oxidativo no intestino enquanto larvas e, enquanto adultas, apresentaram fertilidade reduzida, sugerindo que desarranjos intestinais e metabólicos impactam simultaneamente a reprodução e a transmissão de patógenos.

Embora o foco deste estudo tenha sido o vírus Mayaro, é essencial reforçar que outros arbovírus de importância médica, como dengue, zika e chikungunya, ainda precisam ser testados para determinar se mecanismos semelhantes de bloqueio intestinal ou inibição da replicação viral também se aplicam a esses patógenos. A confirmação dessa hipótese em diferentes vírus poderia consolidar o hidrato de morina como um agente de amplo espectro para reduzir a disseminação de arboviroses. Além disso, estudos de ultraestrutura que visualizem as células intestinais sob efeito do hidrato de morina podem verificar se a hipótese de dano tecidual se sustenta.

Outro aspecto de destaque é a seletividade ecológica do hidrato de morina. Ensaios toxicológicos em camundongos, aliados ao conhecimento prévio sobre a baixa toxicidade de flavonoides em vertebrados, indicam que o composto apresenta perfil ambientalmente seguro, mesmo em doses muito superiores às aplicadas aos mosquitos. Essa seletividade é estratégica em programas de manejo integrado, pois minimiza riscos para organismos não alvo.

Sob a perspectiva da sustentabilidade, o hidrato de morina representa um modelo promissor de flavonoide bioativo para o controle de *Ae. aegypti*. Sua origem vegetal e renovável favorece a produção em larga escala, enquanto sua ação multifuncional possibilita a formulação

de produtos capazes de atuar em diversos pontos críticos do ciclo de vida do mosquito. Essa abordagem integrada não apenas reduz a dependência de inseticidas químicos, mas também pode retardar a seleção de resistência em populações de campo.

#### **17.4 Perspectivas, limitações e relevância Científica e social**

Apesar do potencial promissor do hidrato de morina como bioinseticida, a aplicação prática dos resultados desta tese em programas de controle vetorial enfrenta desafios importantes. Um dos principais entraves é a formulação e estabilidade do composto em condições ambientais, uma vez que flavonoides apresentam solubilidade limitada em água e podem sofrer degradação fotoquímica quando expostos à luz solar (Del Rio et al., 2013; Ullah et al., 2020). A padronização de métodos de extração, purificação ou síntese da morina, assim como o desenvolvimento de veículos de liberação controlada, como microencapsulação ou nanopartículas, será fundamental para garantir eficácia e persistência em cenários reais de aplicação.

Outro desafio é a necessidade de testes de campo em ambientes naturais, nos quais fatores como pH da água, temperatura, matéria orgânica e presença de microbiota podem modificar a atividade observada em condições laboratoriais (Pavela et al., 2019). Ensaios em criadouros reais de *Ae. aegypti* permitirão avaliar a estabilidade do composto, sua interação com a fauna local e possíveis impactos na comunidade aquática. Da mesma forma, estudos toxicológicos de longo prazo com diferentes organismos não alvo (incluindo polinizadores e vertebrados aquáticos) são indispensáveis para confirmar a segurança ecológica em programas de aplicação contínua, considerando a relevância de garantir a seletividade e evitar efeitos em organismos benéficos (Santos et al., 2023).

Do ponto de vista do manejo integrado, o hidrato de morina deve ser considerado ferramenta complementar a outras estratégias já consolidadas, como a eliminação de criadouros, o uso de armadilhas, a liberação de mosquitos infectados com Wolbachia e a aplicação pontual de inseticidas sintéticos em surtos epidêmicos (Kraemer et al., 2015; Moyes et al., 2017). Essa integração é essencial para reduzir a pressão seletiva e minimizar o risco de resistência, problema frequente em programas baseados em um único mecanismo de ação (Arias-Castro; Martinez-Romero; Vasilieva, 2020). Como próximos passos, pesquisas translacionais devem priorizar ensaios de campo controlados, análise de custo de produção,

escalabilidade e, principalmente, testes com outros arbovírus de importância epidemiológica, como dengue, zika e chikungunya, a fim de verificar se o bloqueio intestinal e a redução da suscetibilidade vetorial observados para o vírus Mayaro podem ser reproduzidos em outros patógenos (De Curcio et al., 2022; Weaver; Reisen, 2010). Estudos moleculares adicionais também serão valiosos para confirmar se lesões ou interferências bioquímicas no intestino médio, prováveis responsáveis por dificultar a absorção do sangue e a passagem dos vírus para a hemolinfa, constituem de fato o mecanismo central de ação do composto.

No plano científico, esta tese oferece evidências inéditas da interação entre flavonoides e insetos vetores, demonstrando que o hidrato de morina é capaz de modular simultaneamente o metabolismo energético, a integridade intestinal e a suscetibilidade vetorial. Estudos prévios já sugeriam que flavonoides podem inibir enzimas-chave como a ecdisona 20-monooxigenase (Mitchell et al., 1993) e a transidrogenase mitocondrial (Vandock; Mitchell; Fioravanti, 2012), o que corrobora as observações de interferência metabólica aqui descritas. Essa abordagem multidimensional avança o entendimento de como metabólitos vegetais podem influenciar processos fisiológicos essenciais, consolidando um paradigma inovador de controle vetorial baseado em desestabilização metabólica e bloqueio da infecção viral, em contraste com a toxicidade direta característica dos inseticidas tradicionais.

Sob a ótica social e de saúde pública, os achados reforçam a necessidade de explorar alternativas naturais e ambientalmente seguras para o controle de *Ae. aegypti*, vetor de algumas das mais graves arboviroses globais (Soni et al., 2023; Souza-Neto; Powell; Bonizzoni, 2019). A demonstração de que um flavonoide isolado pode reduzir a fertilidade do mosquito e sua capacidade de transmissão viral, sem apresentar toxicidade significativa para vertebrados, representa um avanço concreto diante do cenário atual de resistência a inseticidas e da limitação de vacinas para doenças como dengue e Mayaro (Roiz et al., 2024).

Além de seu valor imediato, o hidrato de morina ilustra como a biodiversidade vegetal pode ser fonte de inovação tecnológica. Ao integrar conhecimento químico, bioquímico e ecológico, esta pesquisa abre caminhos para o desenvolvimento de bioinseticidas de nova geração, capazes de atuar em diferentes pontos do ciclo de vida do mosquito e de contribuir para estratégias de controle mais sustentáveis, economicamente viáveis e alinhadas aos princípios de saúde única (One Health). Dessa forma, a presente tese não apenas amplia a compreensão dos mecanismos de interação entre flavonoides e insetos vetores, mas também

oferece uma base para novas abordagens de prevenção de arboviroses, unindo impacto científico e relevância social.

## 18 CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho revela que o hidrato de morina atua como um modulador profundo da biologia de *Ae. aegypti*, promovendo um conjunto de alterações que vão além da toxicidade larval imediata. Ao interferir no metabolismo energético e, provavelmente, na sinalização hormonal, o composto desencadeia uma cascata de perturbações que repercutem em diferentes fases do ciclo de vida, comprometendo não apenas a sobrevivência larval, mas também a metamorfose, a fecundidade e a suscetibilidade vetorial. Essa visão integrada amplia o entendimento das interações entre metabólitos vegetais e insetos vetores, consolidando o conceito de que compostos naturais podem desestabilizar múltiplos eixos fisiológicos de forma simultânea e duradoura.

Um aspecto central dessa investigação foi a constatação de que o hidrato de morina induz um estado metabólico análogo ao jejum em diversos aspectos, ainda que em condições de disponibilidade alimentar. Essa condição de “jejum químico” se mostrou elucidativa para compreender os mecanismos subjacentes aos efeitos observados, revelando que o inseto passa a priorizar a mobilização de reservas energéticas em detrimento de processos anabólicos e reprodutivos. Essa estratégia de sobrevivência forçada, embora momentaneamente adaptativa, resulta em adultos enfraquecidos, com menor capacidade de reprodução e de transmissão viral. Assim, o composto não apenas ameaça a continuidade individual, mas fragiliza de modo persistente a dinâmica populacional e epidemiológica do vetor.

Ao conjugar mortalidade larval, atraso no desenvolvimento, infertilidade parcial e redução da suscetibilidade ao vírus Mayaro, o hidrato de morina se destaca como um agente multifuncional, capaz de interferir em pontos estratégicos do ciclo de vida do mosquito. Sua seletividade para o alvo, associada à baixa toxicidade para organismos mamíferos, reforça seu potencial como alternativa promissora no contexto do manejo sustentável de vetores. Mais do que oferecer uma prova de conceito, esta tese demonstra que a exploração da biodiversidade vegetal pode fornecer soluções inovadoras e refinadas para desafios de saúde pública, abrindo espaço para bioinseticidas que aliam eficácia, segurança ambiental e impacto epidemiológico.

## 19 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEVA-ANDANY, M. *et al.* Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*, v. 17, p. 76–100, 2014.

AHMAD, S.; PARDINI, R. S. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 8, n. 4, p. 401–413, 1990.

AHMAD, Sami. Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 29, n. 2, p. 135–157, 1995.

ALABASTER, Amy *et al.* Deficiencies in acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase 1 differentially affect eggshell formation and blood meal digestion in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, n. 12, p. 946–955, 2011.

ALEMDAR, Nihal Turkmen *et al.* Acetamiprid-induced testicular toxicity in mice: ameliorative effect and potential mechanisms of morin. *BMC complementary medicine and therapies*, v. 25, n. 1, 1 dez. 2025.

ALQURASHI, S.; ENGLISH, S.; WALL, R. Nutritional requirements for reproduction and survival in the blowfly *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 34, n. 2, p. 207–214, 1 jun. 2020.

ALTO, Barry W.; BETTINARDI, David. Temperature and dengue virus infection in mosquitoes: independent effects on the immature and adult stages. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 88, n. 3, p. 497–505, mar. 2013.

ALVES, Marcela de Souza *et al.* Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. *Crop Protection*, v. 119, p. 191–196, 2019.

ALVES, Marcela S. *et al.* Essential Oils composition and toxicity tested by fumigation against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) pest of stored cowpea. *Revista Virtual de Quimica*, v. 7, n. 6, p. 2387–2399, 1 nov. 2015.

ALVES-BEZERRA, Michele *et al.* Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 69, p. 51–60, 2016.

ALVES-BEZERRA, Michele *et al.* Deficiency of glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 decreases triacylglycerol storage and induces fatty acid oxidation in insect fat body. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1862, n. 3, p. 324–336, 1 mar. 2017.

ARIAS-CASTRO, Juddy Heliana; MARTINEZ-ROMERO, Hector Jairo; VASILIEVA, Olga. Biological and chemical control of mosquito population by optimal control approach. *Games*, v. 11, n. 4, p. 1–25, 1 dez. 2020.

ARRESE, E. L. *et al.* Lipid storage and mobilization in insects: Current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, n. 1, p. 7–17, 2001.

ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 207–225, 2010.

ASSIS, Viviane Alves de *et al.* The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasii*. *Arthropod Structure and Development*, v. 43, n. 5, p. 501–509, set. 2014.

ATTARDO, Geoffrey M.; HANSEN, Immo A.; RAIKHEL, Alexander S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n. 7, p. 661–675, 1 jul. 2005.

AUMILLER, Jared J.; JARVIS, Donald L. Expression and functional characterization of a nucleotide sugar transporter from *Drosophila melanogaster*: relevance to protein glycosylation in insect cell expression systems. *Protein expression and purification*, v. 26, n. 3, p. 438, 2002.

AURADE, Ravindra M. *et al.* Inhibition of P-glycoprotein ATPase and its transport function of *Helicoverpa armigera* by morin, quercetin and phloroglucinol. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 101, n. 3, p. 212–219, nov. 2011.

AZEEZ, Odunayo Ibraheem; MEINTJES, Roy; CHAMUNORWA, Joseph Panashe. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: The nexus. *Lipids in Health and Disease*, 2014. Disponível em: <<http://www.lipidworld.com/content/13/1/71>>. Acesso em: 1 jul. 2019

AZUMA, M; Effect of pectolinaringenin, a flavonoid from *Clerodendrum phlomidis*, on total protein, glutathione S-transferase and esterase activities of *Earias vittella* and *Helicoverpa armigera*. *Phytoparasitica*, v. 42, n. 3, p. 323–331, 1 jul. 2014.

BAI, Shuai *et al.* Regulatory mechanisms of microbial homeostasis in insect gut. Insect science, v. 28, n. 2, p. 286–301, 1 abr. 2021.

BAKER, Doha H. Abou. An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge. Toxicology Reports, v. 9, p. 445–469, 2022.

BARBEHENN, Raymond V.; PETER CONSTABEL, C. Tannins in plant-herbivore interactions. Phytochemistry, v. 72, n. 13, p. 1551–1565, set. 2011.

BARLETTA, Ana Beatriz Ferreira *et al.* Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in Aedes aegypti. Parasites & Vectors, v. 10, n. 1, p. 103, 23 fev. 2017.

BARREAUX, Antoine M. G. *et al.* Larval environment influences vector competence of the malaria mosquito Anopheles gambiae. MalariaWorld Journal, v. 7, p. 8, 2016.

BECKER, A. *et al.* The regulation of trehalose metabolism in insects. Experientia, v. 52, 1996.

BERG, Jeremy M. *et al.* Biochemistry. 9. ed. New York: Macmillan, 2019. v. 14

BESERRA, Eduardo B.; FERNANDES, Carlos R. M.; RIBEIRO, Paulino S. Larval density as related to life cycle, size and fecundity of aedes (Stegomyia) aegypti (l.) (Diptera: Culicidae) in laboratory. Neotropical Entomology, v. 38, n. 6, p. 847–852, 2009.

BILLKER, O. *et al.* Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. Nature, v. 392, n. 6673, p. 289–292, 19 mar. 1998.

BOOTS, Agnes W.; HAENEN, Guido R. M. M.; BAST, Aalt. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. European journal of pharmacology, v. 585, n. 2–3, p. 325–337, 13 maio 2008.

BOROVSKY, Dov. Biosynthesis and Control of Mosquito Gut Proteases. IUBMB Life, 1 ago. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216540310001597721>>. Acesso em: 27 nov. 2020

BOUÉ, Stephen M.; RAINA, Ashok K. Effects of plant flavonoids on fecundity, survival, and feeding of the Formosan subterranean termite. Journal of Chemical Ecology, v. 29, n. 11, p. 2575–2584, nov. 2003.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, v. 49, n. 4, p. 423–435, 15 mar. 2007.

BRETSCHER, Heidi; O'CONNOR, Michael B. The Role of Muscle in Insect Energy Homeostasis. *Frontiers in Physiology*, v. 11, p. 580687, 22 out. 2020.

BRIEGEL, H.; KNÜSEL, I.; TIMMERMANN, S. E. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*, v. 26, n. 1, p. 21–31, 2001.

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

BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAICEDO, Edgar Yaset *et al.* The epidemiology of mayaro virus in the americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 6, 1 jun. 2021.

CAMINADE, Cyril *et al.* Global risk model for vector-borne transmission of Zika virus reveals the role of El Niño 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 1, p. 119–124, 3 jan. 2017.

CANAVOSO, Lilián E. *et al.* Fat Metabolism in Insects. *Annual Review of Nutrition*, v. 21, n. 1, p. 23–46, 2001.

CANSADO-UTRILLA, Cintia *et al.* The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. *Microbiome*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2021.

CAO, Hui; CHEN, Xiaoqing. Structures Required of Flavonoids for Inhibiting Digestive Enzymes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 8, p. 929–939, 20 set. 2012.

CARAGATA, Eric P. *et al.* Competition for amino acids between Wolbachia and the mosquito host, *Aedes aegypti*. *Microbial ecology*, v. 67, n. 1, p. 205–218, 1 jan. 2014.

CARAGATA, Eric P.; TIKHE, Chinmay V.; DIMOPOULOS, George. Curious Entanglements: Interactions between Mosquitoes, their Microbiota, and Arboviruses. *Current opinion in virology*, v. 37, p. 26, 1 ago. 2019.

CARRIERE, Frédéric *et al.* Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*, v. 105, n. 3, p. 876–888, 1 set. 1993.

CHADEE, Dave D.; MARTINEZ, R. Landing periodicity of the mosquito Aedes aegypti in Trinidad in relation to the timing of insecticidal space-spraying. *Journal Vector Ecology*, v. 25, n. 2, p. 158–163, 2000.

CHADEE, Dave D.; SUTHERLAND, Joan M.; GILLES, Jeremie R. L. Diel sugar feeding and reproductive behaviours of Aedes aegypti mosquitoes in Trinidad: With implications for mass release of sterile mosquitoes. *Acta Tropica*, v. 132, n. 1, p. S86–S90, 1 abr. 2014.

CHAGAS, Maria S. Do Socorro *et al.* Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2022, n. 1, p. 9966750, 1 jan. 2022.

CHAPMAN, R. F. *The Insects Structure and Function*. 5. ed. New York: Cambridge University Press, 2013.

CHO, Y. M. *et al.* A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered morin in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 6, p. 891–897, jun. 2006.

CHOTIWAN, Nunya *et al.* Expression of fatty acid synthase genes and their role in development and arboviral infection of Aedes aegypti. *Parasites & vectors*, v. 15, n. 1, 1 dez. 2022.

CHOWAŃSKI, Szymon *et al.* Insulin-Like Peptides and Cross-Talk With Other Factors in the Regulation of Insect Metabolism. *Frontiers in Physiology*, v. 12, p. 701203, 29 jun. 2021.

CLEMENTS, A. N. *The biology of mosquitoes*. v. 3, p. 1–571, 2011.

CLIFTON, Mark E.; NORIEGA, Fernando G. The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenesis nutrition and juvenile hormone in Aedes aegypti. *Journal of Insect Physiology*, v. 58, n. 7, p. 1007–1019, 2012.

COFFEL, Ethan D.; HORTON, Radley M.; DE SHERBININ, Alex. Temperature and humidity based projections of a rapid rise in global heat stress exposure during the 21st century. *Environmental Research Letters*, 1 jan. 2018. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1748-9326/13/i=1/a=014001?key=crossref.1628e439fe93adb84839f0550336785b>>

CONTRERAS, Altagracia *et al.* Inositol in Disease and Development: Roles of Catabolism via myo-Inositol Oxygenase in *Drosophila melanogaster*. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 4, 1 fev. 2023.

COON, Kerri L. *et al.* Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular ecology*, v. 23, n. 11, p. 2727, 2014.

COOPER, Arthur J. L.; JEITNER, Thomas M. Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*, v. 6, n. 2, 26 mar. 2016.

CORY, Hannah *et al.* The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, v. 5, p. 87, 21 set. 2018.

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

CRUZAT, Vinicius *et al.* Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1564, 1 nov. 2018.

DA SILVA, Renato Martins *et al.* Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 227, p. 56–63, 1 jan. 2019.

DARYANAVARD, Hana *et al.* Flavonols modulate plant development, signaling, and stress responses. *Current opinion in plant biology*, v. 72, p. 102350, 1 abr. 2023.

DAVID, Mariana R. *et al.* *Aedes aegypti* oviposition-sites choice under semi-field conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 37, n. 4, p. 683–692, 1 dez. 2023.

DE CURCIO, Juliana Santana *et al.* Detection of Mayaro virus in Aedes aegypti mosquitoes circulating in Goiânia-Goiás-Brazil. *Microbes and Infection*, v. 24, n. 4, 1 jun. 2022.

DEL RIO, Daniele *et al.* Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 10 maio 2013.

DHADIALLA, Tarlochan S.; CARLSON, Glenn R.; LE, Dat P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, v. 43, n. Volume 43, 1998, p. 545–569, 1 jan. 1998.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual review of entomology*, v. 49, p. 71–92, 2004.

DONG, Yuemei; MANFREDINI, Fabio; DIMOPOULOS, George. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS pathogens*, v. 5, n. 5, maio 2009.

DOS SANTOS, Luan Valim *et al.* Differential expression of brummer and levels of TAG in different developmental stages Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), including fasted adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 115, n. 1, 1 jan. 2024.

DOU, Xiaoyi *et al.* Multiple endocrine factors regulate nutrient mobilization and storage in *Aedes aegypti* during a gonadotrophic cycle. *Insect Science*, 19 set. 2022.

DREȚCANU, Georgiana *et al.* Chemical Structure, Sources and Role of Bioactive Flavonoids in Cancer Prevention: A Review. *Plants*, v. 11, n. 9, p. 1117, 1 maio 2022.

DUNCAN, Robin E. *et al.* Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual review of nutrition*, v. 27, p. 79–101, 2007.

DUS, Monica; AI, Minrong; SUH, Greg S. B. Taste-independent nutrient selection is mediated by a brain-specific Na<sup>+</sup> /solute co-transporter in Drosophila. *Nature neuroscience*, v. 16, n. 5, p. 526–528, maio 2013.

ELBEIN, Alan D. *et al.* New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, v. 13, n. 4, p. 17R-27R, 1 abr. 2003.

ESTEVES, Adriana; EHRLICH, Ricardo. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology Elsevier Inc., , mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605002413>>. Acesso em: 7 maio. 2020

FAN, Zeyun *et al.* Biological and Physiological Changes in *Spodoptera frugiperda* Larvae Induced by Non-Consumptive Effects of the Predator *Harmonia axyridis*. Agriculture 2024, Vol. 14, Page 1566, v. 14, n. 9, p. 1566, 10 set. 2024.

FARNESI, Luana Cristina *et al.* Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. Journal of Insect Physiology, v. 83, p. 43–52, 1 dez. 2015.

FELIG, P. *et al.* Amino acid metabolism during prolonged starvation. The Journal of clinical investigation, v. 48, n. 3, p. 584–594, 1969.

FELIG, Philip. The glucose-alanine cycle. Metabolism: clinical and experimental, v. 22, n. 2, p. 179–207, 1973.

FELTON, Gary W.; SUMMERS, Clinton B. Antioxidant systems in insects. Archives of insect biochemistry and physiology, v. 29, n. 2, p. 187–197, 1995.

FERREIRA, A. H. P. *et al.* Secretion of  $\beta$ -glycosidase by middle midgut cells and its recycling in the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. JInnP, v. 48, n. 1, p. 113–118, 2002.

FORD, P. S.; VAN HEUSDEN, M. C. Triglyceride-Rich Lipophorin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, v. 31, n. 3, p. 435–441, 1 maio 1994.

FOSTER, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. Annual Review of Entomology, v. 40, n. 1, p. 443–474, 1995a.

FOSTER, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. Annual Review of Entomology, v. 40, n. Volume 40, 1995, p. 443–474, 1 jan. 1995b.

FRABASILE, Sandra *et al.* The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1–11, 3 fev. 2017.

FRAGA, César G. *et al.* The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, v. 10, n. 2, p. 514–528, 20 fev. 2019.

FRAMPTON, Geoff K. *et al.* Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 25, n. 9, p. 2480–2489, set. 2006.

FRANCO, Rodrigo; CIDLOWSKI, John A. Glutathione Efflux and Cell Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 17, n. 12, p. 1694, 15 dez. 2012.

FREDRIKSON, Gudrun; TORNQVIST, Hans; BELFRAGE, Per. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, v. 876, n. 2, p. 288–293, 1986.

GÄDE, Gerd; AUERSWALD, Lutz. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*, v. 132, n. 1, p. 10–20, 1 jun. 2003.

GAIO, Analiz De O. *et al.* Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *aedes aegypti* (diptera: Culicidae) (L.). *Parasites and Vectors*, v. 4, n. 1, p. 1–10, 14 jun. 2011.

GALATI, Giuseppe; O'BRIEN, Peter J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 3, p. 287–303, 1 ago. 2004.

GAUTAM, Himanshi; SHARMA, Ashish; TRIVEDI, Prabodh Kumar. The role of flavonols in insect resistance and stress response. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 73, 1 jun. 2023.

GENTILE, Carla *et al.* Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 80–87, 1 dez. 2013.

GEORGE, David R. *et al.* Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, 15 jan. 2014.

GILBERT, Lawrence; GILL, Sarjeet. *Insect pharmacology*. 1. ed. [S.l.]: Academic Press, 2010.

GODOY, Raquel Soares Maia *et al.* The larval midgut of Anopheles, Aedes, and Toxorhynchites mosquitoes (Diptera, Culicidae): a comparative approach in morphophysiology and evolution. *Cell and Tissue Research*, v. 393, n. 2, p. 297–320, 1 ago. 2023.

GONDIM, Katia C. *et al.* Lipid metabolism in insect disease vectors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 101, n. August, p. 108–123, 2018.

GONG, Gang *et al.* Iisorhamnetin: A review of pharmacological effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 128, p. 110301, 1 ago. 2020.

GRAF, Brigitte A.; MILBURY, Paul E.; BLUMBERG, Jeffrey B. Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. <https://home.liebertpub.com/jmf>, v. 8, n. 3, p. 281–290, 21 set. 2005.

GRÖNKE, Sebastian *et al.* Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, v. 1, n. 5, p. 323–330, 2005.

GRÖNKE, Sebastian *et al.* Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biology*, v. 5, n. 6, p. 1248–1256, 2007.

GROSSMAN, Genelle L. *et al.* Evidence for two distinct members of the amylase gene family in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 27, n. 8–9, p. 769–781, ago. 1997.

GROSSO, Giuseppe *et al.* A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 61, n. 4, p. 1600930, 1 abr. 2017.

GULIA-NUSS, Monika *et al.* Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. e20401, 2011.

HAKIM, Raziel S.; BALDWIN, Kate; SMAGGHE, Guy. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual review of entomology*, v. 55, p. 593–608, 1 jan. 2010.

HALARNKAR, Premjit P.; BLOMQUIST, Gary J. Comparative aspects of propionate metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, v. 92, n. 2, p. 227–231, 1989.

HAO, Baocheng *et al.* Advances in Flavonoid Research: Sources, Biological Activities, and Developmental Prospectives. Current Issues in Molecular Biology, v. 46, n. 4, p. 2884, 1 abr. 2024.

HARPER, A. E.; MILLER, R. H.; BLOCK, K. P. Branched-chain amino acid metabolism. Annual review of nutrition, v. 4, p. 409–454, 1984.

HARRISON, Ruby E. *et al.* The mosquito *Aedes aegypti* requires a gut microbiota for normal fecundity, longevity and vector competence. Communications biology, v. 6, n. 1, 1 dez. 2023.

HAY, William T. *et al.* Biopesticide synergy when combining plant flavonoids and entomopathogenic baculovirus. Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 6806, 1 dez. 2020.

HE, Ya Zhou *et al.* E93 confers steroid hormone responsiveness of digestive enzymes to promote blood meal digestion in the midgut of the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 134, 1 jul. 2021.

HECKER, Hermann. Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (insecta, diptera). Cell and Tissue Research, v. 184, n. 3, p. 321–341, nov. 1977.

HEGEDUS, Dwayne *et al.* New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Annual Review of Entomology, v. 54, n. Volume 54, 2009, p. 285–302, 7 jan. 2009.

HEIER, Christoph; KÜHNLEIN, Ronald P. Triacylglycerol metabolism in *drosophila melanogaster*. Genetics, v. 210, n. 4, p. 1163–1184, 2018.

HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hilary. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual review of entomology, v. 45, p. 371–391, 2000.

HERRERA-MAYORGA, Verónica *et al.* Insecticidal Activity of Organic Extracts of *Solidago graminifolia* and Its Main Metabolites (Quercetin and Chlorogenic Acid) against *Spodoptera frugiperda*: An In Vitro and In Silico Approach. Molecules, v. 27, n. 10, 1 maio 2022.

HOLM, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Biochemical Society Transactions, v. 31, n. 6, p. 1120–1124, 2003.

HOLTOF, Michiel *et al.* Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. *Cell and Tissue Research*, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00441-019-03031-9>>. Acesso em: 7 maio. 2020

HORNE, Irene; HARITOS, Victoria S.; OAKESHOTT, John G. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 39, n. 8, p. 547–567, 2009.

HORVATH, Thomas D.; DAGAN, Shai; SCARAFFIA, Patricia Y. Unraveling mosquito metabolism with mass spectrometry-based metabolomics. *Trends in parasitology*, v. 37, n. 8, p. 747, 1 ago. 2021.

HOU, Yuan *et al.* Temporal Coordination of Carbohydrate Metabolism during Mosquito Reproduction. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 7, p. 1–24, 2015.

HU, J. S. *et al.* Mechanisms of TiO<sub>2</sub> NPs-induced phoxim metabolism in silkworm (*Bombyx mori*) fat body. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 129, p. 89–94, maio 2016.

HUA, Ziqi *et al.* Morin-Based Nanoparticles for Regulation of Blood Glucose. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 16, n. 17, p. 21400–21414, 1 maio 2024.

HUBBARD, Troy D.; MURRAY, Iain A.; PERDEW, Gary H. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 43, n. 10, p. 1522–1535, 1 out. 2015.

HYUN, Hwang Bo *et al.* The flavonoid morin from Moraceae induces apoptosis by modulation of Bcl-2 family members and Fas receptor in HCT 116 cells. *International Journal of Oncology*, v. 46, n. 6, p. 2670–2678, 1 jun. 2015.

INABA, Kazue *et al.* Molecular action of larvicidal flavonoids on ecdysteroidogenic glutathione S-transferase Noppera-bo in *Aedes aegypti*. *BMC Biology*, v. 20, n. 1, 1 dez. 2022.

ISABEL, Guillaume *et al.* AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 288, n. 2, p. 531–538, 1 fev. 2005.

ISLAM, Md Asiful *et al.* Dietary Phytochemicals: Natural Swords Combating Inflammation and Oxidation-Mediated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, n. 5137431, 2016.

ISMAN, Murray B. Botanical Insecticides in the Twenty-First Century-Fulfilling Their Promise? Annual review of entomology, v. 65, p. 233–249, 2020.

ISOE, Jun; SCARAFFIA, Patricia Y. Urea Synthesis and Excretion in *Aedes aegypti* Mosquitoes Are Regulated by a Unique Cross-Talk Mechanism. PLoS ONE, v. 8, n. 6, p. e65393, 5 jun. 2013.

IWAMURA, Takuya; GUZMAN-HOLST, Adriana; MURRAY, Kris A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. Nature Communications, v. 11, n. 1, p. 2130, 2020.

JAGADESHWARAN, U. *et al.* Cellular mechanisms of acid secretion in the posterior midgut of the larval mosquito (*Aedes aegypti*). The Journal of Experimental Biology, v. 213, n. 2, p. 295, 15 jan. 2009.

JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, Mariana Lizbeth *et al.* Amino acid and acylcarnitine profile of *Aedes aegypti* (L) post-blood feeding, after permethrin exposure, and during the life cycle. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 181, p. 104328, 1 jun. 2025.

JIN, Hana *et al.* Morin, a flavonoid from Moraceae, suppresses growth and invasion of the highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 partly through suppression of the Akt pathway. International Journal of Oncology, v. 45, n. 4, p. 1629–1637, 2014.

JOHNSON, M. B.; BUTTERWORTH, F. M. Maturation and aging of adult fat body and oenocytes in *Drosophila* as revealed by light microscopic morphometry. Journal of Morphology, v. 184, n. 1, p. 51–59, 1985.

JOY, Teresa K. *et al.* The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. Experimental gerontology, v. 45, n. 9, p. 685, 1 set. 2010.

KACZMAREK, Agata *et al.* Insect Lipids: Structure, Classification, and Function. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. [S.l.]: Springer, Cham, 2024. v. 1 p. 1–45.

KALHAN, Satish C.; HANSON, Richard W. Resurgence of serine: An often neglected but indispensable amino acid. Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 24, p. 19786–19791, 8 jun. 2012.

KANG, David S. *et al.* Larval stress alters dengue virus susceptibility in *Aedes aegypti* (L.) adult females. *Acta Tropica*, v. 174, p. 97–101, 1 out. 2017.

KANNANGARA, Jade R.; MIRTH, Christen K.; WARR, Coral G. Regulation of ecdysone production in *Drosophila* by neuropeptides and peptide hormones. *Open Biology*, v. 11, n. 2, 2 fev. 2021.

KANTOR, Asher M. *et al.* Infection Pattern of Mayaro Virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Transmission Potential of the Virus in Mixed Infections With Chikungunya Virus. *Journal of medical entomology*, v. 56, n. 3, p. 832–843, 1 maio 2019.

KAWABATA, Kyuichi; YOSHIOKA, Yasukiyo; TERAO, Junji. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 370, v. 24, n. 2, p. 370, 21 jan. 2019.

KAWIECKI, Anna B.; CHRISTOFFERSON, Rebecca C. Zika Virus-Induced Antibody Response Enhances Dengue Virus Serotype 2 Replication in Vitro. *Journal of Infectious Diseases*, v. 214, n. 9, p. 1357–1360, 1 nov. 2016.

KAZEK, Michalina *et al.* Conidiobolus coronatus induces oxidative stress and autophagy response in *Galleria mellonella* larvae. *PloS one*, v. 15, n. 2, 1 fev. 2020.

KHAN, Shahidul Ahmed; KOJOUR, Maryam Ali Mohmmadie; HAN, Yeon Soo. Recent trends in insect gut immunity. *Frontiers in immunology*, v. 14, 2023.

KHRAPUNOV, Sergei *et al.* Structure, Function, and Thermodynamics of Lactate Dehydrogenases from Humans and the Malaria Parasite *P. falciparum*. *Biochemistry*, v. 60, n. 47, p. 3582–3595, 30 nov. 2021.

KICINSKA, Anna; JARMUSZKIEWICZ, Wieslawa. Flavonoids and Mitochondria: Activation of Cytoprotective Pathways? *Molecules*, v. 25, n. 13, p. 3060, 1 jul. 2020.

KOIRALA, B. K. Sonu; MOURAL, Timothy; ZHU, Fang. Functional and Structural Diversity of Insect Glutathione S-transferases in Xenobiotic Adaptation. *International Journal of Biological Sciences*, v. 18, n. 15, p. 5713, 2022.

KRAEMER, Moritz U. G. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 2015.

KROTH, N. *et al.* Oviposition preferences of the mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Culicidae): An urban environment bioassay. *Bulletin of Entomological Research*, v. 109, n. 6, p. 762–770, 1 dez. 2019.

KUMAR, Sanjeev *et al.* The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 24, p. 14139–14144, 25 nov. 2003.

KUMAR, Shashank *et al.* Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, n. 1, p. 162750, 1 jan. 2013.

KUNIEDA, T. *et al.* Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*, v. 15, n. 5, p. 563, out. 2006.

KURAISHI, Takayuki; HORI, Aki; KURATA, Shoichiro. Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in physiology*, v. 4, 2013.

KURUVILLA, A. Herbal formulations as pharmacotherapeutic agents. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 40, n. 1, p. 7–11, 2002.

LASS, Achim *et al.* Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell metabolism*, v. 3, n. 5, p. 309–319, maio 2006.

LEE, Gyunghee; PARK, Jae H. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 167, n. 1, p. 311–323, maio 2004.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, v. 42, n. Volume 42, 1997, p. 525–550, 1 jan. 1997.

LEMAITRE, Bruno; MIGUEL-ALIAGA, Irene. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics*, v. 47, p. 377–404, 2013.

LENNICKE, Claudia; COCHEMÉ, Helena M. Redox signalling and ageing: insights from *Drosophila*. *Biochemical Society transactions*, v. 48, n. 2, p. 367–377, 1 abr. 2020.

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

LI, Bing Hui; TIAN, Wei Xi. Inhibitory Effects of Flavonoids on Animal Fatty Acid Synthase. Journal of Biochemistry, v. 135, n. 1, p. 85–91, jan. 2004.

LI, Cailan *et al.* Potential of natural flavonols and flavanones in the treatment of ulcerative colitis. Frontiers in Pharmacology, v. 14, p. 1120616, 2023.

LI, Meili *et al.* Temperature dependent developmental time for the larva stage of Aedes aegypti. Mathematical Biosciences and Engineering 2022 5:4396, v. 19, n. 5, p. 4396–4406, 2022.

LI, Xi *et al.* Morin hydrate inhibits TREM-1/ TLR4-mediated inflammatory response in macrophages and protects against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Frontiers in Pharmacology, v. 10, n. SEP, p. 477455, 20 set. 2019.

LI, Yan; PAXTON, James W. The effects of flavonoids on the ABC transporters: consequences for the pharmacokinetics of substrate drugs. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, v. 9, n. 3, p. 267–285, mar. 2013.

LIANG, Jian *et al.* Evaluation of toxicity studies of flavonoid fraction of Lithocarpus polystachyus Rehd in rodents. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 88, p. 283–290, 1 ago. 2017.

LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. Revista de Saúde Pública, v. 50, n. 36, 2016.

LISEC, Jan *et al.* Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nature Protocols, v. 1, n. 1, p. 387–396, jun. 2006.

LIU, Kuanqing; SUTTER, Benjamin M.; TU, Benjamin P. Autophagy sustains glutamate and aspartate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during nitrogen starvation. Nature Communications, v. 12, n. 1, p. 57, 1 dez. 2021.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. Methods, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.

LOCASALE, Jason W. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature reviews. Cancer*, v. 13, n. 8, p. 572–583, ago. 2013.

LONG, Kanya C. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by Aedes aegypti. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 85, n. 4, p. 750–757, out. 2011.

LORD, Caleb C.; BROWN, J. Mark. Distinct roles for  $\alpha$ - $\beta$  hydrolase domain 5 (ABHD5/CGI-58) and adipose triglyceride lipase (ATGL/PNPLA2) in lipid metabolism and signaling. *Adipocyte*, v. 1, n. 3, p. 123–131, 2012.

LORENZ, Matthias W.; GÄDE, Gerd. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integrative and comparative biology*, v. 49, n. 4, p. 380–392, out. 2009.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LU, Kai *et al.* Adipokinetic Hormone Receptor Mediates Lipid Mobilization to Regulate Starvation Resistance in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Frontiers in Physiology*, v. 9, 29 nov. 2018.

LV, Huanhuan *et al.* Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Hindawi Limited, , 2019.

MACHADO, Samara Rosendo *et al.* The DEAD-box RNA helicase Dhx15 controls glycolysis and arbovirus replication in Aedes aegypti mosquito cells. *PLOS Pathogens*, v. 18, n. 11, p. e1010694, 1 nov. 2022.

MACLEOD, Hannah J.; DIMOPOULOS, George; SHORT, Sarah M. Larval Diet Abundance Influences Size and Composition of the Midgut Microbiota of Aedes aegypti Mosquitoes. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 18 jun. 2021.

MADEO, Frank *et al.* Spermidine in health and disease. *Science*, v. 359, n. 6374, 26 jan. 2018.

MAJEROWICZ, David; GONDIM, Katia C. Insect lipid metabolism: Insights into gene expression regulation. *In: Recent Trends in Gene Expression. [S.l.: S.n.]* p. 147–189.

MANACH, Claudine *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, n. 5, p. 727–747, 1 maio 2004.

MANZATO, Veronica Moraes *et al.* A versatile inhibitor of digestive enzymes in *Aedes aegypti* larvae selected from a pacifastin (TiPI) phage display library. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 590, p. 139–144, 29 jan. 2022.

MARTINEZ-IBARRA, Jose Alejandro *et al.* Influence of Plant Abundance on Nectar Feeding by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Southern Mexico. Journal of Medical Entomology, v. 34, n. 6, p. 589–593, 1 nov. 1997.

MARTINS, G. F. *et al.* Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. Tissue and Cell, v. 43, n. 2, p. 83–90, 1 abr. 2011a.

MARTINS, G. F.; PIMENTA, P. F. P. Structural Changes in Fat Body of *Aedes aegypti* Caused by Aging and Blood Feeding. Journal of Medical Entomology, v. 45, n. 6, p. 1102–1107, 2008.

MARTINS, Gf. O corpo gorduroso de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera; Nematocera)(Linnaeus, 1762): Estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições alimentares, isolamento, cultivo primário. [S.l.: S.n.].

MARTINS, Gustavo Ferreira *et al.* Histochemical and ultrastructural studies of the mosquito *Aedes aegypti* fat body: Effects of aging and diet type. Microscopy Research and Technique, v. 74, n. 11, p. 1032–1039, 2011b.

MARTINS, Gustavo Ferreira *et al.* A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 6, p. 742–747, 2011c.

MARTINS, Gustavo Ferreira *et al.* Insights into the transcriptome of oenocytes from *aedes aegypti* pupae. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 3, p. 308–315, 2011d.

MASUMURA, Makoto *et al.* Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*. General and Comparative Endocrinology, v. 118, n. 3, p. 393–399, 2000.

MATTHEWS, Dwight E. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. Journal of Nutrition, v. 137, n. 6, 2007.

MATTILA, Jaakko; HIETAKANGAS, Ville. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. Genetics, v. 207, n. 4, p. 1231–1253, 1 dez. 2017.

MEKAPOGU, A. R. Finney's probit analysis spreadsheet calculator (Version 2021). Disponível em: <<https://probitanalysis.wordpress.com/>>. Acesso em: 25 abr. 2023.

MERRITT, R. W.; DADD, R. H.; WALKER, E. D. Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, v. 37, n. 1, p. 349–374, 1 jan. 1992.

MEYER, Heiko; VITAVSKA, Olga; WIECZOREK, Helmut. Identification of an animal sucrose transporter. *Journal of Cell Science*, v. 124, n. 12, p. 1984–1991, 15 jun. 2011.

MISRA, Jyoti R. *et al.* Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes & development*, v. 25, n. 17, p. 1796–1806, 1 set. 2011.

MITCHELL, Martin J. *et al.* Effects of plant flavonoids and other allelochemicals on insect cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 23, n. 1, p. 65–71, 1993.

MORAES, Bruno *et al.* Deficiency of Acetyl-CoA Carboxylase Impairs Digestion, Lipid Synthesis, and Reproduction in the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Physiology*, v. 13, p. 934667, 22 jul. 2022.

MORDECAI, Erin A. *et al.* Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 4, p. e0005568, 27 abr. 2017.

MOREIRA, Daniel C.; HERMES-LIMA, Marcelo. Dynamics of Redox Metabolism during Complete Metamorphosis of Insects: Insights from the Sunflower Caterpillar *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera). *Antioxidants*, v. 13, n. 8, p. 959, 1 ago. 2024.

MORIMOTO, Masanori *et al.* Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, n. 2, p. 389–393, 15 jan. 2003.

MOYES, Catherine L. *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases* Public Library of Science, , 20 jul. 2017.

MURPHY, Michael P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

MURPHY, Thomas A.; WYATT, G. R. The Enzymes of Glycogen and Trehalose Synthesis in Silk Moth Fat Body *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. [S.l.: S.n.]

MUTHA, Rakesh E.; TATIYA, Anilkumar U.; SURANA, Sanjay J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 2021 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–13, 20 jan. 2021.

MUTHU, Chelliah *et al.* Bioefficacy of pectolinaringenin from Clerodendrum phlomidis Linn. F. against Anopheles stephensi and bhendi fruit borer, Earias vittella fab. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 58, n. 3, p. 358–366, 2015.

MUTHUKRISHNAN, J.; PUSHPALATHA, E. Effects of plant extracts on fecundity and fertility of mosquitoes. *Journal of Applied Entomology*, v. 125, n. 1–2, p. 31–35, 1 mar. 2001.

NAOWABOOT, Jarinyaporn; WANNASIRI, Supaporn; PANNANGPETCH, Patchareewan. Morin attenuates hepatic insulin resistance in high-fat-diet-induced obese mice. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 72, n. 2, p. 269–280, 1 jun. 2016.

NAPPI, A. J.; CHRISTENSEN, B. M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n. 5, p. 443–459, 2005.

NÄSSEL, Dick R.; BROECK, Jozef Vanden. Insulin/IGF signaling in Drosophila and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, v. 73, n. 2, p. 271, 1 jan. 2015.

NÄSSEL, Dick R.; ZANDAWALA, Meet. Recent advances in neuropeptide signaling in Drosophila, from genes to physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*, v. 179, 1 ago. 2019.

NATAL, Delsio. Bioecologia do Aedes aegypti. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 205–207, 2002.

NATION, James L. Insect Physiology and Biochemistry. 3. ed. GAINESVILLE: CRC Press, 2016. v. 672

NEINAST, Michael; MURASHIGE, Danielle; ARANY, Zoltan. Branched Chain Amino Acids. Annual review of physiology, v. 81, p. 139–164, 10 fev. 2019.

NEIRA, Marco *et al.* Estimation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) population size and adult male survival in an urban area in Panama. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 109, n. 7, p. 879, 1 nov. 2014.

NIJVELDT, Robert J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 74, n. 4, p. 418–425, 1 out. 2001.

OCDE. Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.oecd.org/termsandconditions/>>.

OEI, Steven *et al.* Higher intake of dietary flavonols, specifically dietary quercetin, is associated with lower odds of frailty onset over 12 years of follow-up among adults in the Framingham Heart Study. American Journal of Clinical Nutrition, v. 118, n. 1, p. 27–33, 1 jul. 2023.

OLIVEIRA, Jose Henrique M. *et al.* Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. PLoS Pathogens, v. 7, n. 3, mar. 2011.

OO, Adrian *et al.* Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. Antiviral Research, v. 150, p. 101–111, 1 fev. 2018.

PALANKER, Laura *et al.* Drosophila HNF4 Regulates Lipid Mobilization and β-Oxidation. Cell metabolism, v. 9, n. 3, p. 228, 4 mar. 2009.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science, v. 5, p. e47, 8 jan. 2016.

PARK, Cheol *et al.* Morin, a flavonoid from moraceae, induces apoptosis by induction of BAD protein in human leukemic cells. International journal of molecular sciences, v. 16, n. 1, p. 645–659, 30 dez. 2014.

PARK, Cheol *et al.* Morin, a Flavonoid from Moraceae, Induces Apoptosis by Induction of BAD Protein in Human Leukemic Cells. OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci, v. 16, p. 646, 2015.

PATWARDHAN, Bhushan *et al.* Ayurveda and Traditional Chinese Medicine: A Comparative Overview. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2, n. 4, p. 465–473, 1 jan. 2005.

PAVELA, Roman *et al.* Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. Acta Tropica Elsevier B.V., , 1 maio 2019.

PAVELA, Roman; BENELLI, Giovanni. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. Trends in Plant Science Elsevier Ltd, , 1 dez. 2016.

PAWLAK, Dariusz *et al.* Tryptophan metabolism via the kynurenine pathway in experimental chronic renal failure. Nephron, v. 90, n. 3, p. 328–335, 2002.

PEGG, Anthony E. Functions of polyamines in mammals. Journal of Biological Chemistry, v. 291, n. 29, p. 14904–14912, 15 jul. 2016.

PEREIRA, Thiago Nunes *et al.* Vector competence of Aedes aegypti, Aedes albopictus, and Culex quinquefasciatus mosquitoes for Mayaro virus. PLoS neglected tropical diseases, v. 14, n. 4, p. 1–13, 1 abr. 2020.

PERERA, Rushika *et al.* Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. PLOS Pathogens, v. 8, n. 3, p. e1002584, mar. 2012.

PETCHAMPAI, Natthida *et al.* Distinctive regulatory properties of pyruvate kinase 1 from Aedes aegypti mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 104, p. 82–90, 1 jan. 2019.

PINGALE, Tanvi Dayanand; GUPTA, Girdhari Lal. Acute and sub-acute toxicity study reveals no detrimental effect of formononetin in mice upon repeated i.p. dosing. Toxicology mechanisms and methods, v. 33, n. 8, p. 688–697, 2023.

PIRAHANCHI, Yasaman; SHARMA, Sandeep. Biochemistry, Lipase. In: StatPearls. [S.l.]: StatPearls Publishing, 2019.

POMPKA, Anna; SZULIŃSKA, Elżbieta; KAFEL, Alina. Starvation and cadmium affect energy reserves and oxidative stress in individuals of Spodoptera exigua. Ecotoxicology (London, England), v. 31, n. 9, p. 1346–1355, 1 nov. 2022.

POORAIIOUBY, Rana *et al.* Nutritional Quality during Development Alters Insulin-Like Peptides' Expression and Physiology of the Adult Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Insects* 2018, Vol. 9, Page 110, v. 9, n. 3, p. 110, 30 ago. 2018.

POWELL, Jeffrey R.; TABACHNICK, Walter J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, v. 82, n. 4, p. 513–523, 1 jun. 2011.

QUAGLIARIELLO, Vincenzo *et al.* Cardioprotective Effects of Nanoemulsions Loaded with Anti-Inflammatory Nutraceuticals against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Nutrients*, v. 10, n. 9, p. 1304, 14 set. 2018.

RAIKHEL, Alexander S.; DHADIALLA, Tarlochan S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, v. 37, n. 1, p. 217–251, 1 jan. 1992.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Bioactivity of flavonoid compounds from *Poncirus trifoliata* L. (Family: Rutaceae) against the dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, v. 104, n. 1, p. 19–25, 23 dez. 2008.

RAJPUT, Shahid Ali *et al.* Proanthocyanidins Alleviates AflatoxinB1-Induced Oxidative Stress and Apoptosis through Mitochondrial Pathway in the Bursa of Fabricius of Broilers. *Toxins* 2019, Vol. 11, Page 157, v. 11, n. 3, p. 157, 10 mar. 2019.

RAJPUT, Shahid Ali; WANG, Xiu qi; YAN, Hui Chao. Morin hydrate: A comprehensive review on novel natural dietary bioactive compound with versatile biological and pharmacological potential. *Biomedicine and Pharmacotherapy Elsevier Masson s.r.l.*, , 1 jun. 2021.

RAUF, Abdur *et al.* Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 116, p. 108999, 1 ago. 2019.

REZENDE, Gustavo Lazzaro *et al.* Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: Presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Developmental Biology*, v. 8, n. 1, p. 1–14, 13 set. 2008.

RICHARDS, A. G.; RICHARDS, P. A. The peritrophic membranes of insects. *Annual review of entomology*, v. 22, p. 219–240, 1977.

RIDDICK, Eric Wellington. Evaluating the Effects of Flavonoids on Insects: Implications for Managing Pests Without Harming Beneficials. *Insects*, v. 15, n. 12, 1 dez. 2024.

RIVERA, Maria J. *et al.* Regulated inositol synthesis is critical for balanced metabolism and development in *Drosophila melanogaster*. *Biology open*, v. 10, n. 10, 1 out. 2021.

RIVERO, A. *et al.* Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Journal of medical entomology*, v. 48, n. 3, p. 694–700, maio 2011.

ROEL, Antonia Railda *et al.* The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 54, n. 3, p. 505–510, 2010.

ROIZ, David *et al.* The rising global economic costs of *Aedes* and *Aedes*-borne diseases. *Research Square*, v. 933, n. 173054, 8 maio 2024.

ROMA, Gislaine Cristina; BUENO, Odair Corrêa; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Morphophysiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, v. 41, n. 5, p. 395–401, jul. 2010.

ROY, S. *et al.* Regulation of Reproductive Processes in Female Mosquitoes. *In: Advances in Insect Physiology*. [S.l.: S.n.], v. 51 p. 115–144.

ROY, S. G.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 37, n. 12, p. 1317–1326, 2007.

RUVOLO, Maria Claudia Colla; LANDIM, Carminda da Cruz. Morphologic and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 3, p. 387–395, 1993.

SANG, Ming *et al.* Identification and evolution of two insulin receptor genes involved in *Tribolium castaneum* development and reproduction. *Gene*, v. 585, n. 2, p. 196–204, 10 jul. 2016.

SANTOS, Daiane Rodrigues dos *et al.* New weapons against the disease vector *Aedes aegypti*: From natural products to nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* Elsevier B.V., , 25 ago. 2023.

SANZ, Alberto; STEFANATOS, Rhoda K. A. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Current aging science*, v. 1, n. 1, p. 10–21, 9 jan. 2008.

SARAIVA, Felipe B. *et al.* Blood meal drives de novo lipogenesis in the fat body of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 133, 1 jun. 2021.

SARAIVA, Raúl G. *et al.* Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 64, p. 53–64, 1 nov. 2016.

SCARAFFIA, P. Y.; WELLS, M. A. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology*, v. 49, n. 6, p. 591–601, 1 jun. 2003.

SCARAFFIA, Patricia Y. *et al.* Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n. 5, p. 491–503, 2005.

SCARAFFIA, Patricia Y. Disruption of Mosquito Blood Meal Protein Metabolism. *In: Genetic Control of Malaria and Dengue. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016.* p. 253–275.

SENTHIL-NATHAN, Sengottayan. A Review of Resistance Mechanisms of Synthetic Insecticides and Botanicals, Phytochemicals, and Essential Oils as Alternative Larvicidal Agents Against Mosquitoes. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 1591, 25 fev. 2020.

SHANBHAG, Shubha; TRIPATHI, Subrata. Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *The Journal of experimental biology*, v. 212, n. Pt 11, p. 1731–1744, 1 jun. 2009.

SHARMA, Arvind; NUSS, Andrew B.; GULIA-NUSS, Monika. Insulin-like peptide signaling in mosquitoes: The road behind and the road ahead. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, n. MAR, p. 1–9, 2019.

SHETTY, Vinaya *et al.* Impact of disabled circadian clock on yellow fever mosquito *Aedes aegypti* fitness and behaviors. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2022.

SHI, Huicheng; YU, Xi; CHENG, Gong. Impact of the microbiome on mosquito-borne diseases. *Protein & Cell*, v. 14, n. 10, p. 743, 1 out. 2023.

SHI, Zuo Kun *et al.* Effects of starvation on the carbohydrate metabolism in *Harmonia axyridis* (Pallas). *Biology Open*, v. 6, n. 7, p. 1096–1103, 15 jul. 2017.

SHUKLA, Ekta *et al.* Insect trehalase: physiological significance and potential applications. *Glycobiology*, v. 25, n. 4, p. 357–367, 1 abr. 2015.

SIEGLAFF, Douglas H.; DUNCAN, Kelli Adams; BROWN, Mark R. Expression of genes encoding proteins involved in ecdysteroidogenesis in the female mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n. 5, p. 471–490, 2005.

SILVA, Elaine R. M. N. *et al.* The influence of larval density on triacylglycerol content in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, p. 1–11, 3 nov. 2020.

SILVÉRIO, Maíra Rosato Silveiral *et al.* Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. *Molecules*, v. 25, n. 15, p. 3484, 1 ago. 2020.

SIM, Cheolho; DENLINGER, David L. Insulin signaling and the regulation of insect diapause. *Frontiers in Physiology*, v. 4 JUL, p. 54183, 22 jul. 2013.

SIM, Shuzhen; JUPATANAKUL, Natapong; DIMOPOULOS, George. Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses*, v. 6, n. 11, p. 4479, 19 nov. 2014.

SINGH, K. R. P.; BROWN, A. W. A. Nutritional requirements of *Aedes Aegypti* L. *Journal of Insect Physiology*, v. 1, n. 3, p. 199–220, 1957.

SINGH, Poonam *et al.* Untargeted metabolomics-based response analysis of temperature and insecticide exposure in *Aedes aegypti*. *Scientific reports*, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

SINHA, Krishnendu; GHOSH, Jyotirmoy; SIL, Parames C. Morin and Its Role in Chronic Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 928, p. 453–471, 1 set. 2016.

SIRAJ, Amir S. *et al.* Temperature modulates dengue virus epidemic growth rates through its effects on reproduction numbers and generation intervals. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. e0005797, 19 jul. 2017.

SKOWRONEK, Patrycja; WÓJCIK, Łukasz; STRACHECKA, Aneta. Fat Body—Multifunctional Insect Tissue. *Insects*, v. 12, n. 6, p. 547, 11 jun. 2021.

SØNDERGAARD, Leif. Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends in Genetics*, v. 9, n. 6, p. 193, jun. 1993.

SONI, Suha *et al.* Dengue, Chikungunya, and Zika: The Causes and Threats of Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases. *Cureus*, 11 jul. 2023.

SOUZA-NETO, Jayme A.; POWELL, Jeffrey R.; BONIZZONI, Mariangela. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 67, p. 191, 1 jan. 2018.

SOUZA-NETO, Jayme A.; POWELL, Jeffrey R.; BONIZZONI, Mariangela. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 67, p. 191–209, 1 jan. 2019.

STANLEY-SAMUELSON, David W. *et al.* Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 9, n. 1, p. 1–33, 1 jan. 1988.

STYER, Linda M. *et al.* Mortality and reproductive dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed human blood. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 7, n. 1, p. 86–98, 1 jan. 2007.

TAN, Qian Qian *et al.* Describing the diapause-preparatory proteome of the beetle *Colaphellus bowringi* and identifying candidates affecting lipid accumulation using isobaric tags for mass spectrometry-based proteome quantification (iTRAQ). *Frontiers in Physiology*, v. 8, n. APR, p. 251, 26 abr. 2017.

TARACENA, Mabel L. *et al.* Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 12, n. 5, 21 maio 2018.

TAVEIRA, Lúcia Antonia; FONTES, Luiz Roberto; NATAL, Délvio. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto: [S.n.]. . Acesso em: 6 maio. 2020.

TELANG, A. *et al.* Larval nutritional stress affects vector immune traits in adult yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*, v. 26, n. 3, p. 271–281, 1 set. 2012.

TELANG, Aparna *et al.* Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, n. 4, p. 645–655, 2006.

TELANG, Aparna; FRAME, Laura; BROWN, Mark R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Experimental Biology*, v. 210, n. 5, p. 854–864, 2007.

TENNESSEN, Jason M. *et al.* The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 2, p. 139–148, 2 fev. 2011.

TENYWA, Frank Chelestino *et al.* Sugar and blood: the nutritional priorities of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, v. 17, n. 1, p. 26, 1 dez. 2024.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, v. 109, n. 1, p. 1–62, set. 1994.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. *Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. Insect Molecular Biology and Biochemistry*, p. 365–418, 1 jan. 2011.

TEULIER, Loïc *et al.* Proline as a fuel for insect flight: enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 283, n. 1834, 13 jul. 2016.

TEVATIYA, Sanjay *et al.* Molecular and Functional Characterization of Trehalase in the Mosquito *Anopheles stephensi*. *Frontiers in Physiology*, v. 11, p. 575718, 19 nov. 2020.

THOMPSON, S. Nelson. Trehalose - The Insect “Blood” Sugar. *Advances in Insect Physiology*, v. 31, p. 205–285, 2003.

TIMMERMANN, S. E.; BRIEGEL, H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, v. 45, n. 5, p. 461–470, 1 maio 1999.

TOPRAK, Umut. The Role of Peptide Hormones in Insect Lipid Metabolism. *Frontiers in Physiology* Frontiers Media S.A., , 7 maio 2020.

TURAGA, Uday *et al.* Xenobiotic resistance in mosquito eggs: current understanding and data gaps. PeerJ, v. 13, n. 5, p. e19523, 2025.

TURGAY-İZZETOĞLU, Gamze; GÜLMEZ, Mehtap. Characterization of fat body cells at different developmental stages of *Culex pipiens*. Acta Histochemica, v. 121, n. 4, p. 460–471, maio 2019.

TZOU, Phoebe; DE GREGORIO, Ennio; LEMAITRE, Bruno. How *Drosophila* combats microbial infection: A model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Current Opinion in Microbiology, v. 5, n. 1, p. 102–110, 1 fev. 2002.

ULLAH, Asad *et al.* Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. Molecules, v. 25, n. 5243, 2020.

UPSHUR, Irvin Forde *et al.* Temperature and sugar feeding effects on the activity of a laboratory strain of *aedes aegypti*. Insects, v. 10, n. 10, 16 out. 2019.

VACHON, Vincent; LAPRADE, Raynald; SCHWARTZ, Jean Louis. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. Journal of Invertebrate Pathology, v. 111, n. 1, p. 1–12, 15 set. 2012.

VALZANIA, Luca *et al.* Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways. Developmental Biology, v. 454, n. 1, p. 85–95, 30 maio 2019.

VAN DER HORST, D. J. *et al.* Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. Mol Cell Biochem, v. 239, n. 1–2, p. 113–119, out. 2002.

VAN HANDEL, E. The obese mosquito. J. Physiol., v. 181, p. 478–486, 1965.

VAN HANDEL', Emile. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. J. Arut. Mosq. Corvnol Assoc. [S.l.: S.n.]

VANDOCK, Kurt P.; MITCHELL, Martin J.; FIORAVANTI, Carmen F. Effects of plant flavonoids on *manduca sexta* (tobacco hornworm) fifth larval instar midgut and fat body mitochondrial transhydrogenase. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 80, n. 1, p. 15–25, jun. 2012.

VEENSTRA, J. A. Do insects really have a homeostatic hypotrehalosaemic hormone? Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, v. 64, n. 4, p. 305–316, 1989.

VENANCIO, T. M. *et al.* The *Aedes aegypti* larval transcriptome: A comparative perspective with emphasis on trypsin and the domain structure of peritrophins. Insect Molecular Biology, v. 18, n. 1, p. 33–44, fev. 2009.

VENKATEISH, V. P.; RAJAMANIKANDAN, Sundarraj; PERUMAL, Madan Kumar. Morin inhibits the activity of pancreatic lipase and adipogenesis. European Journal of Pharmacology, v. 977, 15 ago. 2024.

VOTYAKOVA, Tatyana V.; REYNOLDS, Ian J. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: Interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 431, n. 1, p. 138–144, 1 nov. 2004.

WALSKI, Tomasz *et al.* Diversity and functions of protein glycosylation in insects. Insect biochemistry and molecular biology, v. 83, p. 21–34, 1 abr. 2017.

WALTHER, Tobias C.; FARESE, Robert V. The life of lipid droplets. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009. . Acesso em: 8 maio. 2020

WANG, Sha Sha *et al.* Regulation of Carbohydrate Metabolism by Trehalose-6-Phosphate Synthase 3 in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*. Frontiers in Physiology, v. 11, p. 575485, 17 set. 2020.

WANG, Xueli *et al.* Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 114, n. 13, p. E2709–E2718, 2017.

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. Present and future arboviral threats. Antiviral Research, fev. 2010.

WIGGINS, K.; EASTMOND, B.; ALTO, B. W. Transmission potential of Mayaro virus in Florida *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. Medical and veterinary entomology, v. 32, n. 4, p. 436–442, 1 dez. 2018.

WIGGLESWORTH, V. B. The Storage of Protein, Fat, Glycogen and Uric Acid in the Fat Body and other Tissues of Mosquito Larvae. Journal of Experimental Biology, v. 19, n. 1, p. 56–77, 1942.

WROŃSKA, Anna Katarzyna *et al.* Lipids as a key element of insect defense systems. Frontiers in GeneticsFrontiers Media S.A., , 2023.

WU, Guoyao. Functional amino acids in nutrition and health. Amino acids, v. 45, n. 3, p. 407–411, set. 2013.

WYATT, G. R.; LOUGHHEED, T. C.; WYATT, S. S. The chemistry of insect hemolymph: Organic components of the hemolymph of the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, and two other species. The Journal of General Physiology, v. 39, n. 6, p. 853, 1956.

XUE, Hui *et al.* Regulation of amino acid metabolism in *Aphis gossypii* parasitized by *Binodoxys communis*. Frontiers in Nutrition, v. 9, p. 1006253, 29 set. 2022.

YAFEI, Zhang; YONGMEI, Xi. Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. Journal of Tissue Science & Engineering, v. 06, n. 01, p. 1–8, 2015.

YAMASHITA, Atsushi *et al.* Glycerophosphate/Acylglycerophosphate acyltransferases. BiologyMDPI AG, , 19 nov. 2014.

YANG, Mengmeng *et al.* Knockdown of two trehalose-6-phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. Pest management science, v. 73, n. 1, p. 206–216, 1 jan. 2017.

YEE, W. L.; FOSTER, W. A. Diel Sugar-Feeding and Host-Seeking Rhythms in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. Journal of Medical Entomology, v. 29, n. 5, p. 784–791, 1 set. 1992.

YU, Hai Zhong *et al.* Inhibition of trehalase affects the trehalose and chitin metabolism pathways in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Insect Science, v. 28, n. 3, p. 718–734, 1 jun. 2021.

YU, Jing *et al.* Update on glycerol-3-phosphate acyltransferases: The roles in the development of insulin resistance. Nutrition and Diabetes, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

YUAN, Qiong *et al.* Metabolism of asparagine in the physiological state and cancer. Cell Communication and Signaling : CCS, v. 22, n. 1, p. 163, 6 mar. 2024.

YUAN, Wei; AHMAD, Shoaib; NAJAR, Ajaz. Morin, a plant derived flavonoid, modulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  mediated by AMPK pathway in hepatic stellate cells. American Journal of Translational Research, v. 9, n. 12, p. 5662, 2017.

ZANDI, Keivan *et al.* Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. Virology journal, v. 8, 2011.

ZECHNER, Rudolf *et al.* Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. Journal of Lipid Research, v. 50, n. 1, p. 3–21, 2009.

ZHANG, Dao Wei *et al.* Insect Behavior and Physiological Adaptation Mechanisms Under Starvation Stress. Frontiers in physiology, v. 10, n. MAR, 2019a.

ZHANG, Dao Wei *et al.* Insect behavior and physiological adaptation mechanisms under starvation stress. Frontiers in Physiology, v. 10, n. MAR, 2019b.

ZHANG, Qian; YAN, Yaping. The role of natural flavonoids on neuroinflammation as a therapeutic target for Alzheimer's disease: a narrative review. Neural Regeneration Research, v. 18, n. 12, p. 2582, 1 dez. 2023a.

ZHANG, Qian; YAN, Yaping. The role of natural flavonoids on neuroinflammation as a therapeutic target for Alzheimer's disease: a narrative review. Neural Regeneration Research, v. 18, n. 12, p. 2582, 1 dez. 2023b.

ZHANG, Yu Jie *et al.* Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. Molecules 2015, Vol. 20, Pages 21138–21156, v. 20, n. 12, p. 21138–21156, 27 nov. 2015.

ZIEGLER, Rolf; IBRAHIM, Mohab M. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology, v. 47, n. 6, p. 623–627, 2001.

ZIMMERMANN, Robert *et al.* Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, jun. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198108001881>>. Acesso em: 8 maio. 2020

