



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JULIANE NANCY DE OLIVEIRA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO SALINO E DA LECTINA
DA SARCOTESTA DE *Punica granatum* (PgTeL) CONTRA *Aedes aegypti*

RECIFE

2021

JULIANE NANCY DE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO SALINO E DA LECTINA
DA SARCOTESTA DE *Punica granatum* (PgTeL) CONTRA *Aedes aegypti***

Dissertação de Mestrado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira

RECIFE

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Juliane Nancy de Oliveira

Avaliação da atividade inseticida do extrato salino e da lectina da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) contra *Aedes aegypti* / Juliane Nancy de Oliveira Silva - 2021.

55 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Ana Patrícia Silva de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2021.

Inclui referências.

1. *Punica granatum* 2. *Aedes aegypti* 3. Inseticida natural

I. Napoleão, Thiago Henrique (Orientador) II. Oliveira, Ana Patrícia Silva de (Coorientadora) III. Título

572.2 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-188

JULIANE NANCY DE OLIVEIRA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO SALINO E DA LECTINA DA
SARCOTESTA DE *Punica granatum* (PgTeL) CONTRA *Aedes aegypti*

Dissertação apresentado como um dos
requisitos para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque
Universidade Federal do Piauí

Dra. Nataly Diniz de Lima Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Thamara Figueiredo Procópio
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 05 / 03 / 2021

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais
Edileusa e Olavo, por todo amor concedido a
mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por tudo que Ele fez e continua fazendo na minha vida, se não fosse a bondade dEle eu não estaria aqui. Nos momentos difíceis, Ele sempre esteve comigo, me guiando e me ensinando o caminho que eu deveria trilhar. Sou eternamente grata pelo seu amor e por ter me escolhido mesmo antes de nascer. Obrigada Senhor pelas Tuas misericórdias sem fim.

Quero agradecer aos meus pais Edileusa e Olavo, por todo amor e incentivo, e por fazerem o possível para me ajudar a chegar onde estou. Sou grata a Deus pela vida de vocês. Agradeço a minha irmã Mírian e meu cunhado Genilson pelo acolhimento e por me ajudarem tanto nesses últimos anos. A minha irmã Janainy e meu sobrinho Pedro, por sempre estarem comigo. A meus irmãos Mércia e Jonas e a toda minha família pelo apoio.

Agradeço a minhas amigas por sempre estarem presentes: a Mari, Karol, Alana, Mila, Bela, Kaw e Mika por todo companheirismo. Agradeço a minha segunda família, a Igreja Batista Missionária, a todos os meus líderes e aos meus ministérios por terem me ensinado a caminhar. Em especial ao Pr. Sílvio, Rose, Davi e Sophia por todo carinho.

Sou grata também à minhas amigas que estão comigo desde a graduação, Lethícia, Thaís, Catharina, Milca e Ester. E aos amigos que conquistei durante o Mestrado, Patryck, Simeone e Amanda.

A todos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (BIOPROT), pela ajuda e disposição, principalmente a Robson, Bia, Wenio e Clarice pelos momentos compartilhados.

A Pollyanna, que teve a difícil tarefa de me ensinar tanto a parte prática como a escrita assim que cheguei ao laboratório, e que não mediu esforços para compartilhar seus conhecimentos comigo. Louvo a Deus por sua vida. E à professora Patrícia Paiva, que me acolheu durante a graduação para ser sua orientanda me apoiando no que era preciso.

Quero agradecer em especial ao Professor Thiago Napoleão por me orientar durante esses dois anos de Mestrado, uma pessoa que sempre estava disponível quando precisei e que me ajudou em cada etapa, cada trabalho que precisava ser corrigido, obrigada.

À minha coorientadora Ana Patrícia, por ter me ajudando tanto neste trabalho. Se não fosse por sua ajuda eu não teria conseguido realizar os experimentos, e por ter compartilhado comigo seus conhecimentos.

Aos colaboradores deste trabalho por sua disponibilidade, a todos que fazem parte do Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de Mestrado.

E ao Departamento de Bioquímica e todos os seus funcionários.

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o mosquito responsável por transmitir as arboviroses Zika, Dengue e Chikungunya. O controle populacional desse vetor é essencial para que haja a diminuição na incidência dessas doenças. *Punica granatum* (romãzeira) é muito conhecida devido a sua utilização na medicina popular e já é sabido que a romã possui diversas atividades biológicas, dentre elas a toxicidade em insetos. Lectinas são proteínas amplamente encontradas nas plantas e algumas delas são relatadas como agentes inseticidas. A sarcotesta da romã contém uma lectina denominada PgTeL. O objetivo deste trabalho foi analisar a capacidade do extrato salino e fração proteica da sarcotesta da romã e de PgTeL isolada em induzir a morte de larvas do *A. aegypti*. Metabólitos secundários presentes no extrato foram avaliados por Cromatografia em Camada delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE). PgTeL foi isolada de acordo com protocolo já estabelecido. O ensaio larvicida foi executado utilizando o extrato, a fração ou a lectina para determinar a concentração letal necessária para matar 50% das larvas (CL₅₀). Além disso, também foi realizado o ensaio para determinar o efeito do extrato sobre a atividade de enzimas digestivas das larvas. O extrato salino apresentou uma CL₅₀ de 3,9% enquanto a fração proteica e PgTeL não apresentaram atividade larvicida. Análise por CCD revelou a presença de taninos hidrolisáveis, terpenos e esteroides, derivados cinâmicos e açúcares redutores. Análise por CLAE identificou a presença de ácido elágico (teor de 0,21 g%), punicalagina α (0,22 g%), punicalagina β (0,23 g%), derivado de ácido elágico (0,22 g%) e derivado cinâmico (0,39 g%). O extrato se mostrou capaz de interferir na atividade das enzimas digestivas amilase (estimulação ou inibição) e tripsina (inibição). Em conclusão, o extrato salino da *P. granatum* possui atividade larvicida contra *A. aegypti*, causando alterações na ação de enzimas digestivas, e a lectina PgTeL não é o princípio ativo contra as larvas.

Palavras chaves: *Punica granatum*; *Aedes aegypti*; inseticida natural; lectina.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the mosquito responsible for transmitting arboviruses Zika, Dengue and Chikungunya. Control of this vector population is essential for decrease the incidence of these diseases. *Punica granatum* (pomegranate) is well known due to its use in folk medicine and it is already known that pomegranate has several biological activities, including toxicity to insects. Lectins are proteins widely found in plants and some of them are reported as insecticidal agents. The pomegranate sarcotesta contains a lectin called PgTeL. The aim of this work was to analyze the ability of the saline extract and protein fraction from the pomegranate sarcotesta and isolated PgTeL to induce the death of *A. aegypti* larvae. Secondary metabolites present in the extract were evaluated by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). PgTeL was isolated according to an already established protocol. The larvicidal assay was performed using the extract, fraction or lectin to determine the lethal concentration needed to kill 50% of the larvae (LC_{50}). In addition, the test was also carried out to determine the effect of the extract on the activity of digestive enzymes of the larvae. The saline extract had an LC_{50} of 3.9% while protein fraction and PgTeL did not show larvicidal activity. TLC analysis revealed the presence of hydrolysable tannins, terpenes and steroids, kinematic derivatives and reducing sugars. Analysis by HPLC identified the presence of ellagic acid (0.21 g% content), punicalagin α (0.22 g%), punicalagin β (0.23 g%), derived from ellagic acid (0.22 g%) and cinnamic derivative (0.39 g%). The extract was shown to be able to interfere in the activity of digestive enzymes amylase (stimulation or inhibition) and trypsin (inhibition). In conclusion, the saline extract of *P. granatum* has larvicidal activity against *A. aegypti*, causing changes in the action of digestive enzymes, and PgTeL lectin is not the active ingredient against larvae.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	OBJETIVOS.....	11
1.1.1	Objetivo Geral.....	11
1.1.2	Objetivos Específicos.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	<i>Aedes aegypti</i>	13
2.1.1	Controle Populacional.....	16
2.2	<i>Punica granatum</i>	18
2.2.1	Compostos Bioativos da <i>P. granatum</i>.....	20
2.2.1.1	Punicalagina.....	20
2.2.1.2	Ácido elágico.....	22
2.2.1.3	Ácido cinâmico.....	23
2.2.1.4	Lectinas.....	24
3	RESULTADOS.....	26
4	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças transmitidas pelos artrópodes (insetos e aracnídeos) que causam diversas manifestações clínicas nos humanos. Estudos têm relacionado o aumento no número de casos dessas doenças a alterações no habitat, diminuição da biodiversidade, crescimento da urbanização e mudanças genéticas nos vetores, entre outros fatores (RODRIGUES-ALVES et al., 2020). O *Aedes aegypti*, ordem Diptera e família Culicidae, é um mosquito transmissor dos agentes etiológicos da Dengue, Zika, Febre amarela e Chikungunya, possuindo uma grande importância epidemiológica devido ao aumento de sua proliferação em ambiente urbano. As fêmeas desse mosquito necessitam de sangue para a maturação de seus ovos e, conseqüentemente, atuam como transmissoras dos vírus causadores dessas doenças durante seu hábito hematófago. Nem todas as doenças transmitidas pelo *A. aegypti* possuem vacina, apenas febre amarela e dengue; no caso da dengue, as vacinas disponíveis ainda possuem diversas restrições (por exemplo, aumentar risco de dengue grave em pessoas que nunca tiveram contato com vírus) e não fazem parte de programas de imunização (WILDER-SMITH, 2020). Sendo assim, se torna importante o controle populacional do mosquito.

Existem diferentes problemas relacionados principalmente à infraestrutura das cidades, o que pode se tornar um desafio e prejudicar as ações de controle da população do *A. aegypti*, (TERRA et al., 2017). Um dos principais meios para o controle populacional dos vetores é a utilização de inseticidas sintéticos, que tem sido baseado em organofosforados, os mais utilizados contra *A. aegypti*. Porém, o uso indevido desses inseticidas acaba resultando em um aumento da resistência dos mosquitos, além de causar impacto ambiental devido à elevada toxicidade contra espécies não-alvo (LOZOWICKA et al., 2016). Sendo assim, tem aumentado a busca por novos compostos que sejam ambientalmente seguros e que possuam uma boa eficácia contra o mosquito (ZARA et al., 2016).

A romãzeira (*Punica granatum* L.) é uma planta nativa da Ásia Central bastante utilizada na medicina popular e para fins alimentícios. Seu fruto (romã) é muito conhecido pelo seu sabor e por possuir benefícios à saúde (rico em nutrientes, prevenção de infecções). Estudos têm demonstrado relevantes propriedades biológicas da romã, dentre as quais a antioxidante (YUAN et al., 2018); antimicrobiana (ELBATANONY et al., 2019); antiviral (ARUNKUMAR; RAJARAJAN, 2018), anti-inflamatória (AMBARWATI et al., 2017) e inseticida (GUPTA;

DHARMA; KUMAR, 2017). Inúmeros compostos já foram identificados em diferentes partes da romã, dentre eles taninos hidrolisáveis, antocianinas e lectinas (SILVA et al., 2016; WU; TIAN, 2017; SINGH et al., 2018).

Lectinas são proteínas capazes de se ligar a carboidratos de maneira reversível. (MANNING et al., 2017). As lectinas podem ser encontradas em diversos seres vivos, desde microrganismos até animais, sendo bastante relatadas em plantas (raiz, caule, folha, fruto, casca, sementes). Suas interações com os carboidratos que estão presentes na superfície celular podem desencadear uma série de atividades biológicas, tais como antimicrobiana (COELHO et al., 2018), inseticida (REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018), anticâncer (BHUTIA et al., 2019) e antiviral (MITCHELL et al., 2017).

As lectinas podem ser resistentes à proteólise por enzimas digestivas presentes no trato digestivo de insetos, podem interagir com a matriz peritrófica (membrana presente no intestino dos insetos), bem como podem interferir na atividade das enzimas digestivas, prejudicando a digestão e absorção dos nutrientes. (NAPOLEÃO et al., 2019). As lectinas isoladas de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folhas (MuLL) de *Myracroduron urundeuva* apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti*, interferindo na atividades de enzimas digestivas e na organização do epitélio (COELHO et al., 2009; SÁ et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2012; AGRA-NETO et al., 2014). A WSMoL apresentou ainda ação ovicida e efeito estimulante na oviposição (SANTOS et al., 2012, 2014).

A testa de romã contém uma lectina chamada PgTeL, que pode ser isolada a partir da sarcotesta (parte mais externa da testa, de consistência gelatinosa) de acordo com o procedimento estabelecidos por Silva et al. (2016). A PgTeL é uma lectina ligadora de quitina, que possui algumas atividades biológicas já descritas, como antibacteriana e antifúngica (SILVA et al., 2018; 2019a; 2019b; 2020).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade larvicida do extrato salino, fração proteica e da lectina (PgTeL) de sarcotesta de *Punica granatum* contra *Aedes aegypti*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição fitoquímica do extrato salino da sarcotesta de *P. granatum*, através das cromatografias em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE).
- Purificar a lectina PgTeL seguindo procedimento previamente estabelecido.
- Avaliar o efeito do extrato, fração proteica e PgTeL na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* no quarto estágio.
- Determinar o efeito do extrato na atividade de enzimas digestivas (amilase e tripsina) das larvas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* pertence à ordem Diptera e à família Culicidae. Esse mosquito é originário da África, porém amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. Seu ciclo de vida é formado por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os três primeiros são considerados estágios imaturos e ocorrem na água. A fêmea põe seus ovos isolados em locais próximos à superfície da água, após a eclosão, surgem as larvas, que passam por quatro estágios larvais até chegarem ao estágio de pupa. Diferentemente das larvas, as pupas não se alimentam até chegarem no imago, ou seja, o adulto. A alimentação dos adultos acontece através de néctares florais (machos e fêmeas) e sangue (fêmeas grávidas) (SIMOY et al., 2015; RUEDA; DEBBOUN, 2020).



Figura 1. Ciclo de vida do mosquito, mostrando suas 4 fases: ovo, larva, pupa e adulto. Fonte: RUEDA; DEBBOUN (2020).

Os ovos de *A. aegypti* são bastante resistentes tanto à dessecação como a baixas temperaturas, podendo resistir por vários meses fora da água, conferindo uma grande capacidade

de adaptação (SIMOY et al., 2015; BARRERA, 2016). As larvas possuem um corpo composto principalmente por tecidos membranosos e se alimentam principalmente de matéria orgânica em suspensão, com sua respiração se dando através de aberturas espiraculares. Para seu crescimento é necessário que a larva passe por quatro mudas até chegar na fase de pupa; De acordo com a quantidade de alimento e a temperatura da água o tempo para completar seu desenvolvimento pode variar, levando no mínimo cinco dias (OLIVEIRA, 2015; SIMOY et al., 2015). A pupa é a fase intermediária entre dois estágios ativos (larvas e adultos), e dependendo da temperatura pode permanecer nessa fase de um dia a semanas. Após completar seu desenvolvimento, o mosquito adulto deixa a água completando assim a sua metamorfose. O mosquito adulto é coberto por um exoesqueleto e em seus primeiros dias como adulto termina seu desenvolvimento, estando apto para cópula. O tempo de vida média de um mosquito adulto é de 30 dias em seu habitat natural, podendo viver por mais tempo em condições de laboratório. Suas fêmeas necessitam de proteínas presentes no sangue para concluir sua ovogênese colocando em cada ciclo cerca de 60 a 120 ovos; durante sua vida elas podem ter mais que três ciclos. Já foi visto que as fêmeas preferem sangue humano para o repasto sanguíneo, sendo esta a causa da transmissão de diversas doenças (NELSON et al., 1986; OLIVEIRA, 2015; SIMOY et al., 2015; SUKIATO et al., 2019).

O *A. aegypti* é um dos principais vetores que transmitem uma variedade de arboviroses, como febre amarela, dengue, zika e Chikungunya. Devido ao grande aumento da população humana e sua urbanização em locais sem saneamento básico e infraestrutura, tem crescido a incidência de doenças transmitidas pelo *A. aegypti*, além de favorecer a reprodução e desenvolvimento desses mosquitos (LIU et al., 2019; PEREIRA-FILHO et al., 2020).

Os vírus causadores da Dengue (DENV), do Zika (ZIKV) e da Febre Amarela (YFV) são do gênero *Flavivirus* (Família Flaviviridae), que inclui vírus envelopados que possuem fita simples de RNA sentido positivo. A dengue é causada por quatro sorotipos diferentes do DENV e é responsável por milhões de infecções no mundo por ano, com diversas manifestações clínicas que vão desde casos assintomáticos e leves, até dengue com grave risco de vida, chamada de dengue severa ou dengue hemorrágica. Os sintomas em uma pessoa infectada com o DENV são febre alta, dores de cabeça, dores no corpo e articulação, fraqueza, dor atrás dos olhos, erupção cutânea e coceira. Sua forma grave pode levar a dores abdominais intensas, vômitos e sangramentos de mucosas (FERREIRA et al., 2019; AGUILAR-BRISEÑO; MOSER; RODENHUIS-ZYBERT, 2020; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020). O vírus

ZIKV, isolado pela primeira vez em humanos em Uganda e Tanzânia em 1952, apresenta manifestações clínicas parecidas com a dengue, incluindo febre, dor muscular, dor de cabeça, conjuntivite e outras. Uma das sequelas que o ZIKV pode apresentar é uma condição neurológica, a microcefalia, que está associada a bebês com cabeças menores do que a média de crianças consideradas normais (GUARNER; HALE, 2019; DUGUMA; RUEDA; DEBBOUN, 2020).

A febre amarela é uma febre hemorrágica viral, que pode apresentar uma taxa de mortalidade de até 50% dos infectados. Apesar de possuir vacina para sua prevenção, o vírus ainda pode causar alguns surtos, como o que ocorreu no Brasil entre dezembro de 2016 a março de 2018, com mais de 2000 casos confirmados. Ela apresenta como manifestação clínica febre alta, dor de cabeça, náusea, falta de apetite e nos casos graves os pacientes podem apresentar doenças cardíacas, hepáticas e renais, sendo comuns olhos e pele amarelada (BARRET, 2018; LITVOC; NOVAES; LOPES, 2018)

Outro gênero de vírus envelopados de RNA sentido positivo é o *Alphavirus* (família Togaviridae), que inclui o vírus causador da Chikungunya (CHIKV) (BUTTON et al., 2020). A Chikungunya é caracterizada pelo desenvolvimento de artrite e artralgia juntamente com febre e erupção cutânea. A inflamação nas articulações pode ser considerada uma sequela dessa doença, pois essas complicações podem continuar em longo prazo, inclusive causando dores intensas e limitação de movimentos (VU et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Segundo dados da Organização Pan-Americana de Saúde, houve mais de 1,6 milhões de casos reportados de arboviroses no primeiro semestre de 2020 nas Américas. A Dengue apresentou 97,3 % dos casos, enquanto que a Chikungunya e Zika apresentaram 37.279 e 7.452 casos, respectivamente. Já a febre amarela foi reportada no período sazonal de 2018-2019 em três países das Américas (Bolívia, Brasil e Peru), sendo no Brasil 50 casos confirmados e 12 mortes (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019; 2020).

As doenças transmitidas pelo *A. aegypti*, com exceção da febre amarela e da dengue, ainda não possuem vacina para sua prevenção. Além disso, a única vacina da dengue licenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a Dengvaxia, da multinacional francesa Sanofi Pasteur, que ainda possui muitas restrições, devido ao aumento de risco de dengue grave em indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus. Sendo assim, a prevenção

dessas doenças acontece principalmente através do controle populacional do mosquito (THOMAS; YOON, 2019).

2.1.1 Controle populacional

Há uma enorme dificuldade em controlar a população desses mosquitos, uma vez que eles se refugiam em diversos locais tanto dentro das residências como fora delas, desde que haja um habitat aquático ideal para o seu desenvolvimento imaturo até chegar novamente à fase adulta. (BARRERA, 2016). Uma das principais formas de controle é o uso de larvicidas, que são aplicados no corpo da água, sendo mais comuns os organofosforados, como por exemplo, temefós, clorpirifós e pirimifós-metil. Porém, o uso indevido desses inseticidas químicos sintéticos levou ao aumento na resistência dos mosquitos durante as últimas décadas (PAVELA et al., 2019; AMARASINGHE et al., 2020).

O desenvolvimento da resistência pode acontecer de diferentes formas: por meio de características genéticas já presentes antes do uso do inseticida; através do aumento da expressão enzimas de desintoxicação; ou mutação na sequência de proteínas que vão resultar em insensibilidade ao inseticida. Além dessas modificações, ainda existem a alteração no exoesqueleto para impedir a entrada do inseticida e mudanças comportamentais. Quando um inseticida é utilizado intensamente ele faz uma seleção, onde os organismos susceptíveis são dizimados e os resistentes que antes eram poucos, passam a se reproduzir e a serem predominantes na população (VALLE et al., 2015; MARCOMBE et al., 2019).

Já existem relatos sobre a resistência de *A. aegypti* aos inseticidas Cipermetrina, Permetrina e Deltametrina da classe dos piretróides; da classe dos organofosforados, os Temefós e Malathion; e dos organoclorados o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (DIAS et al., 2017; FRANCIS et al., 2017; VARGAS-MIRANDA et al., 2019; GUEDES et al., 2020). Além de causar resistência aos mosquitos, esses inseticidas podem prejudicar o ambiente em que foram depositados. Os organoclorados podem afetar uma cadeia alimentar se forem depositados em lugares inapropriados, pois devido a sua capacidade lipossolúvel eles são encontrados em corpos gordurosos; já há relatos de seus danos em animais como golfinhos, trutas, aves e até humanos. Os organofosforados também podem afetar os vertebrados, porém eles não possuem a capacidade

de se acumular nos tecidos, podendo ser biotransformados pelo fígado (OLIVEIRA et al., 2017; LE GOFF; GIRAUDO, 2019).

Uma alternativa menos tóxica e de origem natural para controle de *A. aegypti* é a bactéria *Bacillus thuringiensis* serovar *israelenses* (Bti), que produz endotoxinas ativadas a partir da sua digestão através das enzimas digestivas das larvas. Elas causam uma série de alterações ao se ligarem ao tubo digestivo, tendo como consequência a morte das larvas. Apesar do Bti não afetar humanos ou peixes, ele pode ser tóxico para outras espécies de dípteros. Além disso, o Bti pode ser inativado com a luz do sol e calor intenso, o que dificulta o seu uso em lugares com clima quentes (VALLE et al., 2015; MOLTINI-CONCLOIS et al., 2018)

Sendo assim, são testados continuamente uma gama de outros compostos naturais que possam aumentar o número de inseticidas disponíveis, ampliando as possibilidades de rotatividade, diminuindo assim as taxas de desenvolvimento de resistência. Dentre as preparações naturais, de origem vegetal, com ação inseticida contra larvas de *A. aegypti* estão o extrato metanólico de abacate verde (*Persea americana*), foi testado contra larvas de *A. aegypti* e apresentou atividade larvicida, com LC_{50} 7,12 ppm (LOUIS et al., 2020). Outro extrato que também apresentou resultado larvicida foi o extrato etanólico do endocarpo de *Dracaena loureiri*, LC_{50} <50 mg/L (THONGWAT et al., 2017); lectinas isoladas de sementes de *Moringa oleífera* (WsMoL; LC_{50} 0,197 mg/mL⁻¹) e diversas partes de *Myracrodruon urundeuva* (MuBL LC_{50} 0,125 mg/mL; MuHL LC_{50} 0,04 mg/mL; MuLL LC_{50} 0,202 mg/mL) (COELHO et al., 2009; SÁ et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016); e óleos essenciais da casca e folha de *Citrus aurantifolia*, com LC_{50} de 128,81 e 188,59 ppm, respectivamente (SARMA et al., 2019).

Já existem inseticidas naturais que vêm sendo utilizados no controle do *Aedes aegypti*, como por exemplo, o Spinosad obtido através da fermentação da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, atuando no controle de diversas pragas, incluindo moscas e cupins. Ele é encontrado na forma de suspensão líquida ou em formulações secas, e foi registrado como protetor de grãos nos Estados Unidos da América em 2005, pela US-EPA, sua taxa máxima de uso permitida é de 1 ppm e tolerância em 1,5 ppm. Estudos relatam a eficácia do Spinosad contra larvas e ovos do *A. aegypti*, e também existem testes toxicológicos demonstrando que a quantidade utilizada contra as larvas de *A. aegypti* é bem inferior à concentração que causa certa toxicidade em crustáceos *Daphnia magna*. Devido a sua rápida degradação no meio ambiente o Spinosad é considerado um

inseticida ambientalmente seguro (HERTLEIN et al., 2011; FERNANDES et al., 2019; SANTOS et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

2.2 *Punica granatum*

A romãzeira (*Punica granatum* L.), pertencente à família Lythraceae, é uma planta arbustiva grande ou uma árvore de pequeno porte. Seu fruto é conhecido por romã (Figura 2), e apresenta em seu interior um grande número de sementes cobertas por uma polpa, chamada de sarcotesta (Figura 2E), parte comestível do fruto (MELGAREJO et al., 2020). A *P. granatum* é originária do Oriente Médio, possivelmente do Irã e a partir desta região foi diversificando para outras. Ela é considerada uma das frutas comestíveis mais antiga (KHADIVI et al., 2020).

Na medicina popular as sementes da romãzeira são utilizadas para prevenir doenças urinárias e melhorar a micção. Em outras culturas como a Chinesa, a romã é utilizada no tratamento de diabetes. Seu fruto também tem sido utilizado nos tratamentos de acidose, disenteria, hemorragias, doenças respiratórias, entre outras (KHWAIRAKPAM et al., 2018).

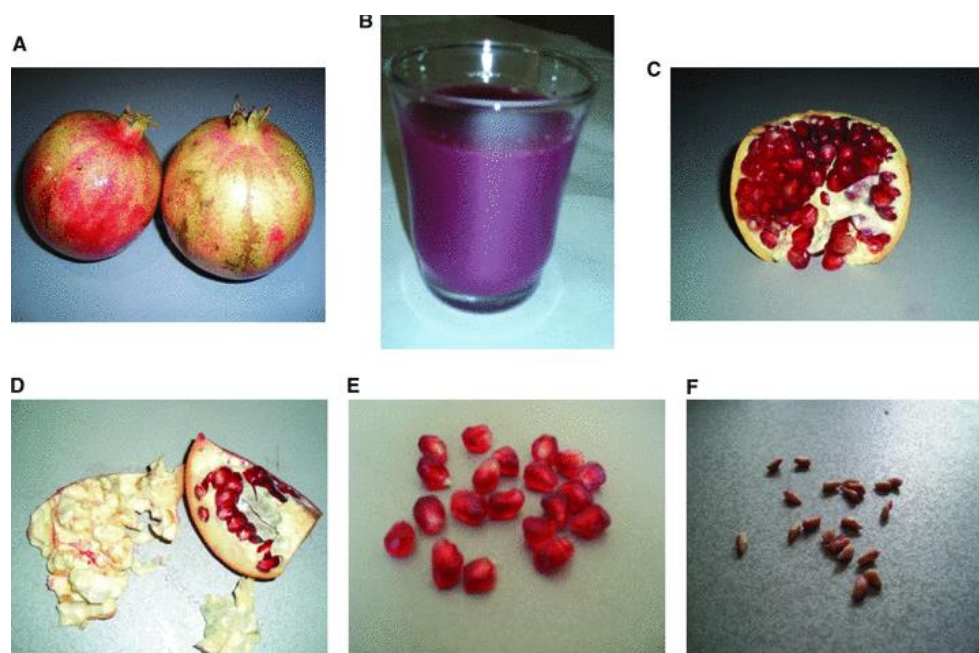


Figura 2. Diferentes partes da romã, o fruto inteiro (A); Suco da romã (B); Fruto aberto (C); Casca e pele da romã (D); Sementes cobertas pela sarcotesta (E) e sementes (F). Fonte: Viuda-Martos et al. (2010).

Devido a suas propriedades medicinais (anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anticâncer, ajudando também no tratamento de diarreia, disenteria e na inflamação de garganta) da *P. granatum* e seu grande número de compostos ativos, diversas atividades biológicas vêm sendo investigadas. Como, por exemplo, o extrato etanólico da casca apresentou atividade antioxidante, tendo demonstrado uma grande quantidade de fenólicos e flavonoides em sua composição (DERAKHSHAN et al., 2018). O galactomanano (PSP001) isolado da casca do fruto da romã reduziu a migração e invasão de linhagens de células cancerígenas, como A549 (Câncer de pulmão), A375 (melanoma maligno) e B16F10 (melanoma murino), tendo potencial anti-metastático (VARGHESE et al., 2017). Outro estudo feito com a *P. granatum* descreveu a atividade de extrato alcoólico da casca do fruto contra parasitas coccidianos de frango (AHAD et al., 2018).

A acne é uma condição da pele onde ocorre inflamação e a presença de alguns tipos de bactérias, como *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus*. A romãzeira já foi descrita possuindo atividade anti-inflamatória e seu extrato em acetona da casca seca apresentou atividade antibacteriana para *P. acnes* e *S. aureus* (LEE et al., 2017). A sua casca também foi testada no tratamento de cáries dentárias. Foram utilizados acetona, etanol e metanol para preparação de extratos e seis espécies de patógenos (*Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus bugandensis* e *Klebsiella oxitoca*). Todas as bactérias foram sensíveis aos extratos, com valores de CMI entre 0,0125 a 100 mg/mL. Além disso, os extratos também conseguiram inibir a formação do biofilme, principalmente em *S. epidermis* e *E. faecalis* (BENSLIMANE et al., 2020). Os extratos hidroalcoólico do suco e da casca foram avaliados frente às bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* Clarke ATCC® 25175™ e *Rothia dentocariosa*. O extrato da casca apresentou CMI de 10 µg/µL e CMB de 15 µg/µL para as duas cepas, enquanto que o extrato do suco apresentou CMI de 25 e 20 µg/µL, com CMB de 40 e 140 µg/µL para *S. mutans* e *R. dentocariosa*, respectivamente (FERRAZZANO et al., 2017).

Inseticidas de origem natural e biodegradáveis (extratos vegetais, lectinas, óleos essenciais etc.) têm sido apontados como uma alternativa para o controle de insetos considerados pragas urbanas e agrícolas e vetores de doenças. Extratos feitos a partir da casca da romã (em metanol, hexano, acetato de etila, clorofórmio ou água) apresentaram atividade pesticida contra cupins *Microcerotermes beelsoni* (MISHRA et al., 2017). Extrato da casca de *P. granatum*

(etanólico) também foi testado contra larvas e adultos de *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, causando 48% de mortalidade das larvas e 100% de mortalidade de adultos, na concentração de 37,4 mg/mL (EL NAMAKY et al., 2020). Extrato metanólico das folhas de *P. granatum* apresentou atividade contra larvas de *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, obtendo uma CL₅₀ de 125,78 e 115,28 ppm, respectivamente (JEBANESAN et al., 2020).

A romãzeira apresenta componentes bioativos com variadas atividades biológicas, a maioria deles pertencentes às classes dos taninos e polifenóis. Dentre esses compostos, serão destacados quatro deles nos próximos tópicos.

2.2.1 Compostos Bioativos da *P. granatum*

2.2.1.1 Punicalagina

Taninos são polifenóis vegetais de alto peso molecular. Dentre eles estão os hidrolisáveis, que são ésteres de ácido gálico e ácido elágico glicosilados. Dentro dos taninos hidrolisáveis existe ainda uma classe denominada elagitanino, derivado do metabolismo de ácido gálico ligado a uma glicose (MONTEIRO et al., 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2010). A punicalagina é um tipo de elagitanino hidrolisável, considerada uma molécula grande (massa molecular 1084,71 Da). Ela é composta por 3 porções: ácidos gálico e ácido elágico ligados por uma unidade de glicose (Figura 3); de acordo com a posição dessa glicose, a punicalagina pode assumir duas formas, α e β (BARBIERI; HEARD, 2019). Ela possui diversos potenciais terapêuticos devido à grande quantidade de grupos hidroxila fenólicos em sua estrutura. Um exemplo disto é sua ação antioxidante (OUDANE et al., 2018).

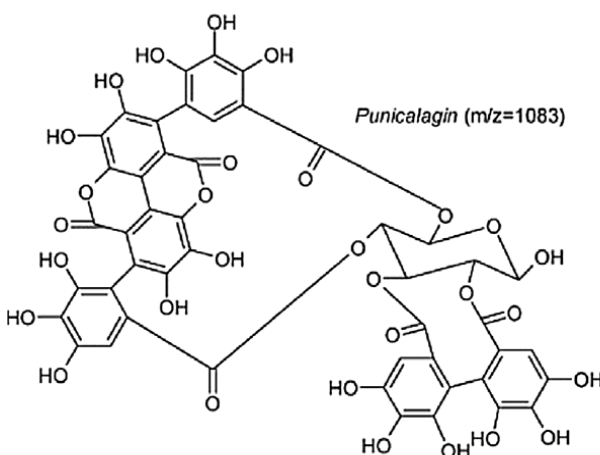
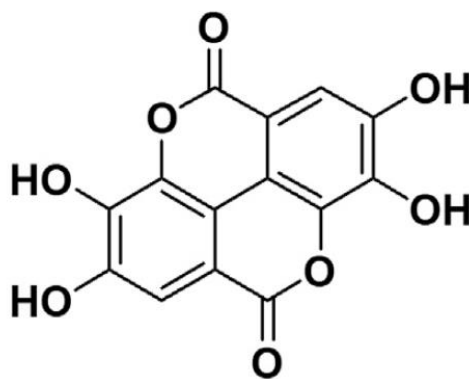


Figura 3. Estrutura química da punicalagina. Fonte: BARBIERI; HEARD, (2019).

Estudos feitos com a punicalagina demonstraram que essa molécula diminuiu a viabilidade das células do câncer cervical (ME-180), induzindo apoptose dessas células. (ZHANG et al., 2020). Foi investigada a ação da punicalagina contra cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), em combinação com o antibiótico oxacilina para saber se ela potencializa o antibiótico. Observou-se que a CMI (concentração mínima inibitória) da oxacilina diminuiu de 4 a 64 vezes quando a punicalagina estava presente, indicando que a molécula aumenta a sensibilidade da MRSA à oxacilina (MUN et al., 2018). Outro estudo feito com as punicalaginas α e β , identificadas e separadas a partir do extrato etanólico da casca, demonstrou que elas são compostos antibacterianos, tanto para gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus mundtii*) como gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*) (GOSSET-ERARD et al., 2021). Além de possuir atividade antibacteriana a punicalagina também apresentou atividade antifúngica (RONGAI et al., 2019) e antiviral contra o vírus da Herpes Simplex-2 (HSV-2) (ARUNKUMAR; RAJARAJAN, 2018); Além disso ela causou efeito antiproliferativo e indutor de apoptose em células humanas de carcinoma hepatocelular HepG2 (LI et al., 2019) e em células do câncer de próstata (ADARAMOYE et al., 2017). Em animais a punicalagina foi testada contra nematoda (*Bursaphelenchus xylophilus*) e esta apresentou atividade chegando a alterar a sua morfologia (GUO et al., 2017). Até a finalização deste trabalho não foram encontrados estudos sobre atividade inseticida da punicalagina.

2.2.1.2 Ácido elágico

O ácido elágico é um ácido fraco inodoro, que possui uma solubilidade insignificante em água e também em álcool. Ele possui em sua estrutura uma parte hidrofílica com quatro unidades de hidroxilas e duas lactonas, junto com uma parte lipofílica com dois anéis de hidrocarbonetos (Figura 4) (RIOS et al., 2018). Ele pode ser considerado um metabólito secundário, encontrado em muitas plantas medicinais e vegetais, como por exemplo, em romãs, framboesas, amoras, morangos, nozes, entre outras. Nos alimentos a base de plantas, ele pode ser encontrado na forma livre, como glicosídeo ou como um polímero elagitanino (ALFEI et al., 2019). Inúmeros ácidos fenólicos foram encontrados no extrato da casca da romã em cultivares de diferentes países, dentre eles, o ácido elágico foi encontrado em maior quantidade. Sua presença e a de múltiplos compostos fenólicos nesse extrato mostram uma grande capacidade antioxidante (SINGH et al., 2018).



Ellagic acid (EA)

Figura 4. Estrutura química do ácido elágico. Fonte: ALFEI, et al. (2019).

O ácido elágico obtido da Sigma-Aldrich aumentou a mortalidade de larvas *Spodoptera litura*, lagarta hospedeira do parasita *Bracon hebetor*. Além desse resultado, ele também diminuiu a passagem dessas larvas para forma adulta e influenciou no desenvolvimento do parasita (PUNIA et al., 2020). Estudos com ácido elágico isolados da romã demonstraram que este composto apresentou atividade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* (SUN et al., 2017). Além

dessas atividades, o ácido elágico também possui atividades anti-inflamatória e anticarcinogênica (USTA et al., 2013).

2.2.1.3 Ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos (AC) são um tipo de ácidos fenólicos que possuem nove átomos de carbono (Figura 5), podendo ser encontrados no citoplasma e ligados a parede celular das plantas. Os diversos derivados dos AC ocorrem por uma substituição na posição do anel fenil, o que causa a formação de diferentes ácidos como o cafeico e o ferúlico. AC e seus derivados são encontrados em frutas e vegetais, como por exemplo, em frutas cítricas, uva, chá, entre outros. Já existem diversas evidências que mostram que os AC possuem benefícios para a saúde, possuindo ação antioxidante e antidiabética (ANLAR, 2020). Outras ações já foram atribuídas aos AC e seus derivados como anticâncer (PONTIKI et al., 2014), antimicrobiana (KOROŠEC et al., 2014), leishmanicida (RODRIGUES et al., 2019) e inseticida (BUXTON et al., 2020).

Um extrato salino das folhas de *Schinus terebinthifolius* causou danos ao intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*, e observou-se que o efeito larvicida pode ser atribuído a presença dos derivados cinâmicos no extrato (PROCÓPIO et al., 2015). Esse mesmo extrato também apresentou propriedades inseticidas contra *Sitophilus zeamais* (CAMAROTI et al., 2018). Outro estudo envolvendo os derivados cinâmicos contra *Aedes aegypti* já foi descrito, comprovando sua utilização como agente inseticida (ARAÚJO et al., 2021).

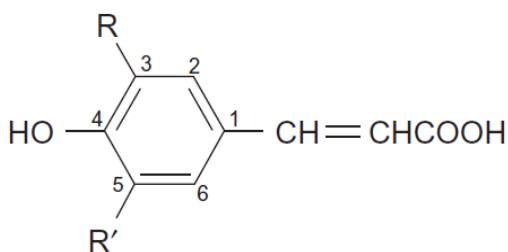


Figura 5. Estrutura química dos ácidos cinâmicos. Fonte: ANLAR (2020).

2.2.1.4 Lectinas

Lectinas são proteínas que possuem a capacidade de se ligar a carboidratos, podendo aglutinar células ou glicoconjugados. O nome “lectina” é derivado do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher (BOYD; SHAPLEIGH 1954 *apud* MISHRA, 2019). As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, principalmente nas plantas. Elas são encontradas em diversas partes das plantas, como raiz, folhas, rizomas, caules, flores e frutos. Possuem várias atividades biológicas e propriedades químicas, tendo um grande papel biológico na função protetora das plantas, como por exemplo, contra bactérias, fungos, insetos ou contra ataques de predadores (RIBEIRO et al., 2018; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019; TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Diversos estudos avaliaram a toxicidade das lectinas em diferentes espécies de insetos, apresentando efeitos em diferentes fases do desenvolvimento (ovos, larvas, adultos), podendo ocorrer um aumento na mortalidade, atraso no desenvolvimento e redução na fecundidade (NAPOLEÃO et al., 2019). Existem lectinas com ação contra diferentes ordens de insetos (Coleoptera, Lepidoptera e Diptera), como a WSMoL e MvRL, isoladas respectivamente de sementes de *M. oleífera* e do rizoma de *Microgramma vacciniifolia*, que afetaram negativamente a fisiologia nutricional dos adultos de *Sitophilus zeamais* (ALBUQUERQUE et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020).

Um exemplo de lectina que possui atividade inseticida contra larvas do *A. aegypti* é a WSMoL. Além de apresentar atividade larvicida e retardar o desenvolvimento larval, a lectina também estimulou a oviposição de fêmeas do mosquito e reduziu a taxa de eclosão dos ovos. Estudos indicaram que a WSMoL consegue se ligar a proteínas das patas das fêmeas, o que pode acarretar no estímulo da oviposição (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014; AGRA-NETO et al., 2014; SILVA et al., 2019; SANTOS et al., 2020; SILVA et al., 2020). Outra lectina isolada da torta de *M. oleífera* foi a WSMoLC, ela exerceu efeitos deletérios tanto nas larvas (CL₅₀ 0,89 mg/mL) como nos ovos (CE₅₀ 0,14 mg/mL) de *A. aegypti* e ainda estimulou a oviposição (OLIVEIRA et al., 2016). Lectinas isoladas da entrecasca de *Myracrodruon urundeuva* (MuBL), cerne (MuHL), e das folhas (MuLL) também apresentaram atividade larvicida para o *A. aegypti*. MuLL também afetou a atividade de enzimas digestivas

(protease, tripsina e α -amilase), enquanto que a MuHL e MuBL apresentaram atividade ovicida (SÁ et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2012; ALVES et al., 2020).

PgTeL (do inglês *Punica granatum testa lectin*) é uma lectina isolada da sarcotesta da romã, através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de quitina. Ela é uma proteína termoestável que possui uma massa molecular de 26 kDa e apresentou homologia com uma quitinase isolada das sementes de *P. granatum*. Já existem estudos que demonstram atividades biológicas dessa lectina contra bactérias e fungos. PgTeL apresentou efeitos bacteriostático e bactericida contra *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus mutans* e *Listeria monocytogenes* e apenas inibição do crescimento sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus saprophyticus*. Além disso, ela inibiu a adesão e invasão de *Aeromonas* sp., *S. aureus*, *S. marcescens*, *S. enterica* e *L. monocytogenes* a células HeLa. Outro efeito causado pela lectina foi a inibição na formação de biofilme de duas cepas de *S. aureus*, uma não resistente (8325-4) e outra resistente a meticilina (LAC USA300) e também contra *E. coli* e *L. monocytogenes*. A lectina também apresentou atividade antifúngica para duas espécies de *Candida*, a *Candida albicans* e *Candida krusei*, chegando a danificar a integridade da parede celular (SILVA et al., 2016, 2018; 2019a; 2019b; 2020).

3 RESULTADOS

Os resultados dessa pesquisa são apresentados na forma de artigo.

Atividade larvicida de extrato salino e lectina (PgTeL) da sarcotesta das sementes de *Punica granatum* contra *Aedes aegypti*

Juliane Nancy de Oliveira Silva^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Jessica da Silva Nascimento^b, Janaína Carla Barbosa Machado^c, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^c, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Luiz Alberto Lira Soares^c, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira^a, Thiago Henrique Napoleão^a

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b*Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^c*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

Resumo

O *Aedes aegypti* é o mosquito responsável por transmitir as arboviroses Zika, Dengue, Chikungunya e febre amarela. O controle populacional desse vetor é essencial para que haja a diminuição na incidência dessas doenças. *Punica granatum* possui utilidades na medicina popular e já é sabido que o fruto (romã) possui diversas atividades biológicas, dentre elas a toxicidade em insetos. Lectinas são proteínas amplamente encontradas nas plantas e algumas delas são relatadas como agentes inseticidas. A sarcotesta de *P. granatum* contém uma lectina denominada PgTeL. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do extrato salino, da fração proteica da sarcotesta e de PgTeL de induzirem a morte de larvas L₄ de *A. aegypti*. Metabólitos secundários presentes no extrato foram avaliados por Cromatografia em Camada delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE). PgTeL foi isolada de acordo com protocolo já estabelecido. O ensaio

larvicida foi executado utilizando o extrato ou a fração ou a lectina para determinar a concentração letal necessária para matar 50% das larvas (CL_{50}). Além disso, também foi observado o efeito do extrato sobre a atividade de enzimas digestivas (tripsina e α -amilase) das larvas. Análise por CCD revelou a presença de taninos hidrolisáveis, terpenos e esteroides, derivados cinâmicos e açúcares redutores. Análise por CLAE identificou a presença de ácido elágico (teor de 0,21 g%), punicalagina α (0,22 g%), punicalagina β (0,23 g%), derivado de ácido elágico (0,22 g%) e derivado cinâmico (0,39 g%). O extrato salino apresentou uma CL_{50} de 3,9% enquanto que a fração proteica e a PgTeL não apresentaram atividade larvicida. O extrato se mostrou capaz de interferir na atividade das enzimas digestivas amilase (estimulação ou inibição) e tripsina (inibição). Em conclusão, o extrato salino da *P. granatum* possui atividade larvicida contra *A. aegypti*, causando alterações na ação de enzimas digestivas, e a lectina PgTeL não é o princípio ativo contra as larvas.

Palavras Chaves: *Punica granatum*, sarcotesta, *Aedes aegypti*, inseticida natural, lectinas.

1 Introdução

Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) é um mosquit originário da África, porém amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais. Sua distribuição pelo mundo se deu provavelmente pelos transportes de navio e nas regiões portuárias (JANSEN; BEEBE, 2010). Esse mosquito se tornou de grande importância para saúde pública, por ser vetor das arboviroses febre amarela, dengue, Zika e Chikungunya (MARTINEZ et al., 2019). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (2020), no primeiro semestre de 2020 houve nas Américas mais de 1,6 milhões de casos reportados de Dengue, Zika e Chikungunya. A Dengue representou 97,3% desses casos. A Chikungunya foi reportada em 11 países das Américas, tendo 37.279 casos, sendo a maioria no Brasil (95%). A Zika obteve um total de 7.452 casos, incluindo uma morte no Brasil. Já a febre amarela no período sazonal 2018-2019 apresentou no Brasil 50 casos confirmados e 12 mortes (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019; 2020).

Os vírus causadores da zika, dengue e chikungunya são transmitidos pela picada de fêmeas do *A. aegypti* portadoras desses vírus principalmente durante o dia (WHITEMAN et al., 2020). Em relação ao sítio de oviposição, as fêmeas apresentam uma preferência por recipientes

artificiais, o que explica a facilidade com que o *A. aegypti* habita casas e edifícios, aumentando o número de picadas em humanos por região, quanto o de pessoas infectadas pelas arboviroses. Além desses fatores existem ainda outros que podem aumentar a transmissão, como o aumento populacional e a urbanização sem o saneamento básico (WEAVER, 2018). Das doenças transmitidas pelo *A. aegypti*, apenas a febre amarela e a Dengue possuem vacina, porém a vacina da dengue (Dengvaxia) não entrou no programa de imunização Nacional devido às muitas restrições que ela possui, como o aumento do risco de causar dengue grave em pessoas que nunca tiveram contato com o vírus. Portanto, a principal forma de conter essas arboviroses é o controle de populações do vetor em áreas endêmicas, através da destruição dos criadouros e do uso de inseticidas (IBOI; GUMEL, 2018; PLIEGO-PLIEGO et al., 2020).

Os inseticidas sintéticos vêm sendo utilizados há muitos anos como uma forma de controle químico dos mosquitos, porém o uso contínuo de alguns poucos tipos de inseticida tem aumentado o número de populações resistentes a esses compostos, além de causar impacto ambiental devido a sua toxicidade (VALLE; BELINATO; MARTINS, 2015). O *A. aegypti* apresentou resistência à permetrina das classes dos piretroides e bendiocarbe da classe dos carbamatos. Além desses já existem relatos da resistência dos mosquitos aos organofosforados, temefós e malation (HAMID e al., 2018; BHARATI; SAHA, 2018). Outros métodos de controle vêm sendo investigados, como por exemplo, o biológico, porém com algumas restrições; por exemplo, o Bti (*Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*) pode perder a sua atividade com o calor intenso e alta incidência de luz. Com isso, ter uma variedade de inseticidas naturais (extratos, óleos e compostos vegetais) ambientalmente seguros, com mecanismos de ação diversificados se tornou uma importante estratégia para diminuir a formação dessa resistência e diminuir os efeitos negativos ao meio ambiente causados pelos inseticidas sintéticos (SMITH; KASAI; SCOTT, 2016; MOLTINI-CONCLOIS et al., 2018; MOSSA; MOHAFRASH; CHANDRASEKARAN, 2018).

Lectinas são um grupo de proteínas que podem se ligar reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados. São encontradas em todos os seres vivos e nas plantas são detectadas em diversos tecidos, tais como raiz, caule, folha, frutos e sementes. Elas possuem diversas atividades biológicas, dentre elas a inseticida (PROCÓPIO et al., 2017; HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018; HOSSELET et al., 2020; SANTOS, 2020). A lectina WSMoL, isolada das sementes de *Moringa oleifera*, apresentou atividades larvicida, ovicida e estimulou a oviposição de *A. aegypti*

(COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014; AGRA-NETO et al., 2014; SILVA et al., 2019; SANTOS et al., 2020) Lectinas isoladas da entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folhas (MuLL) de *Myracrodruon urundeuva* mostraram ação contra larvas de *A. aegypti*, afetando a atividades de enzimas digestivas (protease, tripsina e α -amilase) e diminuindo na viabilidade dos ovos (SÁ et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2012; ALVES et al., 2020).

Punica granatum (Lythraceae) é uma planta bastante utilizada na medicina popular devido a sua grande quantidade de compostos bioativos, tais como, proteínas e polifenóis (KHWAIRAKPAM et al., 2018). Existem estudos descrevendo atividades biológicas de diferentes tecidos da *P. granatum*, tais como antiviral (ANGAMUTHU et al., 2019), antioxidante, antidiabética (MAYASANKARAVALLI et al., 2020), anticâncer (AHMED et al., 2017), antimicrobiana (GULUBE; PATEL, 2016), anti-inflamatória (HOUSTON et al., 2017) e inseticida (MISHRA et al., 2017). O extrato etanólico da casca do seu fruto (romã) apresentou mortalidade contra larvas (último estágio larval) e adultos de *Rhynchophorus ferrugineus* (gorgulho vermelho), obtendo uma LC_{50} de 37,4 mg/mL. Extrato aquoso, etanólico e metanólico da casca da romã também apresentaram atividade contra larvas (terceiro estágio larval) e adultos do besouro vermelho da farinha, *Tribolium castaneum* (HAMOUDA et al., 2014; EL NAMAKY et al., 2021).

O suco da romã possui uma gama de metabólitos, o que favorece sua utilização para benefício da saúde. Dentre eles estão os taninos hidrolisáveis, antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoides (HEGAZI et al., 2021) e uma lectina, a PgTeL (SILVA et al., 2016). PgTeL (*Punica granatum* sarcotesta lectin) é uma lectina ligadora de quitina de massa molecular de 26 kDa e cuja sequência apresenta similaridades (37%) com uma quitinase isolada das sementes de *P. granatum*. PgTeL apresentou atividade biológica contra fungos do gênero *Candida* e bactérias patogênicas ao homem, incluindo isolados resistentes a antibióticos de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SILVA et al., 2016, 2018, 2019a, 2019b, 2021).

Esse trabalho analisou a composição fitoquímica do extrato salino de *P. granatum*, além disso, avaliou a atividade larvicida do extrato, da fração proteica e de PgTeL da sarcotesta de *P. granatum* contra larvas L_4 de *A. aegypti*, bem como o efeito do extrato nas atividades das enzimas digestivas (tripsina e α -amilase) das larvas.

2 Materiais e métodos

2.1 Material vegetal e insetos

Frutos de *Punica granatum* foram coletados na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil, com a autorização (nº 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Colônia de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) mantida no Laboratório de Ecologia Química, do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, foi utilizada. Os insetos são mantidos a uma temperatura de $27 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro). Para a realização dos ensaios, foram utilizadas larvas no início (cabeça branca) do quarto estágio (L4)

2.2 Preparação do extrato de *P. granatum* e isolamento da PgTeL

As sementes de romã foram peneiradas (mesh: 1 mm) para separação da sarcotesta (membrana gelatinosa), formando assim um suco. Logo após, foi adicionado NaCl 0,15 M em uma proporção 9:1 (suco/NaCl) e a mistura foi submetida à homogeneização utilizando um agitador magnético por 6 h. Em seguida foi filtrada com gaze e centrifugada (3000 g, 15 min), o sobrenadante resultou no extrato.

PgTeL foi purificada a partir do extrato seguindo o procedimento estabelecido por Silva et al. (2016), que inclui fracionamento com sulfato de amônio (saturação de 30%) e cromatografia em coluna de quitina. PgTeL foi avaliada quanto a concentração de proteínas e atividade hemaglutinante.

2.3. Concentração de proteínas e atividade hemaglutinante

A determinação da concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando curva padrão de albumina bovina sérica (31,25–500 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA). A atividade hemaglutinante foi realizada utilizando placas de microtitulação (Kartell S.P.A., Italy). As amostras (50 µl) foram diluídas serialmente em NaCl 0,15M antes da incubação com uma suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho fixados com glutaraldeído. A atividade hemaglutinante correspondeu ao inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de promover a

aglutinação total dos eritrócitos. A atividade hemaglutinante específica foi definida como a razão entre atividade hemaglutinante sobre a concentração de proteínas (mg/mL).

2.4 Análise fitoquímica

As classes de metabólitos secundários presentes no extrato foram determinadas através da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílicas (60F254, revestida com alumínio, 200 µm de espessura, 8,0 x 5,0 cm, Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram utilizados os sistemas de desenvolvimento e reveladores na seguinte ordem: EtOAc/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26 v/v) junto com o reagente de Dragendoff para alcaloides, EtOAc/HCOOH/AcOH/H₂O (100:0,5:0,5:0,5 v/v) junto com o reagente Lieberman-Burchard para triterpenos e esteroides,; EtOAc/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:27 v/v) junto com o reagente Neu para e flavonoides agliconas e heterosídeos e também para derivados de ácido cinâmico; EtOAc/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26 v/v) junto com vanilina – ácido clorídrico para proantocianidinas (HARBORNE, 1998).

Em seguida, o extrato foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) equipado a uma bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degaseificador e amostrador automático com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). Foi utilizado um comprimento de onda fixo em 270 nm e uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex equipada com pré-coluna (C18 de 4mm x 3,9 m; Phenomenex). As separações cromatográficas foram realizadas, com uma temperatura de 26 ± 1°C. A fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e metanol (B) acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05% e fluxo ajustado para 0,7 mL/min. Foi aplicado o seguinte programa de gradiente: 0-10 min, 15-25% de B; 10-15 min, 25-40% de B; 15-20 min, 40-80% de B; 20-25 min, 80% de B; 25-30 min, 80-45% de B; 30-31 min, 40-15% de B; 31-33 min, 15% de B. A injeção foi realizada em triplicata, e os dados analisado com o Software Chromeleon 6.8 (Dionex/ Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.5 Ensaio larvicide contra *Aedes aegypti*

Os insetos foram obtidos a partir de uma colônia (cepa Rockefeller) mantidos no Laboratório de Ecologia Química da UFPE sob temperatura de $27 \pm 0,5$ °C, 75-80% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12. Os ovos do *A. aegypti* foram colocados em contato com água destilada contendo ração de gato (Whiskas) para que houvesse a eclosão das larvas. Quando as larvas chegaram ao quarto estágio larval (L4), elas foram coletadas para sua utilização nos ensaios. O ensaio larvicida foi feito através de uma adaptação do método da Organização Mundial de Saúde (1981) descrita por Navarro et al. (2013). O extrato salino (solução-mãe de 100%), fração proteica (solução-mãe de 10 mg/mL) e a PgTeL (solução-mãe de 1,74 mg/mL) foram diluídos em água destilada para obter soluções-teste nas faixas de concentração de 1,0–7,0 % (extrato), 1,0–5,0 mg/mL (fração proteica) e 0,1–1,0 mg/mL (PgTeL), em um volume final de cada ensaio de 20 mL. O controle negativo foi feito apenas com água destilada. Foram adicionadas a cada ensaio 20 larvas e a mortalidade foi determinada após 48 h de incubação. Cada ensaio foi realizado em triplicata e foram mantidos fotoperíodo de 12:12 (Claro/escuro) e temperatura de $27 \pm 0,5$ °C.

2.6 Preparação do extrato do intestino das larvas

Grupos contendo 50 larvas de *A. aegypti* foram imobilizados a uma temperatura de 4 °C por 10 min. Em seguida, os intestinos das larvas foram removidos utilizando agulha com 8 mm de comprimento e espessura de 0,3 mm (BD Ultra-fine II from Becton, Dickinson and Company, NJ, USA), com auxílio de estereomicroscópio. Os intestinos removidos foram homogeneizados junto com 1 mL de tampão acetato (acetato de sódio 0,1 M pH 5,5) ou Tris (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0). Após centrifugação (9000 g, 4 °C, 15 min) o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

2.7 Efeito do extrato salino de *P. granatum* sobre a atividade de enzimas digestivas das larvas

A atividade de tripsina foi determinada de acordo com o método de Kakade et al. (1969). O extrato do intestino das larvas (75 µL; 135 µg de proteína) em Tris foi incubado (30 min, 25 °C) junto com o extrato da romã (75 µL, 0,62–10,00%) ou com NaCl 0,15 M (controle 100% de atividade). Em seguida, foram adicionados o substrato *N*-benzoil- DL-arginil-p-nitroanilida a 8

mM (BApNA:15 µL) e o tampão Tris (35 µL). Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 405 nm. Controles na ausência de BApNA contendo somente o extrato das larvas ou o extrato de *P. granatum* foram realizados. Ainda, controle contendo BApNA e o extrato de *P. granatum* também realizado. Uma unidade de atividade de tripsina foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de BApNA por minuto.

A atividade de α -amilase foi determinada de acordo com o método de Bernfeld (1955). O extrato do intestino das larvas (50 µL; 90 µg de proteína) em acetato foi incubado com o extrato de *P. granatum* (50 µL; 0,31–10,00%) ou NaCl 0,15 M (controle 100% de atividade) por 30 min a 25 °C. Em seguida, cada ensaio recebeu com 400 µL de substrato (amido solúvel 0,1 M em tampão acetato) e foi incubado por 10 min a 50 °C. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e os testes foram aquecidos a 100 °C por 6 min e logo resfriados em gelo por 15 minutos. Foi realizada então a leitura da absorbância em 540 nm. Controles na ausência de amido contendo somente o extrato das larvas ou o extrato de *P. granatum* foram realizados. Ainda, controle contendo amido e o extrato de *P. granatum* também realizado. A quantidade de açúcares redutores foi determinada usando uma curva padrão de glicose ($Y = 1,7366X + 0,0228$; Y é a absorbância em 540 nm; X é a concentração de glicose em mg/mL). Uma unidade de atividade de amilase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de glicose por minuto.

2.8 Análises estatísticas

Os desvios-padrão (DP) foram calculados usando GraphPad Prism versão 8.0 para Windows e os dados foram expressos como a média das replicatas $\pm$ DP. Diferenças significativas entre os tratamentos foram analisados por test t de Student (significância de $p < 0.05$) usando programa SPSS[®] Statistics versão 18. As concentrações necessárias para matar 50% das larvas (CL₅₀) em 48 h foram calculadas por análise de probit com intervalo de confiança de 95% usando o programa SPSS[®] Statistics versão 18.

3 Resultados e discussão

Os relatos prévios da atividade inseticida da romã e de lectinas vegetais ligadoras de quitina estimularam a realização desse estudo. O extrato salino de *P. granatum* apresentou concentração de proteínas de 17,1 mg/mL e uma AH específica (AHE) de 0,93. Após o tratamento com sulfato de amônio (30%), a fração sobrenadante apresentou concentração proteica de 40,3 mg/mL e AHE de 12,7. A capacidade de aglutinar eritrócitos tanto no extrato quanto na fração revelam a presença de PgTeL ativa. O aumento da AH específica (Tabela 1) confirma que a fração obtida é uma preparação enriquecida em PgTeL. A lectina foi isolada em coluna de quitina, segundo o protocolo previamente estabelecido por Silva et al. (2016) com AHE de 5.689, confirmando a funcionalidade dos sítios de ligação a carboidratos da lectina na amostra obtida.

Tabela 1 – Purificação da lectina da sarcotesta de *P. granatum* (PgTeL)

Amostra	Proteína (mg/mL)	AH (UAH)	AHE (UAH/mg)
Extrato	17,1	16	0,93
Fração	40,3	512	12,7
Lectina	0,18	1024	5.689

O número da unidade de atividade hemaglutinante (UAH) é definido como o inverso da maior diluição que promoveu a aglutinação dos eritrócitos. Atividade hemaglutinante específica (AHE) corresponde a razão entre a AHE sobre a concentração proteica (mg).

De acordo com o resultado da análise fitoquímica do extrato através de cromatografia em camada delgada (CCD), quatro classes de compostos presentes na amostra testada: taninos hidrolisáveis, derivados cinâmicos, terpenos e esteroides, e açúcares redutores. Esses resultados corroboram com outros estudos em que essas classes de compostos também foram identificadas na romã (MENA et al., 2011a; 2014). Uma análise feita com cinco cultivares de *P. granatum* na Espanha, revelou que açúcares mais abundantes no suco foram a frutose e a glicose (MENA et al., 2011b).

A análise feita por CLAE identificou alguns dos compostos presentes no extrato salino (Figuras 2 e 3), sendo eles o ácido elágico, as punicalaginas α e β , derivados de ácido elágico e derivados cinâmicos. O teor de cada composto pode ser visto na Tabela 1. Estudo avaliando componentes presentes no suco da romã através de CLAE descreveu a presença de punicalaginas

(α e β) e ácido elágico (MENA et al., 2013), corroborando com os nossos resultados. Além do suco, punicalagina, ácido gálico e ácido elágico também já foram encontrados na casca do fruto de *P. granatum* (JAIN et al., 2011).

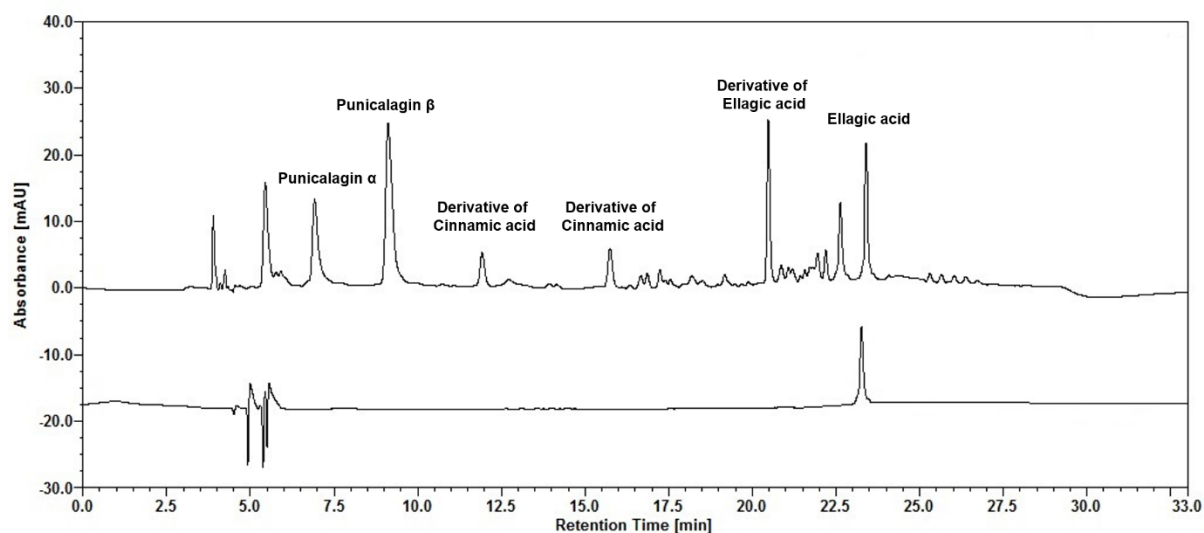


Figura 1 – Perfil do extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum* em cromatografia líquida de alta eficiência coluna C18 e comprimento de onda de 270 nm.

Tabela 2 – Teor de componentes encontrados no extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum*.

Ácido elágico	Punicalaginas α e β	Derivados do ácido elágico	Derivados cinâmicos
0,21 g% (0,10%)	0,22 g% (0,06%)	0,22 g% (0,04%)	0,39 g% (0,06%)
	0,23 g% (0,36%)		

Os resultados estão expressos como média (desvio padrão relativo).

Dentre os metabólitos secundários, a romã é bem reportada por possuir elevadas concentrações de compostos fenólicos. A punicalagina (anômeros α e β), um tanino hidrossolúvel, é um polifenol de alta massa molecular apresentando características de cor, adstringência e estabilidade oxidativa. Ela é considerada uma molécula multifuncional, possuindo atividades antioxidante, antimicrobiana e anticâncer (OUDANE et al., 2018; ZHANG et al., 2020; GOSSET-ERARD et al., 2021). O ácido elágico é um derivado dimérico do ácido gálico e é encontrado nas plantas, na sua forma livre e seus derivados, ou ligados como elagitânicos

solúveis em água. O ácido elágico da *P. granatum* apresentou atividades anti-inflamatória e anticâncer (LANDETE, 2011; BARADARAN RAHIMI et al., 2020). O ácido cinâmico é um ácido orgânico natural da planta e de acordo com sua estrutura ele pode ser apresentado na forma de diversos derivados; estudos relatam sua capacidade antioxidante e antimicrobiana (SOVA, 2012; PEPERIDOU et al., 2017).

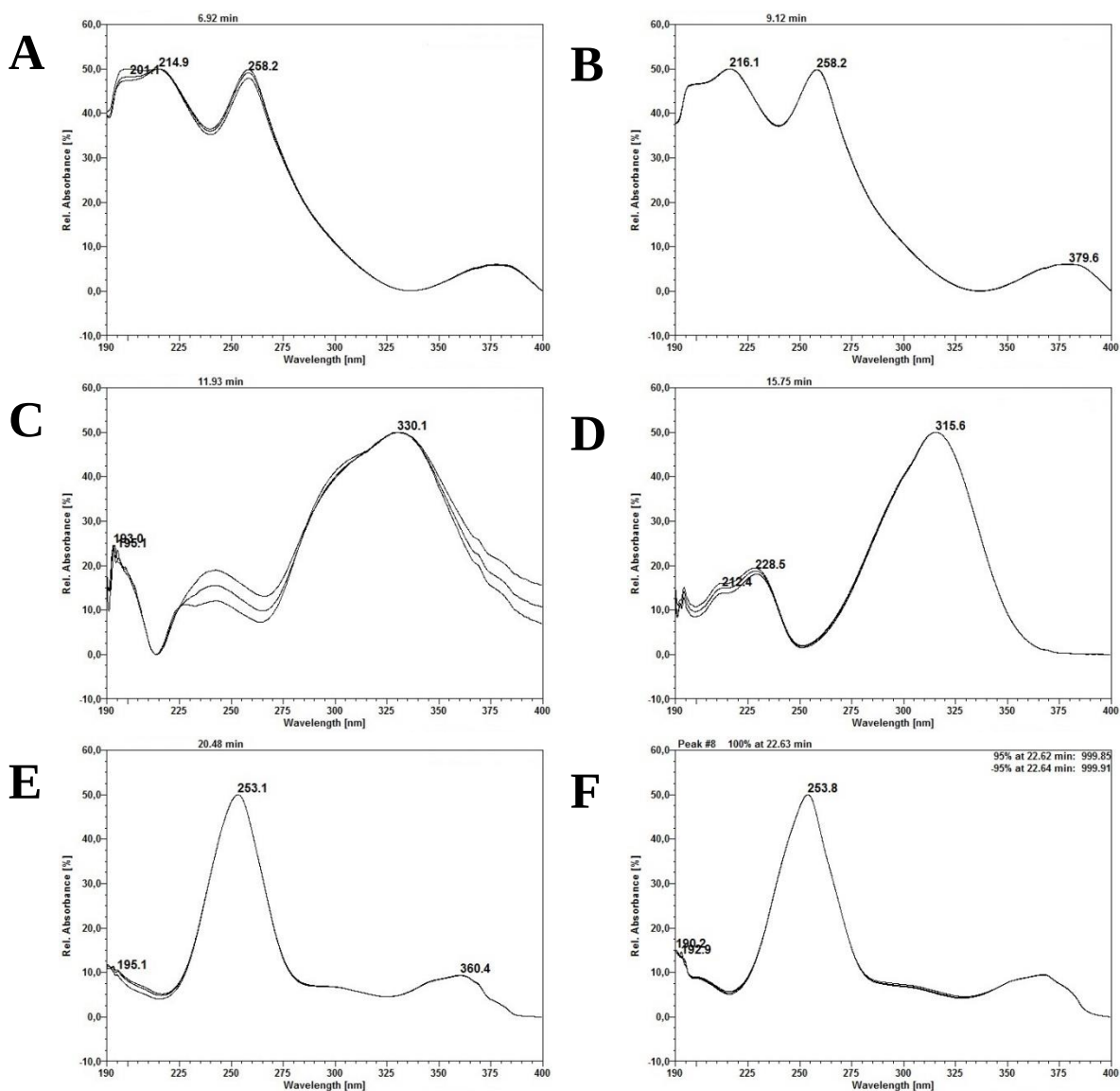


Figura 2 – Espectros de absorção na faixa de 190 a 400 nm dos picos encontradas no perfil do extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum* em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) coluna C18, correspondendo aos compostos: punicalagina α (A), punicalagina β (B), derivado cinâmico 1 (C), derivado cinâmico 2 (D), derivado do ácido elágico (E) e ácido elágico (F).

Extratos contendo compostos fenólicos já foram testados contra *A. aegypti*. O extrato de raízes de *Waltheria viscosissima* apresentou atividade larvídica e em sua composição foram encontrados esteroides, triterpenos, alcaloides e flavonoides (FERREIRA et al., 2019). Taninos foram identificados em frações isoladas da casca do caule *Magonia pubescens* que apresentaram grande potencial larvídica contra *A. aegypti* (SILVA et al., 2004). Do mesmo modo, o extrato etanólico do caule de *Euphorbia tirucalli* Linn foi eficaz contra larvas de *A. aegypti* e sua análise fitoquímica acusou a presença de taninos (YUSUF; EFENDI; DIANTASARI, 2020).

O resultado do ensaio larvídica demonstrou que o extrato salino foi capaz de induzir a morte de larvas do *A. aegypti*, apresentando uma CL_{50} de 3,9% (Figura 1). Por outro lado, a fração proteica não foi tóxica para as larvas. A lectina PgTeL também não apresentou atividade larvídica nas concentrações testadas, que chegou até 1,0 mg/mL, valor considerado bastante superior aos de CL_{50} determinadas para as lectinas MuBL, MuHL, MuLL e WSMoL, que foram 0,125, 0,040, 0,202 e 0,197 mg/mL, respectivamente (SÁ et al., 2009; COELHO et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2012). Esses resultados indicam que PgTeL, apesar de também ser uma lectina ligadora de quitina, não é o princípio larvídica presente no extrato salino da sarcostesta de *P. granatum*.

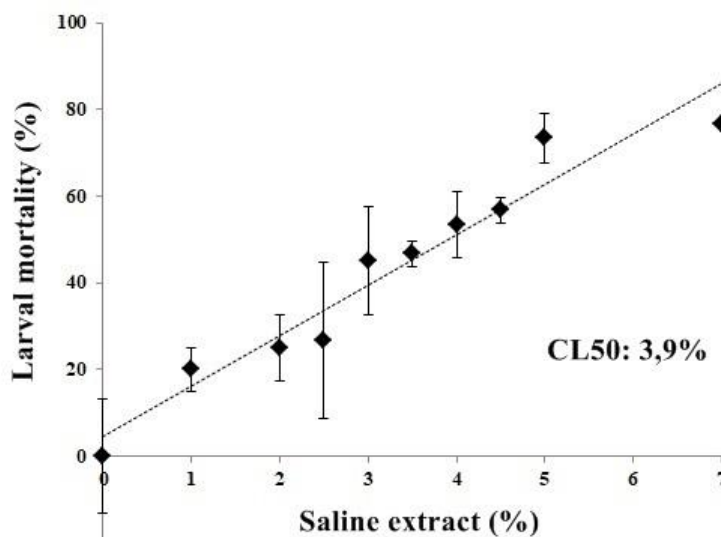


Figura 3- Mortalidade de L_4 de *A. aegypti* incubadas com extrato salino da sarcotesta de *P. granatum*. CL_{50} é a concentração necessária para matar 50% das larvas e foi determinada pela análise de probitos.

Muitos compostos podem influenciar no efeito das enzimas digestivas das larvas de insetos, causando alterações antinutricionais que podem acarretar na mortalidade (NAPOLEÃO et al., 2019; CHEN et al., 2021). Sendo assim, foi investigado o efeito do extrato salino da *P. granatum* sobre a ação das enzimas digestivas tripsina e α -amilase da L₄. O extrato salino inibiu a ação da enzima tripsina (Figura 4A) obtendo diferença significativa em relação ao controle em todas as concentrações testadas e, dependendo da concentração, teve efeito estimulatório ou inibitório sobre a enzima α -amilase (Figura 4B). Extratos que inibiram o efeito da tripsina em larvas L₄ de *Aedes albopictus*, foram os das folhas de *Curcuma longa*, *Plectranthus amboinicus* e extrato de sementes de *Artocarpus heterophyllus* (PRAKASH; KORMATH; MEETHAL, 2020).

Durante o seu estágio larval, a matéria orgânica presente na água derivada de detritos, bactérias, fungos e algas representa uma fonte nutricional importante para as larvas de *A. aegypti* (SOARES et al., 2011). Proteases (como tripsina) e glicosidases (como a amilase) apresentam papel importante na digestão de proteínas e carboidratos para larvas de *A. aegypti*. A inibição das mesmas pode prejudicar o processo de digestão e comprometer o seu desenvolvimento, podendo levar a morte do inseto (CAMAROTI et al., 2017). Polifenóis extraídos de plantas já são reportados na literatura por alterarem a atividade de enzimas digestivas de espécies animais (BARRETT et al., 2018).

4 Conclusão

Esse estudo revelou que o extrato salino da sarcotesta de *P. granatum* contendo punicalaginas, ácido elágico, derivados cinâmicos e lectina possui atividade larvívica contra *A. aegypti*. Porém, a lectina PgTeL não é o princípio responsável por essa atividade. O mecanismo de ação do extrato pode envolver a modulação da atividade de enzimas digestivas (tripsina e α -amilase). Os resultados estimulam novos estudos visando a disponibilização do extrato da sarcotesta da romã ou de seus componentes bioativos como ferramentas para uso no controle do *A. aegypti*.

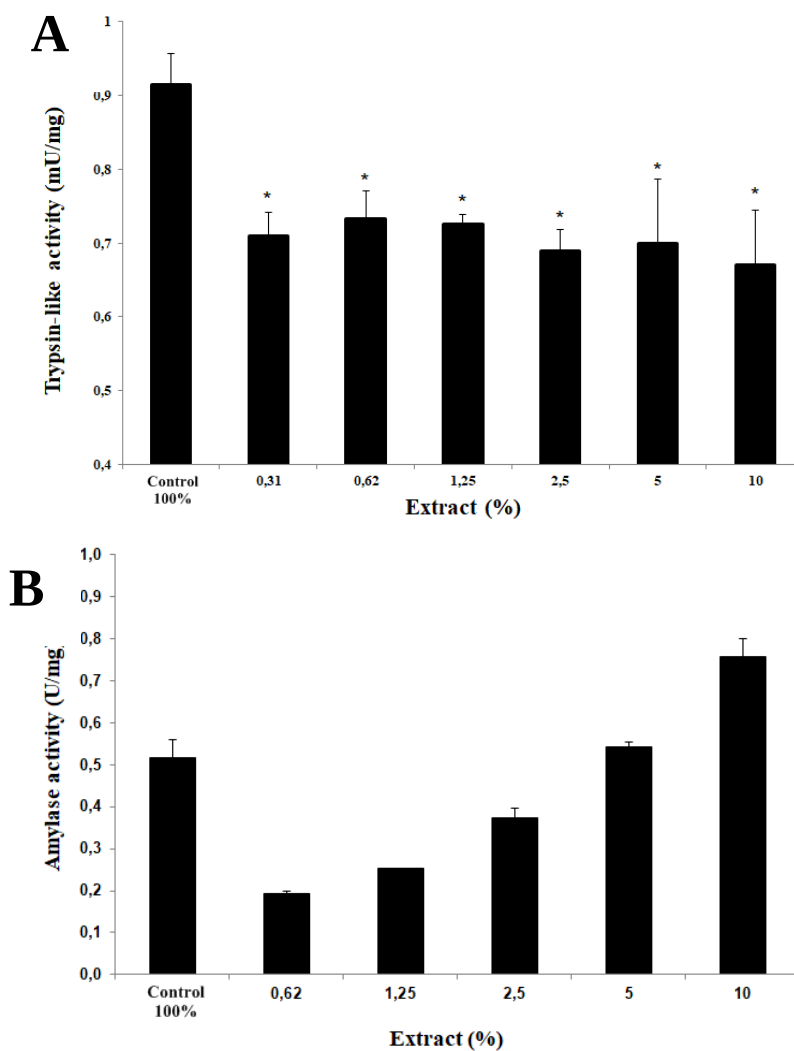


Figura 4 – Efeitos do extrato salino da sarcotesta de *P. granatum* nas atividades de tripsina (A) e amilase (B) de extratos de intestinos de *L*₄ de *A. aegypti*. (*) indica diferença significativa em relação ao controle 100% de atividade.

Referências

- AGRA-NETO, Afonso Cordeiro et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 175-184, 2014.
- AHMED, Hanaa H. et al. *Punica granatum* suppresses colon cancer through downregulation of Wnt/ β -Catenin in rat model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 627-635, 2017.

- ALVES, Robson RV et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.
- ANGAMUTHU, Divyadarshini et al. Antiviral study on *Punica granatum* L., *Momordica charantia* L., *Andrographis paniculata* Nees, and *Melia azedarach* L., to human herpes virus-3. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 28, p. 98-108, 2019.
- BARADARAN RAHIMI, Vafa et al. Antiinflammatory and anti-cancer activities of pomegranate and its constituent, ellagic acid: Evidence from cellular, animal, and clinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 4, p. 685-720, 2020.
- BARRETT et al. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins - A review of efficacy and mechanisms. *Food Science and Technology*, v. 87, p. 394 – 399, 2018.
- BHARATI, Minu; SAHA, Dhiraj. Multiple insecticide resistance mechanisms in primary dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn.) from dengue endemic districts of sub-Himalayan West Bengal, India. **PloS one**, v. 13, n. 9, p. e0203207, 2018.
- BERNFELD, P. α -amylase. **Methods Enzymol**, v. 1, p. 149-151, 1955.
- CAMAROTI, J.R.S.L. et al. Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: GREEN, V. (Org.). *Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights*. 1ed.ew York: Nova Science Publishers, pp. 147-188, 2017.
- CHEN, Yun-ze et al. Detoxification, antioxidant, and digestive enzyme activities and gene expression analysis of *Lymantria dispar* larvae under carvacrol. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 24, n. 1, p. 208-216, 2021.
- COELHO, Juliene S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.
- EL NAMAKY, A. H. et al. Insecticidal activity of *Punica granatum* L. extract for the control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)(Coleoptera: Curculionidae) and some of its histological and immunological aspects. **Journal of Biopesticides**, v. 13, n. 1, p. 13-20, 2020.
- FERREIRA, Maria Denise Leite et al. Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 5, p. 582-590, 2019.
- GOSSET-ERARD, Clarisse et al. Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. **Food Chemistry**, p. 129396, 2021.

- GULUBE, Zandiswa; PATEL, Mrudula. Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 45-49, 2016.
- HAMID, Penny Humaidah et al. Current status of Aedes aegypti insecticide resistance development from Banjarmasin, Kalimantan, Indonesia. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.
- HAMOUDA, Amel Ben et al. Insecticidal Activities of Fruit Peel Extracts of Pomegranate (Punica granatum) against the red flour beetle Tribolium castaneum. Tunis. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 9, n. 1, p. 91-100, 2014.
- HARBORNE, A. J. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. springer science & business media, 1998.
- HEGAZI, Nesrine M. et al. Pomegranate juice as a super-food: A comprehensive review of its extraction, analysis, and quality assessment approaches. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 97, p. 103773, 2021.
- HENDRICKSON, O. D.; ZHERDEV, A. V. Analytical application of lectins. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 48, n. 4, p. 279-292, 2018.
- HOSSELET, Monique et al. Purification and characterization of an endogenous root lectin from Pisum sativum L. In: **Proceedings of the Fifth Lectin Meeting Bern, May 31–June 5, 1982**. de Gruyter, 2020. p. 549-558.
- HOUSTON, David MJ et al. Anti-inflammatory activity of Punica granatum L.(Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 112, p. 30-37, 2017.
- IBOI, Enahoro A.; GUMEL, Abba B. Mathematical assessment of the role of Dengvaxia vaccine on the transmission dynamics of dengue serotypes. **Mathematical biosciences**, v. 304, p. 25-47, 2018.
- JAIN, Vishal et al. Isolation and standardization of various phytochemical constituents from methanolic extracts of fruit rinds of Punica granatum. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, n. 6, p. 414-420, 2011.
- JANSEN, Cassie C.; BEEBE, Nigel W. The dengue vector Aedes aegypti: what comes next. **Microbes and infection**, v. 12, n. 4, p. 272-279, 2010.
- KAKADE, M. L.; SIMONS, Nancy; LIENER, I. E. Evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal chemistry**, 1969.
- KHWAIRAKPAM, Amrita Devi et al. Possible use of Punica granatum (Pomegranate) in cancer therapy. **Pharmacological research**, v. 133, p. 53-64, 2018.

- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. **Food research international**, v. 44, n. 5, p. 1150-1160, 2011.
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- MARTINEZ, Jose Dario; CARDENAS-DE LA GARZA, Jesus Alberto; CUELLAR-BARBOZA, Adrian. Going viral 2019: Zika, chikungunya, and dengue. **Dermatologic clinics**, v. 37, n. 1, p. 95-105, 2019.
- MAYASANKARAVALLI, C. et al. Profiling the phyto-constituents of Punica granatum fruits peel extract and accessing its in-vitro antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 3228-3234, 2020.
- MENA, Pedro et al. Pomegranate fruit for health promotion: Myths and realities. **Funct Plant Sci Biotechnol**, v. 5, p. 33-42, 2011a.
- MENA, Pedro et al. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 10, p. 1893-1906, 2011b.
- MENA, Pedro et al. Combinatory effect of thermal treatment and blending on the quality of pomegranate juices. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3186-3199, 2013.
- MENA, Pedro; MARTÍ, Nuria; GARCÍA-VIGUERA, Cristina. The impact of processing and storage on the (poly) phenolic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. In: **Processing and Impact on Antioxidants in Beverages**. Academic Press, 2014. p. 173-184.
- MISHRA, Tripti et al. Termiticidal Activity of Punica granatum fruit rind fractions and its compounds against *Microcerotermes beesonii*. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 320-325, 2017.
- MOLTINI-CONCLOIS, Isabelle et al. Larval exposure to the bacterial insecticide Bti enhances dengue virus susceptibility of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insects**, v. 9, n. 4, p. 193, 2018.
- MOSSA, Abdel-Tawab H.; MOHAFRASH, Samia MM; CHANDRASEKARAN, Natarajan. Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.
- NAPOLÊÃO, Thiago Henrique et al. Effect of Myracrodruon urundeuva leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.

- NAPOLÉÃO, Thiago H. et al. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest management science**, v. 75, n. 5, p. 1212-1222, 2019.
- NAVARRO, D. M. A. F. et al. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L.(Dipt., Culicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 127, n. 1, p. 46-50, 2003.
- LOUDANE, Boualem et al. Isolation, characterization, antioxidant activity, and protein-precipitating capacity of the hydrolyzable tannin punicalagin from pomegranate yellow peel (*Punica granatum*). **Journal of Molecular Structure**, v. 1156, p. 390-396, 2018.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/ World Health Organization. Epidemiological Update: Yellow Fever. 6 March 2019, Washington, D. C. PAHO/WHO. 2019.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/ World Health Organization. Epidemiological Update: Arbovirus. 10 June 2020, Washington, D. C. PAHO/WHO. 2020.
- PEPERIDOU, Aikaterini et al. Multifunctional cinnamic acid derivatives. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1247, 2017.
- PLIEGO-PLIEGO, Emilene et al. Control strategies for a population dynamics model of *Aedes aegypti* with seasonal variability and their effects on dengue incidence. **Applied Mathematical Modelling**, v. 81, p. 296-319, 2020.
- PRAKASH, Anju Sara; KORMATH, Ashitha; MEETHAL, Kannan Vadakkadath. Identification of plant extracts inhibiting trypsin-like larval gut proteases of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae. 2020.
- PROCÓPIO, Thamara Figueiredo et al. CasuL: a new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.
- SÁ, Roberto Araújo et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009.
- SANTOS, Nataly Diniz de Lima et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44840, 2012.
- SANTOS, Nataly Diniz de Lima et al. Evaluation of *Moringa oleifera* seed lectin in traps for the capture of *Aedes aegypti* eggs and adults under semi-field conditions. **Parasitology research**, v. 113, n. 5, p. 1837-1842, 2014.
- SANTOS, N. D. L. et al. Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 3-8, 2020.

- SANTOS, Valdenice F. et al. Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 841-852, 2020.
- SILVA, Heloísa Helena Garcia da et al. Atividade larvicida de taninos isolados de Magonia pubescens St. Hil.(Sapindaceae) sobre Aedes aegypti (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.
- SILVA, Livia Lais de Santana et al. Exposure of mosquito (Aedes aegypti) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of Moringa oleifera seeds impairs their development and future fecundity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 183, p. 109583, 2019.
- SILVA, Pollyanna M. et al. The juicy sarcotesta of Punica granatum contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of functional foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.
- SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.
- SILVA, Pollyanna Michelle et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of Staphylococcus aureus clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019a.
- SILVA, Pollyanna Michelle et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing Escherichia coli. **International journal of biological macromolecules**, v. 135, p. 931-939, 2019b.
- SILVA, Pollyanna Michelle et al. Antibacterial effects of the lectin from pomegranate sarcotesta (PgTeL) against Listeria monocytogenes. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.
- SMITH, Leticia B.; KASAI, Shinji; SCOTT, Jeffrey G. Pyrethroid resistance in Aedes aegypti and Aedes albopictus: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 133, p. 1-12, 2016.
- SOARES, T. S. et al. Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from Aedes aegypti larvae and identification of digestive enzymes. **Gene**, v. 489, p. 70 – 75, 2011.
- SOVA, Matej. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749-767, 2012.
- VALLE, Denise; BELINATO, Thiago Affonso; MARTINS, A. de J. Controle químico de Aedes aegypti, resistência a inseticidas e alternativas. **Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Fiocruz**, p. 93-126, 2015.

- WEAVER, Scott C. Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. **Antiviral research**, v. 156, p. 80-84, 2018.
- WHITEMAN, Ari et al. Do socioeconomic factors drive Aedes mosquito vectors and their arboviral diseases? A systematic review of dengue, chikungunya, yellow fever, and Zika Virus. **One Health**, p. 100188, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. World Health Organization, 1981.
- YUSUF, Yusnidar; EFENDI, Kriana; DIANTASARI, Seta. Larvicidal Activity Test of Ethanolic Extract of (*Euphorbia tirucalli* Linn) Stem on *Aedes aegypti* Larvae. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 11, n. 3, 2020.
- ZHANG, Li et al. Punicalagin promotes the apoptosis in human cervical cancer (ME-180) cells through mitochondrial pathway and by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, n. 4, p. 1100-1106, 2020.

4 CONCLUSÕES

- De acordo com a análise fitoquímica o extrato contém taninos hidrolisáveis, terpenos e esteroides, derivados cinâmicos e açúcares redutores. Foram identificados os compostos punicalagina α e β e ácido elágico.
- O extrato salino de *Punica granatum* apresentou atividade larvicida contra *Aedes aegypti* com uma CL₅₀ de 3,9%.
- O extrato também contém a lectina PgTeL, porém essa proteína não mostrou ser o princípio ativo do extrato contra as larvas. Além disso, a fração proteica também não apresentou atividade larvicida.
- O extrato teve efeito modulatório sobre as enzimas digestivas tripsina e amilase das larvas.

REFERÊNCIAS

- ADARAMOYE, Oluwatosin et al. Punicalagin, a polyphenol from pomegranate fruit, induces growth inhibition and apoptosis in human PC-3 and LNCaP cells. **Chemico-biological interactions**, v. 274, p. 100-106, 2017.
- AGRA-NETO, Afonso Cordeiro et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 175-184, 2014.
- AGUILAR-BRISEÑO, José A.; MOSER, Jill; RODENHUIS-ZYBERT, Izabela A. Understanding immunopathology of severe dengue: lessons learnt from sepsis. **Current Opinion in Virology**, v. 43, p. 41-49, 2020.
- AHAD, Shazia et al. Anticoccidial activity of fruit peel of *Punica granatum* L. **Microbial pathogenesis**, v. 116, p. 78-83, 2018.
- ALBUQUERQUE, Lidiane Pereira et al. Antinutritional effects of the chitin-binding lectin from *Microgramma vacciniifolia* rhizome (MvRL) on *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 88, p. 101652, 2020.
- ALFEI, Silvana et al. Ellagic acid a multi-target bioactive compound for drug discovery in CNS? A narrative review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 111724, 2019.
- ALVES, Robson RV et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.
- AMARASINGHE, L. D. et al. Comparative study on larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles and *Annona glabra* (Annonaceae) aqueous extract to control *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04322, 2020.
- AMBARWATI, Dewi et al. *Punica granatum* fruit extract inhibits the production of pro-inflammatory cytokines and angiogenic factors of HUVEC cells induced by plasma from patients with pre-eclampsia. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 15, p. 9-14, 2017.
- ANLAR, Hatice Gül. Cinnamic acid as a dietary antioxidant in diabetes treatment. In: **Diabetes**. Academic Press, 2020. p. 235-243.
- ARAÚJO, Marianna O. et al. Larvicidal Activity of Cinnamic Acid Derivatives: Investigating Alternative Products for *Aedes aegypti* L. Control. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 61, 2021.
- ARUNKUMAR, Jagadeesan; RAJARAJAN, Swaminathan. Study on antiviral activities, drug-likeness and molecular docking of bioactive compounds of *Punica granatum* L. to Herpes simplex virus-2 (HSV-2). **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 301-309, 2018.

- BARBIERI, Mirko; HEARD, Charles M. Isolation of punicalagin from Punica granatum rind extract using mass-directed semi-preparative ESI-AP single quadrupole LC-MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 166, p. 90-94, 2019.
- BARRERA, Roberto. Considerations for disrupting dengue virus transmission; ecology of Aedes aegypti and current (nongenetic) methods of control. In: Genetic control of malaria and dengue. **Academic Press**, 2016. p. 103-124.
- BARRETT, Alan DT. The reemergence of yellow fever. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 847-848, 2018.
- BENSLIMANE, Sabria et al. Pomegranate Peel Extract Activities as Antioxidant and Antibiofilm against Bacteria Isolated from Caries and Supragingival Plaque. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 3, 2020.
- BHUTIA, Sujit K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological research**, v. 144, p. 8-18, 2019.
- BUTTON, Julie M. et al. Revisiting an old friend: new findings in alphavirus structure and assembly. **Current Opinion in Virology**, v. 45, p. 25-33, 2020.
- BUXTON, Thomas et al. Insecticidal activities of cinnamic acid esters isolated from Ocimum gratissimum L. and Vitellaria paradoxa Gaertn leaves against Tribolium castaneum Hebst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Pest management science**, v. 76, n. 1, p. 257-267, 2020.
- CAMAROTI, João Ricardo Sá Leitão et al. Sitophilus zeamais adults have survival and nutrition affected by Schinus terebinthifolius leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial crops and products**, v. 116, p. 81-89, 2018.
- COELHO, Juliene S. et al. Effect of Moringa oleifera lectin on development and mortality of Aedes aegypti larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.
- COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.
- DERAKHSHAN, Zahra et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. **Food and chemical toxicology**, v. 114, p. 108-111, 2018.
- DIAS, Luciana dos Santos et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant Aedes aegypti populations in Brazil. **Plos one**, v. 12, n. 3, p. e0173689, 2017.
- DUGUMA, Dagne; RUEDA, Leopoldo M.; DEBBOUN, Mustapha. Mosquito-Borne Diseases. In: Mosquitoes, Communities, and Public Health in Texas. **Academic Press**, 2020. p. 319-337.

- EL NAMAKY, A. H. et al. Insecticidal activity of Punica granatum L. extract for the control of Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)(Coleoptera: Curculionidae) and some of its histological and immunological aspects. **Journal of Biopesticides**, v. 13, n. 1, p. 13-20, 2020.
- ELBATANONY, Marwa M. et al. Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of Punica granatum L. leaves. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 89-94, 2019.
- FERNANDES, Kenner Morais et al. Aedes aegypti larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. **Chemosphere**, v. 221, p. 464-470, 2019.
- FERRAZZANO, Gianmaria Fabrizio et al. In vitro antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.
- FERREIRA, Vanessa Machado et al. Um mosquito e três doenças: ação de combate ao Aedes aegypti e conscientização sobre Dengue, Chikungunya e Zika em Divinópolis/MG, BRASIL. **Revista Brasileira de Extensão Universitária**, v. 10, n. 2, p. 49-54, 2019.
- FRANCIS, Sheena et al. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in Aedes aegypti mosquitoes from St. Andrew Jamaica. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0179673, 2017.
- GOSSET-ERARD, Clarisse et al. Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) peels. **Food Chemistry**, p. 129396, 2021.
- GUARNER, Jeannette; HALE, Gillian L. Four human diseases with significant public health impact caused by mosquito-borne flaviviruses: West Nile, Zika, dengue and yellow fever. In: **Seminars in Diagnostic Pathology**. WB Saunders, 2019. p. 170-176.
- GUEDES, Raul Narciso C. et al. Patterns of insecticide resistance in Aedes aegypti: meta-analyses of surveys in Latin America and the Caribbean. **Pest management science**, v. 76, n. 6, p. 2144-2157, 2020.
- GUO, Qunqun et al. A nematicidal tannin from Punica granatum L. rind and its physiological effect on pine wood nematode (Bursaphelenchus xylophilus). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 135, p. 64-68, 2017.
- GUPTA, Garima; DHARMA, Kriti; KUMAR, Neelima R. Insecticidal effects of aqueous extracts of wild pomegranate peel and seed (Punica granatum L.) against rose aphids, Macrosiphum rosaeformis. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 9, n. 3, p. 1397-1405, 2017.
- HERTLEIN, Mark B. et al. Spinosad: a new natural product for stored grain protection. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 131-146, 2011.
- JEBANESAN, Arulsamy et al. Impact of Punica granatum-based green larvicide on the predation rate of Polypedates cruciger for the control of mosquito vectors, Anopheles stephensi and

- Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, p. 1-11, 2020.
- KHADIVI, Ali et al. Morphological variability of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions from natural habitats in the Northern parts of Iran. **Scientia Horticulturae**, v. 264, p. 109165, 2020.
- KHWAIRAKPAM, Amrita Devi et al. Possible use of *Punica granatum* (Pomegranate) in cancer therapy. **Pharmacological research**, v. 133, p. 53-64, 2018.
- KOROŠEC, B. et al. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP 53). **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 4, p. 955-966, 2014.
- LE GOFF, Gaëlle; GIRAUDO, Maeva. Effects of pesticides on the environment and insecticide resistance. In: **Olfactory Concepts of Insect Control-Alternative to Insecticides**. Springer, Cham, 2019. p. 51-78.
- LEE, Chia-Jung et al. Multiple activities of *Punica granatum* Linne against acne vulgaris. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 141, 2017.
- LI, Jia et al. Punicalagin and ellagic acid from pomegranate peel induce apoptosis and inhibits proliferation in human HepG2 hepatoma cells through targeting mitochondria. **Food and Agricultural Immunology**, v. 30, n. 1, p. 897-912, 2019.
- LITVOC, Marcelo Nóbrega; NOVAES, Christina Terra Gallafrio; LOPES, Max Igor Banks Ferreira. Yellow fever. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 2, p. 106-113, 2018.
- LIU, Boyang et al. Modeling the present and future distribution of arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* under climate change scenarios in Mainland China. **Science of The Total Environment**, v. 664, p. 203-214, 2019.
- LOUIS, MR Lima Mirabel et al. Mosquito larvicidal activity of Avocado (*Persea americana* Mill.) unripe fruit peel methanolic extract against *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 1-4, 2020.
- LOZOWICKA, B. et al. Toxicological studies for adults and children of insecticide residues with common mode of action (MoA) in pome, stone, berries and other small fruit. **Science of the Total Environment**, v. 566, p. 144-156, 2016.
- MANNING, Joachim C. et al. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochemistry and cell biology**, v. 147, n. 2, p. 199-222, 2017.
- MARCOMBE, Sébastien et al. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007852, 2019.

- MELGAREJO, Pablo et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.
- MISHRA, Abtar et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110827, 2019.
- MISHRA, Tripti et al. Termiticidal Activity of *Punica granatum* fruit rind fractions and its compounds against *Microcerotermes beesonii*. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 320-325, 2017.
- MITCHELL, Carter A.; RAMESSAR, Koreen; O'KEEFE, Barry R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral research**, v. 142, p. 37-54, 2017.
- MOLTINI-CONCLOIS, Isabelle et al. Larval exposure to the bacterial insecticide Bti enhances dengue virus susceptibility of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insects**, v. 9, n. 4, p. 193, 2018.
- MONTEIRO, Julio Marcelino et al. Tannis: from chemistry to ecology. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MUN, Su-Hyun et al. Punicalagin suppresses methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 137, n. 4, p. 317-323, 2018.
- NAPOLEÃO, Thiago Henrique et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.
- NAPOLEÃO, Thiago H. et al. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, p. 1212-1222, 2019.
- NELSON, Michael J. et al. *Aedes aegypti*: Biology and ecology. 1986.
- OLIVEIRA, Ana Patrícia Silva et al. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1683-1690, 2016.
- OLIVEIRA, Ana Patrícia Silva et al. Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 87, p. 101615, 2020.
- OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. Biologia e comportamento do vetor. In: **Dengue: teorias e práticas**. 2015. p. 75-92.
- OLIVEIRA, Stefany Rodrigues; CALEFFE, Ronaldo Roberto Tait; CONTE, Helio. Chemical control of *Aedes aegypti*: a review on effects on the environment and human health. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 240-247, 2017.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. 2020. Acesso: 11/12/2020. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>
- LOUDANE, Boualem et al. Isolation, characterization, antioxidant activity, and protein-precipitating capacity of the hydrolyzable tannin punicalagin from pomegranate yellow peel (*Punica granatum*). **Journal of Molecular Structure**, v. 1156, p. 390-396, 2018.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/ World Health Organization. Epidemiological Update: Yellow Fever. 6 March 2019, Washington, D. C. PAHO/WHO. 2019.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/ World Health Organization. Epidemiological Update: Arbovirus. 10 June 2020, Washington, D. C. PAHO/WHO. 2020.
- PAVELA, Roman et al. Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta tropica**, v. 193, p. 236-271, 2019.
- PEREIRA-FILHO, Adalberto Alves et al. The gut anti-complement activity of *Aedes aegypti*: investigating new ways to control the major human arboviruses vector in the Americas. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, p. 103338, 2020.
- PONTIKI, Eleni et al. Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: Design, synthesis and modeling studies. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9655-9674, 2014.
- PROCÓPIO, Thamara Figueiredo et al. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 2015.
- PUNIA, Abhay et al. Effect of Ellagic acid on the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoid *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 2020.
- REYES-MONTAÑO, Edgar Antonio; VEGA-CASTRO, Nohora Angélica. Plant lectins with insecticidal and insectistatic activities. **Insecticides-Agriculture and Toxicology [Priega per internetă 2018-11-03]**. InTech, p. 17-41, 2018.
- RIBEIRO, Ana Cristina; FERREIRA, Ricardo; FREITAS, Regina. Plant lectins: bioactivities and bioapplications. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, 2018. p. 1-42.
- RÍOS, José-Luis et al. A pharmacological update of ellagic acid. **Planta medica**, v. 84, n. 15, p. 1068-1093, 2018.
- RODRIGUES, Michelle Peixoto et al. Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 183, p. 111688, 2019.

- RODRIGUES-ALVES, Marina Luiza et al. Historical Perspective and Biotechnological Trends to Block Arboviruses Transmission by Controlling *Aedes aegypti* Mosquitos Using Different Approaches. **Frontiers in Medicine**, v. 7, 2020.
- RONGAI, Domenico et al. Punicalagin content and antifungal activity of different pomegranate (*Punica ganatum* L.) genotypes. **Horticulturae**, v. 5, n. 3, p. 52, 2019.
- RUEDA, Leopoldo M.; DEBBOUN, Mustapha. Taxonomy, Identification, and Biology of Mosquitoes. In: **Mosquitoes, Communities, and Public Health in Texas**. Academic Press, 2020. p. 3-7.
- SÁ, Roberto Araújo et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009.
- SANTOS, Vanessa Santana Vieira et al. Evaluation of toxicity and environmental safety in use of spinosad to rationalize control strategies against *Aedes aegypti*. **Chemosphere**, v. 226, p. 166-172, 2019.
- SANTOS, Vanessa Santana Vieira; PEREIRA, Boscolli Barbosa. Properties, toxicity and current applications of the biolarvicide spinosad. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 23, n. 1, p. 13-26, 2020.
- SANTOS, Nataly Diniz de Lima et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44840, 2012.
- SANTOS, Nataly Diniz de Lima et al. Evaluation of *Moringa oleifera* seed lectin in traps for the capture of *Aedes aegypti* eggs and adults under semi-field conditions. **Parasitology research**, v. 113, n. 5, p. 1837-1842, 2014.
- SANTOS, N. D. L. et al. Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 3-8, 2020.
- SARMA, Riju et al. Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1091-1096, 2019.
- SILVA, Livia Lais de Santana et al. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 183, p. 109583, 2019.
- SILVA, Livia Lais de Santana et al. Investigation of the ability of the oviposition-stimulant lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) to bind with membrane proteins present in the legs of *Aedes aegypti*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 657-662, 2020.

- SILVA, Luciana Andrade et al. a influência do desequilíbrio ambiental sobre as doenças transmitidas por *Aedes aegypti*. **Educação Ambiental em ação**, v. 17, n. 66, 2018.
- SILVA, Pollyanna M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of functional foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.
- SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.
- SILVA, Pollyanna Michelle et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019a.
- SILVA, Pollyanna Michelle et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International journal of biological macromolecules**, v. 135, p. 931-939, 2019b.
- SILVA, P. M. et al. Antibacterial effects of the lectin from pomegranate sarcotesta (PgTeL) against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.
- SIMOY, Mario Ignacio; SIMOY, M. V.; CANZIANI, Graciela Ana. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological modelling**, v. 314, p. 100-110, 2015.
- SINGH, Balwinder et al. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. **Food chemistry**, v. 261, p. 75-86, 2018.
- SUKIATO, Febrianne et al. The effects of temperature and shading on mortality and development rates of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 44, n. 2, p. 264-270, 2019.
- SUN, Yu-qing et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. **Journal of integrative agriculture**, v. 16, n. 8, p. 1808-1818, 2017.
- TERRA, Márcia Regina et al. *Aedes aegypti* e as arbovíroses emergentes no Brasil. **Revista Uningá Review**, v. 30, n. 3, 2017.
- THOMAS, Stephen J.; YOON, In-Kyu. A review of Dengvaxia®: Development to deployment. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2295-2314, 2019.
- THONGWAT, Damrongpan et al. Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 3, p. 222-226, 2017.

- TSANEVA, Mariya; VAN DAMME, Els JM. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, p. 1-19, 2020.
- USTA, Coskun et al. The pharmacological use of ellagic acid-rich pomegranate fruit. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 7, p. 907-913, 2013.
- VALLE, Denise; BELINATO, Thiago Affonso; MARTINS, A. de J. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. **Dengue: teorias e práticas**, p. 93-126, 2015.
- VAN HOLLE, Sofie; VAN DAMME, Els JM. Messages from the past: New insights in plant lectin evolution. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 36, 2019.
- VARGAS-MIRANDA, Karina; TROYO, Adriana; CALDERÓN-ARGUEDAS, Ólger. Resistencia de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) a insecticidas organofosforados y piretroides en la localidad de Orotina, Alajuela, Costa Rica. **Revista Costarricense de Salud Pública**, v. 28, n. 1, p. 15-24, 2019
- VARGHESE, Sheeja et al. The inhibitory effect of anti-tumor polysaccharide from *Punica granatum* on metastasis. **International journal of biological macromolecules**, v. 103, p. 1000-1010, 2017.
- VIUDA-MARTOS, Manuel; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, Javier; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 6, p. 635-654, 2010.
- VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD, Angelle Desiree. Chikungunya virus. **Clinics in laboratory medicine**, v. 37, n. 2, p. 371-382, 2017.
- WILDER-SMITH, Annelies. Dengue vaccine development by the year 2020: challenges and prospects. **Current Opinion in Virology**, v. 43, p. 71-78, 2020.
- WU, Sheng; TIAN, Li. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1606, 2017.
- YUAN, Zhaohe et al. The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology. **Plant biotechnology journal**, v. 16, n. 7, p. 1363-1374, 2018.
- ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.
- ZHANG, Li et al. Punicalagin promotes the apoptosis in human cervical cancer (ME-180) cells through mitochondrial pathway and by inhibiting the NF-kB signaling pathway. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2020.