



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



JULIANE NANCY DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO SALINO DE SARCOTESTA DE *Punica granatum* L. NO
DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti* L. (1762) E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE AGUDA *in vivo* EM *Mus musculus***

Recife

2025

JULIANE NANCY DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO SALINO DE SARCOTESTA DE *Punica granatum* L. NO
DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti* L. (1762) E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE AGUDA *in vivo* EM *Mus musculus***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Meio
Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thâmarah de Albuquerque Lima

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Patrícia Silva de Oliveira Santos

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Juliane Nancy de Oliveira.

Efeito do extrato salino de *Sarcotesta de Punica granatum* L. no desenvolvimento de *Aedes aegypti* L. (1762) e avaliação da toxicidade aguda in vivo em *Mus musculus* / Juliane Nancy de Oliveira Silva. - Recife, 2025.

77f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2025.

Orientação: Thâmarah de Albuquerque Lima.

Coorientação: Ana Patrícia Silva de Oliveira Santos.

Inclui referências e anexos.

1. Romãzeira; 2. Arboviroses; 3. Inseticidas; 4. Toxicidade Aguda. I. Lima, Thâmarah de Albuquerque. II. Santos, Ana Patrícia Silva de Oliveira. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

JULIANE NANCY DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO SALINO DE SARCOTESTA DE *Punica granatum* L. NO
DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti* L. (1762) E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE AGUDA *in vivo* EM *Mus musculus***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Thâmarah de Albuquerque Lima (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^ª. Livia Lais de Santana Silva Barbosa (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Robson Raion de Vasconcelos Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rômulo Carlos Dantas da Cruz (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar ao Senhor nosso Deus por tudo que Ele fez por mim e pelo que ainda irá fazer, pois seus planos são muito maiores do que posso imaginar. Ele que me fortaleceu e me sustentou durante esses anos de doutorado, mesmo quando aparecia pensamentos para desistir, o seu Santo Espírito me orientava da melhor forma, obrigada Senhor Jesus.

Também quero agradecer a minha família, por todo apoio e suporte, aos meus pais (Edileusa e Olavo) por ter me incentivado desde criança a estudar e a ter uma riqueza que ninguém pode tomar, a educação. A minha irmã Mírian e seu esposo Genilson por ter me acolhido em seu lar e ter me ajudado em tudo que precisava, inclusive ao meu pequeno João. Aos meus irmãos e sobrinhos, Janainy, Mércia, Jonas, Pedro, Melinna, Akillis, Arthur e Miguel. Agradeço também a família que Deus me deu, a minha melhor amiga Van por ter me apoiado em tudo e ter me incentivado a finalização desse doutorado. Ao seu esposo Felipe e a sua filha Luísa.

Agradeço também a minha Igreja Batista Missionária, aos pastores e a todos que dividem comigo o dia a dia do que é ser igreja e viver em um ministério.

Agradeço também a todos que fazem parte do BIOPROT, inclusive ao INSETÁRIO do BIOPROT por todo companheirismo nessa jornada e tudo que construímos juntos, a Patryck, Angela, Manu, Jeff, Gabriel e Quéren por toda ajuda e disponibilidade. Agradeço aos laboratórios parceiros que ajudaram na construção desse trabalho, o Laboratório de Toxicologia e o Laboratório de Biologia Molecular de Insetos principalmente. Aos professores responsáveis pelo BIOPROT por toda as oportunidades depositadas a mim, Thiago, Patrícia e Leyde. Em especial a Thâmarah e Ana Paty, minhas orientadoras, agradeço por todo suporte e ajuda ao longo desses anos, e por toda orientação e incentivo.

Quero agradecer também a disponibilidade da banca por me ajudar nas correções deste trabalho, ao Profº Mano, a Robson, Livia e Rômulo.

E por fim ao departamento de Bioquímica e ao programa de pós graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade. As agências de fomento CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e a FACEPE pela bolsa de auxílio para realizar parte dos experimentos na Universidade Federal de Viçosa.

“Ora, o Senhor é Espírito e onde está o Espírito do Senhor, ali há liberdade” (Bíblia, 2018, p.1415)

RESUMO

Aedes aegypti é um mosquito transmissor de diversas arboviroses, como a dengue, zika, chikungunya e febre amarela urbana. Para que ocorra a diminuição da incidência dessas doenças é necessário que se tenha o controle populacional do vetor. A *Punica granatum* (romãzeira) apresenta diferentes atividades biológicas e sua utilização na medicina popular é relatada desde a antiguidade. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do extrato salino da sarcotesta de *P. granatum* em causar alterações no ciclo de vida do *Ae. aegypti*, e analisar a toxicidade aguda *in vivo* do extrato por via oral em camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*). O ensaio larvicida foi executado utilizando o extrato (10-30% v/v) da romã para determinar a concentração letal para matar 50% das larvas (CL₅₀). Em seguida, foram analisados os efeitos deletérios do extrato no ciclo de vida de *Ae. aegypti* após o contato durante a fase larval, o efeito sobre as enzimas (digestivas e do sistema nervoso) das larvas, e possíveis alterações morfológicas através da análise histológica nas diferentes fases de vida do inseto. A atividade hemolítica *in vitro* e a toxicidade aguda *in vivo* do extrato da romã em camundongos Swiss também foi realizada. O extrato salino apresentou CL₅₀ de 12,2% (v/v) sobre larvas *Ae. aegypti*, e causou um retardo no ciclo de vida do mosquito nas concentrações de 5% e 10%; também alterou a atividade das enzimas aumentando a ação da tripsina e inibindo a acetilcolinesterase. Como resultado da atividade de toxicidade aguda, o extrato não apresentou toxicidade na concentração de 2000 mg/kg, causando apenas um aumento significativo no peso do baço. O extrato da romã, mostrou-se um inseticida natural promissor para o controle de larva de *Ae. aegypti*, interferindo sobre o ciclo de vida desse inseto, e não apresentou toxicidade *in vivo* sobre camundongos, indicando que o extrato pode ser utilizado de maneira segura desde que não ultrapasse as concentrações testadas (2000 mg/kg).

Palavras-chave: Romãzeira. Arboviroses. Inseticidas. Toxicidade Aguda.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a mosquito that transmits various arboviruses, such as dengue, zika, chikungunya and urban yellow fever. In order to reduce the incidence of these diseases, it is necessary to control the vector's population. *Punica granatum* (pomegranate) has different biological activities and its use in folk medicine has been reported since ancient times. Therefore, the aim of this study was to evaluate the ability of the saline extract of the sarcotesta of *P. granatum* to cause changes in the life cycle of *Ae. aegypti*, and to analyze the acute in vivo toxicity of the oral extract in female Swiss mice (*Mus musculus*). The larvicidal test was carried out using the extract (10-30% v/v) of pomegranate to determine the lethal concentration to kill 50% of the larvae (CL50). Next, the deleterious effects of the extract on the life cycle of *Ae. aegypti* were analyzed after contact during the larval stage, the effect on the enzymes (digestive and nervous system) of the larvae, and possible morphological changes through histological analysis in the different life stages of the insect. The in vitro hemolytic activity and in vivo acute toxicity of the pomegranate extract in Swiss mice was also carried out. The saline extract showed a CL50 of 12.2% (v/v) on *Ae. aegypti* larvae, and caused a delay in the mosquito's life cycle at concentrations of 5% and 10%; It also altered enzyme activity by increasing trypsin action and inhibiting acetylcholinesterase. As a result of the acute toxicity activity, the extract showed no toxicity at a concentration of 2000 mg/kg, causing only a significant increase in spleen weight. The pomegranate extract proved to be a promising natural insecticide for controlling *Ae. aegypti* larvae, interfering with the insect's life cycle, and showed no in vivo toxicity to mice, indicating that the extract can be used safely as long as it does not exceed the concentrations tested (2000 mg/kg).

Keywords: Pomegranate. Arboviruses. Insecticide. Acute Toxicity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	<i>BIOLOGIA DO Aedes aegypti</i>	12
3.1.1	Arboviroses transmitidas pelo <i>Aedes aegypti</i>	15
3.1.2	Controle Populacional	17
3.2	INSETICIDAS NATURAIS	18
3.3	<i>Punica granatum</i> L.	19
3.3.1	Compostos Bioativos	21
3.3.2	Atividades Biológicas	23
3.4	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1	ARTIGO 1	26
4.2	ARTIGO 2	44
5	CONCLUSÕES	67
6	SÚMULA CURRICULAR	68
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A	77

1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti é um inseto pertencente à família Culicidae e que possui uma grande importância no âmbito da saúde mundial devido ao grande número de arboviroses que ele é capaz de transmitir. As Arboviroses são doenças transmitidas pelos artrópodes, dentre eles, os mosquitos e carrapatos. A fêmea do *Ae. aegypti*, após o acasalamento, necessita de sangue para a maturação dos seus ovos, e é nessa fase que ela consegue transmitir ao homem quatro dessas arboviroses, febre amarela, dengue, febre chikungunya e a febre Zika. Apenas a febre amarela e a dengue possuem vacina distribuída pelo Ministério da Saúde, o que torna a principal forma de combater as arboviroses o controle populacional do mosquito (Agha e Tchouassi, 2022; Barrera, 2022).

Aedes aegypti tem preferência para depositar seus ovos em ambientes artificiais próximos a habitações humanas, como uma forma de aumentar as chances de sobrevivência e crescimento da sua prole, esse comportamento está associado a distribuição global e aumento populacional. Alguns exemplos de recipientes artificiais em que o mosquito pode ovipositar são baldes de plásticos, pneus, vasos, peças descartadas indevidamente, caixa d'água, entre outros (Tchouassi *et al.*, 2022).

Então, o controle populacional do mosquito se dá pela erradicação desses criadouros e também pelo uso de inseticidas sintéticos. Porém, devido ao uso indiscriminado desses inseticidas, incluindo carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretróides, houve um aumento na resistência dos mosquitos, além de que, alguns inseticidas apresentam uma degradação a longo prazo se acumulando no meio ambiente e afetando outros organismos não alvo. Sendo assim, é de extrema importância a utilização de inseticidas naturais, que sejam ambientalmente seguros e não prejudiquem outros organismos presentes no mesmo ambiente (Egid *et al.*, 2022; Marques *et al.*, 2021). Um exemplo de inseticida natural que já é comercializado é o produto à base de *Bacillus thuringiensis* como *Vectobac*, uma bactéria que produz proteínas tóxicas e é utilizado contra pragas das lavouras como coleópteros e lepidópteros. Além de sua alta eficácia, ele possui a vantagem de não prejudicar organismos não-alvo e o meio ambiente, porém seu tempo de persistência no ambiente é curto e pode ser rapidamente degradado pelo sol e por outros organismos do solo (Nascimento *et al.*, 2022).

Punica granatum, conhecida como “romãzeira”, pertence à família Lythraceae

e é conhecida mundialmente por suas propriedades biológicas desde a antiguidade. A romãzeira possui diversas propriedades farmacológicas, dentre elas está a atividade antimicrobiana (Scaglione et al., 2024), anti-inflamatória (Mannino et al., 2023), antioxidante (Sihag et al., 2022), anticâncer (Yusefi et al., 2020) e também inseticida (Silva et al., 2022a). Compostos bioativos já foram identificados e isolados da *P. granatum*, sendo encontrados em maior quantidade a Punicalagina α e β (elagitanino), ácido elágico (elagitanino) e ácido gálico (composto fenólico). Além desses, outros compostos, como terpenos, flavonóides e açúcares, também foram encontrados (Maphetu et al., 2022).

Compostos com potenciais farmacológicos necessitam de estudos toxicológicos para saber se a substância afeta a saúde dos organismos não-alvo, por isso, é necessário a realização de atividades toxicológicas em modelos vivos, como por exemplo, em ratos e camundongos. Extrato etanólico de *Psoraleae fructus* apresentou toxicidade aguda em camundongos Kunming, causando alterações nos rins e fígado (Gao et al., 2023). Diferente do suco da *P. granatum* que não apresentou toxicidade sub aguda (exposição repetida por um período curto de tempo) e subcrônica (exposição repetida por um período longo de tempo) em ratos Wistar e camundongos CD-1 nas concentrações testadas (Álvarez-Cervantes et al., 2021).

Nesse sentido o presente trabalho avalia o potencial biotecnológico de uma preparação obtida do fruto de uma planta popularmente conhecida por suas propriedades farmacológicas, em induzir mortalidade e retardar o desenvolvimento do ciclo de vida no *Ae. aegypti*, bem como avaliar a nível de toxicidade para organismos não-alvo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade inseticida do extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum* contra *Ae. aegypti* em diferentes fases de vida, observar mecanismos de ação envolvidos e avaliar a toxicidade aguda do extrato em camundongos Swiss fêmeas.

2.2 ESPECÍFICOS

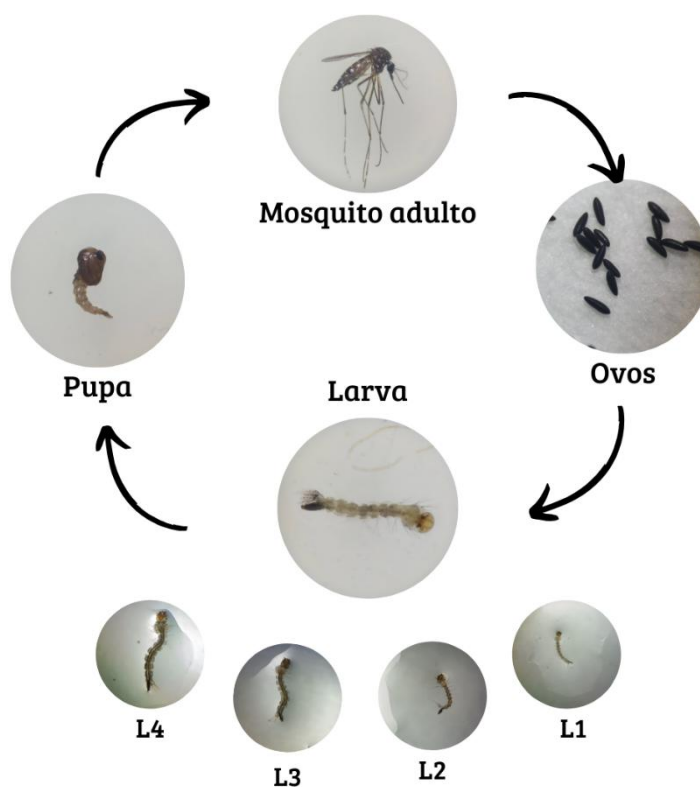
- Obter o extrato salino de sarcotesta de *P. granatum* por procedimento pré-estabelecido.
- Determinar as concentrações letais capaz de matar 50% das larvas (CL₅₀) do extrato de *P. granatum* sobre *Ae. Aegypti* na fase larval L3.
- Avaliar a ação do extrato de *P. granatum* na sobrevivência e ciclo de vida de *Ae. aegypti* previamente tratadas durante a fase larval.
- Avaliar os efeitos do extrato no comportamento de oviposição e taxa de eclosão dos ovos das fêmeas que foram previamente tratadas durante a fase larval.
- Avaliar o efeito do extrato na atividade de enzimas digestivas e do sistema nervoso das larvas.
- Avaliar danos causados na morfologia do intestino médio de larvas, pupas e adultos previamente incubadas com o extrato no estágio larval.
- Avaliar a ação de toxicidade aguda do extrato de *P. granatum* em camundongos fêmeas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. BIOLOGIA DO *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* pertence à família Culicidae e Ordem dos Dípteros. Estudos relatam que sua origem tenha se dado através do continente Africano. Atualmente ele está distribuído em várias regiões do mundo, principalmente em locais com temperaturas mais quentes e umidade alta (Giunti *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023). O ciclo de vida do *Ae. aegypti* consiste em quatro estágios: ovo, larva, pupa e mosquito adulto (figura 1). Os três primeiros estágios ocorrem na água ou próximo a sua superfície e no último estágio ele emerge da água como forma de mosquito adulto (Santos *et al.*, 2023).

Figura 1 – Ciclo de vida do *Ae. Aegypti* demonstrando do ovo até a fase adulta.



Fonte: A autora (2023).

Os ovos dos mosquitos são elípticos ou ovais, com aspecto alongado (figura 2), logo após a oviposição os ovos são claros, mas vão escurecendo alguns minutos depois devido ao contato com o oxigênio. As fêmeas colocam seus ovos em locais úmidos próximos da superfície da água. A casca do ovo faz a proteção mecânica do

embrião, além de ser resistente à perda de água e possibilitar a troca gasosa (Rueda e Debboun, 2020; Facchinelli, Badolo e McCall, 2023). Ao ser colocado em superfícies sem o contato direto com a água, os ovos de *Ae. aegypti* podem sobreviver por vários meses (até 450 dias) sem que haja a eclosão, pois eles são bastante resistentes à variação de temperatura e dessecação. Existem alguns estímulos que fazem com que esses ovos eclodam, como por exemplo, o contato com a água e temperatura 21-29 °C (Egid *et al.*, 2022; Bonds *et al.*, 2022).

Figura 2 – Ovos do *Aedes aegypti*.



Fonte: A autora (2023).

As larvas do *Ae. aegypti* são aquáticas e possuem o formato de verme, elas possuem a divisão do corpo bem nítidas, porém a cabeça e o tórax são mais globosos e o abdome cilíndrico (figura 3). As larvas precisam estar próximas da superfície da água, pois elas necessitam do oxigênio do ar para sua respiração (Rueda e Debboun, 2020; Facchinelli, Badolo e McCall, 2023). Elas passam por quatro estágios larvais (Figura 1) até chegar na fase de pupa, sendo a última fase larval a mais longa e resistente. Em relação a alimentação das larvas, elas se alimentam de microrganismos, algas unicelulares, pequenos crustáceos e matéria orgânica. Devido a sua ingestão de partículas não seletivas o uso de larvicidas é facilitado (Carvajal-Lago *et al.*, 2021; Joshi e Miller, 2021).

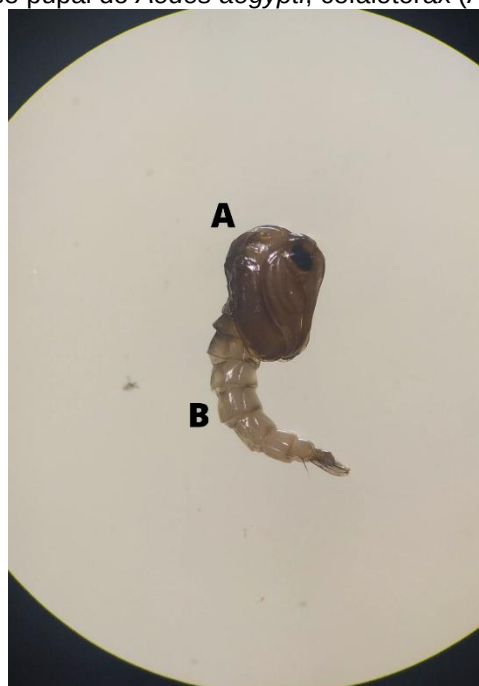
Figura 3 – Larva de *Aedes aegypti*, cabeça (A), tórax (B) e abdome (C).



Fonte: A autora (2023).

A fase de pupa é onde ocorre a metamorfose no mosquito, elas possuem a aparência de vírgula e seu corpo apresenta duas divisões, cefalotórax (cabeça + tórax) e abdome (figura 4). Ela é a fase intermediária entre dois estágios ativos (larvas e adultos), pois não se alimentam e dependendo da temperatura ela pode permanecer nesta fase de 1 dia a semanas (Joshi e Miller, 2021).

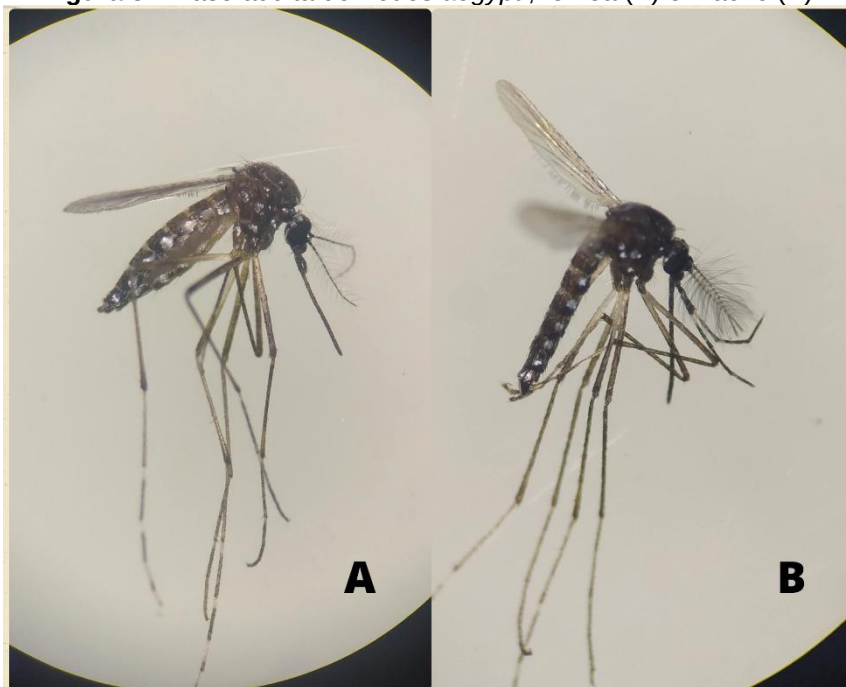
Figura 4 – Fase pupal do *Aedes aegypti*, cefalotórax (A) e abdome (B).



Fonte: A autora (2023).

O corpo do mosquito adulto é dividido em cabeça, tórax e abdome (figura 5). É na cabeça que estão localizados os principais órgãos de sentidos, como as antenas e os olhos. A antena é o principal órgão que diferencia o macho da fêmea, onde a fêmea possui uma antena pilosa (Figura 5A) e o macho antena plumosa (figura 5B). No tórax se encontram os apêndices locomotores, os três pares de pernas e as asas. No abdome estão a maior parte dos órgãos reprodutor, digestivo e excretor. A alimentação do adulto se dá através da ingestão de carboidratos oriundos das seivas, flores e frutos. As fêmeas, além da ingestão dos carboidratos, são hematófagas, ou seja, é necessário a alimentação com sangue para o desenvolvimento de seus ovos (Barredo e Degennaro, 2020; Vinauger e Chandrasegaran, 2024).

Figura 5 – Fase adulta do *Aedes aegypti*, fêmea (A) e macho (B).



Fonte: A autora (2023).

3.1.1 Arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti*

As arboviroses são doenças causadas por arbovírus, que são vírus transmitidos pelos artrópodes hematófagos. Já existem centenas de arbovírus conhecidos, dentre eles, cerca de 30 são causadores de doenças em humanos. Desses 30, o mosquito *Aedes aegypti* é capaz de transmitir quatro para o homem, afetando assim a saúde pública mundial. De acordo com as características desses

quatro vírus, eles são de RNA fita simples e possuem uma alta taxa de mutação, o que ajudou em sua replicação e adaptação em hospedeiros distintos (Clancy et al., 2021; Gómez et al., 2022).

O vírus da febre amarela (YFV), da dengue (DENVs) e Zika (ZIKV) são flavivírus, e o chikungunya (CHIKV) um alfavírus. Eles causam alguns sintomas semelhantes em humanos, como febre alta prolongada e dores nas articulações (Barrera, 2022).

A dengue é uma das infecções virais transmitidas pelo mosquito para as pessoas, ela é mais comum em lugares com climas tropicais e subtropicais. Dentre seus sintomas mais comuns estão a febre alta, dor de cabeça, dores no corpo, náusea e erupções cutâneas, porém em algumas pessoas pode se desenvolver a forma grave da doença, levando-as a óbito. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), a incidência de dengue cresceu muito nas últimas décadas, em 2000 foi relatado 505.430 casos, já em 2019, esse número subiu para 5,2 milhões. Entre os anos de 2020 a 2022, devido a pandemia do COVID, houve um declínio nas notificações dos casos de Dengue, porém em 2023 houve um aumento considerável obtendo um máximo de 5 milhões de casos e 5000 mortes (Organização Mundial da Saúde, 2023).

O Zika vírus é transmitido principalmente pelo *Ae. aegypti* e pelo *Aedes albopictus*, e foi relatada sua infecção em humanos pela primeira vez em 1952, na Uganda e na Tanzânia (Nikookar et al., 2020). A primeira epidemia do Zika vírus no Brasil ocorreu em 2015 e foi relacionada ao aumento de incidência de microcefalia em recém-nascidos, síndrome de Guillain-Barré e meningoencefalite. As manifestações clínicas do Zika vírus mais comuns são febre, erupção cutânea, mialgia, artralgia e em alguns casos podem estar associadas a manifestações cardiovasculares (Scatularo et al., 2022).

O vírus da Febre Chikungunya foi isolado pela primeira vez em 1952 e 1953, durante um surto que ocorreu na Tanzânia (África). As manifestações clínicas geralmente são um início abrupto de febre e dor nas articulações, chegando a causar incapacitação em alguns casos. Outros sintomas incluem dor muscular, inchaço nas articulações, dor de cabeça, náuseas e erupções cutâneas. Cerca de 40% dos pacientes diagnosticados com esse tipo de infecção, têm sequelas reumatológicas crônicas que podem permanecer por longos períodos (Grabenstein e Tomar, 2023; Silva, et al., 2023a).

Entre os séculos XVII ao XIX a Febre Amarela era uma doença misteriosa que

afetava as regiões tropicais da África, Caribe e as Américas. Após a confirmação do vetor, houve uma grande busca para o desenvolvimento de uma vacina eficaz por volta da metade do século XX. As manifestações clínicas da Febre Amarela se caracterizam por febre, náusea, mialgia, dor gástrica e em casos mais graves podem evoluir para hepatite com icterícia, insuficiência renal, hemorragia e em alguns casos morte (Higuera e Ramírez, 2019; Tuells *et al.*, 2022).

Aedes aegypti possui habitats que facilitam as epidemias e a transmissão dos arbovírus. Eles vivem em áreas urbanizadas, conseguem abrigo dentro de casas, encontrando habitats aquáticos artificiais e tendo assim um local adequado para a produção de seus ovos. Com isso, é de extrema importância reduzir o nível da população do mosquito, para que haja o controle na transmissão das arboviroses (Barrera, 2022; Giunti *et al.*, 2023).

3.1.2 Controle Populacional

Já existem vacinas licenciadas para alguns tipos de arboviroses, como é o caso da febre amarela, dengue (Qdenga) e a da Chikungunya (VLA1553). Porém, a utilização de algumas dessas vacinas ainda requer uma preocupação de segurança, devido à alta taxa de mutabilidade entre o vírus e a utilização do método de vacinas vivas atenuadas (vírus enfraquecido), em que a alta taxa de erro pode levar a uma maior virulência de uma cepa vacinal, e não é recomendado a sua utilização em pessoas com a imunidade comprometida (Van Bree *et al.*, 2023).

Sendo assim, é de suma importância a existência de outros meios de controle do vetor dessas doenças, como o controle populacional do *Ae. aegypti*, diminuindo assim a incidência de infecções e prevenção de surtos. Uma das estratégias principais para diminuir a população desses mosquitos é a eliminação de reservatórios de água, utilizados para o desenvolvimento e eclosão das larvas. Uma outra estratégia é atuar diretamente no controle da fonte larval, como estas têm mobilidade reduzida e não conseguem mudar de habitat, acabam se tornando um alvo fácil para os larvicidas. Porém é preciso tomar cuidado com o potencial de toxicidade ambiental (Santos *et al.*, 2023).

Inseticidas sintéticos têm sido utilizados há muitos anos, organofosforados, organoclorados, piretróides e carbamatos são exemplos disso, porém eles são altamente tóxicos para o meio ambiente e outros organismos não alvo. Outros

inseticidas sintéticos menos tóxicos foram desenvolvidos, como por exemplo, neonicotinoides e oxadiazinas. Eles são mais seletivos o que diminui a chance de afetar organismos não-alvo e possuem uma menor persistência ambiental. No entanto, o uso indiscriminado pode acarretar resistência de insetos e pode prejudicar outros organismos (Egid *et al.*, 2022; Silvério *et al.*, 2020). É necessário que exista uma gama de inseticidas que sejam eficazes e ecologicamente corretos, que não sejam danosos ao meio ambiente e que não cause danos a espécies não-alvos (Luz *et al.*, 2020).

3.2 INSETICIDAS NATURAIS

Os Inseticidas naturais surgiram como uma alternativa ecológica, pois eles podem não agredir o meio ambiente e podem não afetar outros organismos, o que diferem dos pesticidas químicos. Porém, apesar de seu grande potencial, os inseticidas naturais ainda são bastante negligenciados, é necessário que haja um maior investimento tanto financeiro, como também, educar o público contra as desvantagens da utilização dos inseticidas químicos (Amelia-Yap *et al.*, 2022).

Os inseticidas em geral podem ser classificados em três categorias de acordo com seu modo de ação: neurotóxico (afetam o sistema nervoso), reguladores de crescimento (interferindo na síntese de quitina) e Interferência na respiração celular (bloqueando processos metabólicos). Os Inseticidas naturais têm demonstrado diferentes modos de ação, tanto a nível celular como a nível fisiológico (Ganesan *et al.*, 2023).

Um exemplo de bioinseticida utilizado e comercializado é o microrganismo *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria conhecida por produzir proteínas tóxicas principalmente contra os insetos, ela produz também outros metabólitos ao longo de seu ciclo de vida. Por ser biodegradável, específico e de alto potencial, o Bt é considerado uma grande ferramenta para o controle de pragas, além de ter uma facilidade para sua produção comercial (Santos *et al.*, 2022). Um estudo envolvendo o isolados de Bt do solo na Arábia Saudita, demonstrou sua ação contra larvas de *Ae. aegypti* (CL₅₀: 207 ppm) e contra larvas de *Spodoptera littoralis* (CL₅₀: 193,93 ppm) (El-ghiet *et al.*, 2023).

Estudos com diferentes extratos têm sido apresentados como potenciais inseticidas naturais, como por exemplo, extrato metanólico de folhas de pinheiro

(*Pinus roxburghii*) que apresentou efeito contra *Plutella xylostella* L. (CL₉₀: 20%) (Alam *et al.*, 2022). Extratos de éter de líquen (*Ramalina complanata*) apresentou CL₅₀ de 5,9 µg.ml⁻¹ contra larvas de *Ae. aegypti*, já o extrato acetônico de *Cladonia verticillaris* apresentou CL₅₀ de 17,4 µg.ml⁻¹ (Silva *et al.*, 2023b). Extrato hidroalcoólico e hexânico de frutos de *Piper cubeba* apresentaram atividades larvicidas contra *Ae. aegypti* com CL₅₀ de 191,1 µg/mL e 185,84 µg/mL respectivamente, demonstrando inclusive danos estruturais no tegumento da larva (Gomes *et al.*, 2022).

Além de extratos, outros compostos também possuem ação contra insetos, como por exemplo, óleos essenciais. Óleo essencial de *Camaecyparis obtusa* obteve efeito inseticida contra *Tribolium castaneum* com CL₅₀ de 52,54 µg/adulto, além disso apresentou ação repelente (>80%) e efeito fumigante (CL₅₀ de 7,09 µg/L) (Zhang *et al.*, 2023). O óleo essencial de *Croton tetradenius* apresentou ação repelente espacial contra *Ae. aegypti* nas concentrações de 200 e 300 mg/cm². E uma repelência efetiva para 50% dos mosquitos na concentração de 14,1 mg/cm² (Sousa *et al.*, 2023). Outro óleo que apresentou atividade contra o *Ae. aegypti* foi o óleo essencial da folha e casca de *Citrus aurantifolia*, ambos apresentando uma atividade ovicida de CL₅₀ de 5,26ppm e 17,71 ppm respectivamente. Além disso, eles apresentaram ação contra as larvas com CL₅₀ de 128,81ppm e 188,59 ppm após 24h de incubação (Sarma *et al.*, 2019).

3.3 *Punica granatum* L.

Punica granatum L. é conhecida popularmente como romãzeira, ela pertence à família Lythraceae e é originária do Himalaia, onde foi primeiramente cultivada na Ásia central e no mediterrâneo. Ela está presente em diversas regiões do continente, pois se adaptou a regiões que possuem clima tropical e temperado (Machado; Ferreira e Soares, 2022). A romã foi utilizada desde a antiguidade como uma fonte de tratamento para diversas doenças, como problemas gastrointestinais, infecções, saúde bucal e cicatrizações de feridas, devido à sua grande ação benéfica à saúde humana (Moga *et al.*, 2021).

A árvore é considerada de pequeno porte do tipo arbustiva, com tronco múltiplo e folhas lisas. Seus frutos são globosos, semelhante a uma granada (Figura 6) e suas sementes são envolvidas por uma camada comestível denominada sarcotesta, ou arilo (figura 7), seu suco tem um grande teor de vitamina C e é considerado como uma

fonte de conteúdo fenólico (Machado; Ferreira e Soares, 2022; Maphetu *et al.*, 2022).

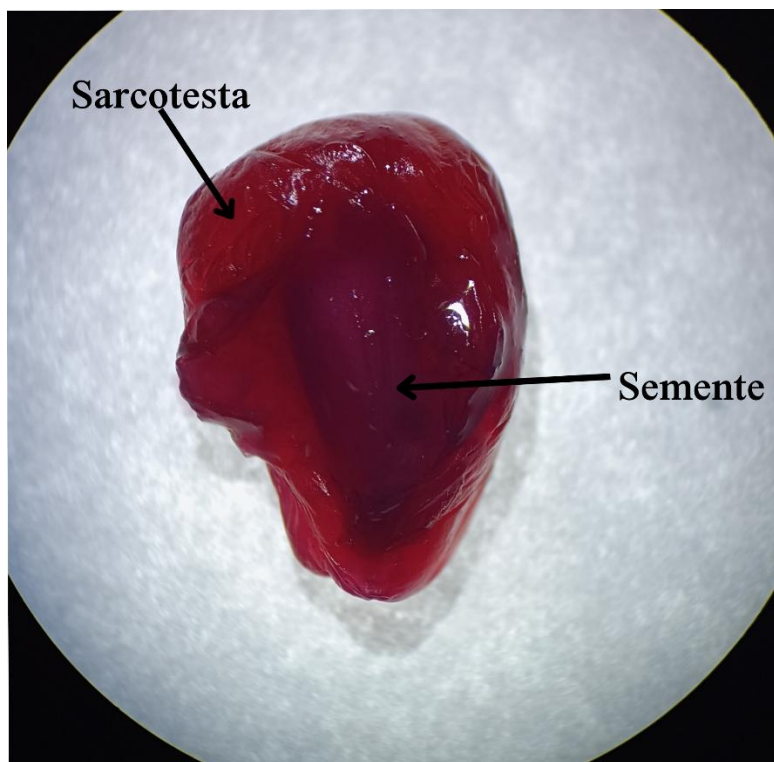
Figura 6 – Folhas, flores e frutos de *Punica granatum*



Fonte: A autora (2025).

O arilo é um tegumento que recobre a semente totalmente ou parcialmente, ele corresponde por 52% do peso total do fruto junto com a semente. Ele é constituído por uma camada succulenta e comestível e são compostos principalmente por água e açúcares. Também são uma grande fonte de minerais, como por exemplo, potássio, cálcio, ferro, manganês e cobre. Além de conter fibras e vitamina C, eles possuem outros compostos bioativos que serão relatados a seguir (Valero-Mendoza *et al.*, 2022).

Figura 7 - Sarcotesta da Romã.



Fonte: A autora (2025).

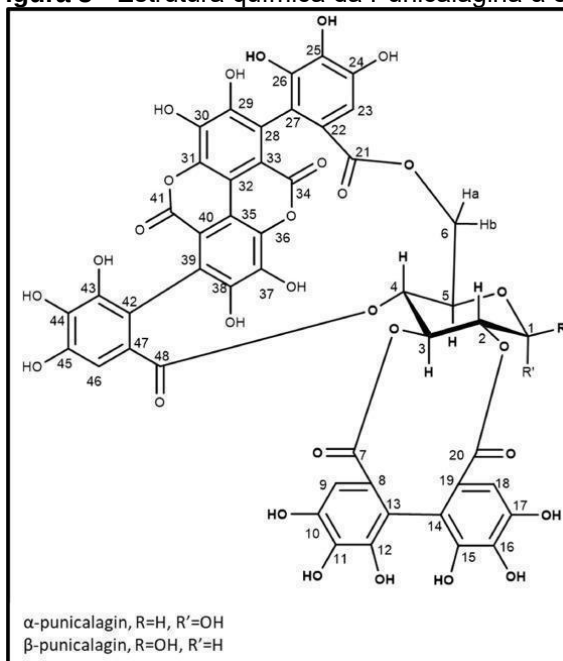
3.3.1 Compostos Bioativos

Os polifenóis são amplamente distribuídos na natureza, principalmente como metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. A romã é rica em diversos compostos bioativos, dentre eles estão os ácidos fenólicos (ácido gálico), taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos) e flavonoides (Saparbekova *et al.*, 2022). Esses compostos estão presentes em suas diferentes partes (suco, sementes, casca, flores e folhas), sendo os elagitaninos e os galotaninos os mais abundantes no suco, casca, sementes e flores da romã. A punicalagina, ácido elágico e ácido gálico são os compostos bioativos mais estudados da romã e eles serão descritos abaixo (Cheng *et al.*, 2023; Yisimayili e Chao, 2022).

A punicalagina é um elagitanino, pertencente a classe dos taninos hidrolisáveis, e já foi relatado na literatura diversos benefícios desse composto. Ela está presente na romã em suas formas isoméricas α e β (Figura 8) (Ramlagan *et al.*, 2022). Estudos realizados com a punicalagina isolada da romã tem demonstrado diferentes atividades biológicas, como por exemplo, um estudo feito com punicalagina isolada da casca da romã reduziu acentuadamente os níveis das oncoproteínas do HPV (Papiloma vírus humano) E6 e E7 em células de câncer cervical (Xie *et al.*, 2022).

A punicalagina isolada da casca também apresentou ação contra *Salmonella Typhimurium*, danificando sua membrana celular e inibindo a sua proliferação (Li et al., 2020).

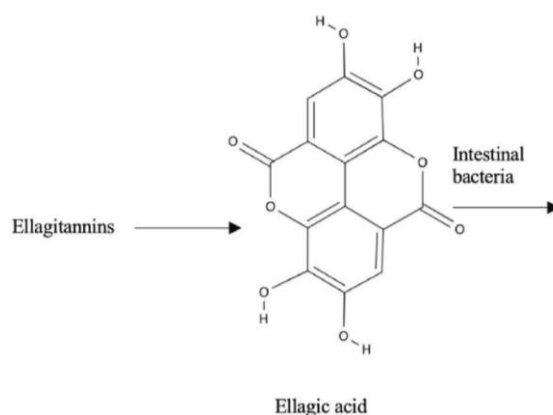
Figura 8 - Estrutura química da Punicalagina α e β



Fonte: Ramlagan et al. (2022).

Outro composto bioativo da romã é o ácido elágico, ele é encontrado naturalmente em sua forma livre ou como derivado da hidrólise de um elagitanino. Sua estrutura é composta por dois ácidos gálicos (Figura 9) e ele apresenta algumas atividades, como por exemplo, atividade antioxidante (Kwok, Balasooriya e Ng, 2023). Ácido elágico extraído de flores de romã conseguiu demonstrar efeito inibitório contra a bactéria *Streptococcus mutans*, além disso, ele também apresentou efeito antitumoral (Lu et al., 2023; Wu et al., 2021).

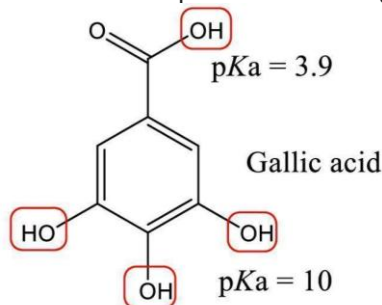
Figura 9 - Estrutura química do ácido elágico



Fonte: Kwok, Balasooriya e Ng (2023).

O ácido gálico é um composto fenólico encontrado na sua forma livre ou como constituinte de um tanino (figura 10). Eles estão presentes em muitas espécies de plantas e possuem um grande poder antioxidante, onde geralmente são utilizados para eliminar espécies reativas de oxigênio. Além disso, eles possuem atividade antifúngica, antimicrobiana e anticancerígena (Rosas; Correa e Henriques, 2019).

Figura 10 - Estrutura química do ácido gálico



Fonte: Venkatesan et al. (2023).

3.3.2 Atividades Biológicas

Estudos com diferentes extratos de *Punica granatum* L. mostraram diversas atividades biológicas de suas partes, como suco, sementes, folhas e casca. Extrato da casca da romã mostrou forte atividade antibacteriana com concentração mínima inibitória (CMI) variando entre 780 µg/ml e 6250 µg/ml contra bactérias resistentes a antibióticos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Corynebacterium kroppenstedtii* e *Escherichia coli*) (Saini et al., 2023). Extrato

da fruta inteira da romã foi testado em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e com uma dose não citotóxica de 1 µg/ml induziu em 24 horas uma redução de três citocinas pró-inflamatórias (interleucina-8, interleucina-1 beta e fator de necrose tumoral-alfa), tanto na expressão gênica como em níveis de secreção (Pierdomenico, Riccioni e Benassi, 2023).

Um produto oriundo do extrato de casca da romã são as nanopartículas de prata, que após a sua síntese foi testado contra todos os estágios larvais de *Spodoptera littoralis*, este demonstrou uma atividade eficaz contra o primeiro estágio larval, obtendo uma CL₅₀ de 68,32 µg/ml. Já o extrato da romã sem as nanopartículas apresentou uma CL₅₀ maior de 2852 µg/ml (Saad *et al.*, 2021). Outro efeito dessas partículas foi sua ação contra o vírus do mosaico do tabaco, patógeno que afeta os tomateiros. A aplicação dessas moléculas levou a uma redução no acúmulo do vírus nas plantas infectadas e retardou a replicação viral (Al-Askar *et al.*, 2023).

Extrato da casca da romã apresentou atividade contra larvas do terceiro instar de *Culex pipiens*. Tendo uma CL₅₀ de 95,63 ppm em 24 horas. Além disso, o extrato também demonstrou ação repelente contra as fêmeas do mosquito (Farag *et al.*, 2021). Utilizando o pó das folhas de *Punica granatum*, o coleóptero *Acanthoscelides* obteve uma mortalidade de 82,17% após 120 horas de exposição, apresentando uma CL₅₀ de 16,73 g/30 g de feijão branco. Além disso, o pó de *P. granatum* também obteve inibição da oviposição do coleóptero (Mohamed, 2020). Outra ação inseticida da romã foi relatada contra o gorgulho vermelho da palmeira (*Rhynchophorus ferrugineus* O.), o extrato etanólico da casca de *P. granatum* apresentou efeito larvicida e adulticida na concentração de 37,4 mg/ml (El Namaky *et al.*, 2020).

3.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

A avaliação toxicológica em animais é utilizada há muitos anos como uma ferramenta de desenvolvimento e pesquisa de novos fármacos, cosméticos, produtos químicos e alimentos. Muitas moléculas ou substâncias podem ser tóxicas para as pessoas e para outros organismos presentes no mesmo ambiente, por isso, é de extrema importância ter uma avaliação toxicológica prévia da substância. Na natureza vários organismos podem produzir toxinas como um método de defesa ou predação, inclusive as plantas. Com isso, qualquer substância de origem natural que venha a

ser utilizada como um produto precisa ter sua toxicidade avaliada (Sacco *et al.*, 2022).

Foi realizado um estudo toxicológico e antigenotóxico do extrato hidroetanólico da casca do fruto de *Punica granatum in vivo*. O extrato foi administrado via oral em camundongos Swiss em quatro concentrações (87,5; 175; 350 e 700 mg/kg). O extrato causou uma redução na frequência de micronúcleos com uma taxa de redução de até 90,6% em 48 horas na maior concentração. Além disso, nenhuma toxicidade subaguda foi evidenciada e também nenhum efeito genotóxico ou citotóxico (Vale *et al.*, 2020).

Moléculas provenientes da romã também estão sendo estudadas quanto a sua toxicidade, como por exemplo, a lectina PgTeL purificada da sarcotesta da fruta e que apresenta ação antimicrobiana. Como resultado, não houve nenhum dano às membranas dos eritrócitos nas concentrações testadas (3,9 - 1000 µg/mL) de PgTeL. E também não houve anormalidades hematológicas, hemostáticas ou histopatológicas no ensaio de toxicidade aguda (Silva *et al.*, 2022b).

O microencapsulamento do suco da romã por spray *drying* surgiu como uma alternativa para melhorar sua capacidade de armazenamento e para isso foram realizados estudos para saber se existem efeitos tóxicos em ratos Wistar e camundongos CD-1. Nenhuma morte ocorreu nos ratos após a administração de 5000 mg/kg por via oral durante os 14 dias. Do mesmo modo, 3000 mg/kg administrados em camundongos também não apresentaram toxicidade subcrônica por 90 dias. O que ocorreu foi uma diminuição no ganho de peso dos animais, tanto dos ratos, como dos camundongos (Álvarez-cervantes *et al.*, 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1

Efeito do extrato salino de sarcotesta de *Punica granatum* L. no desenvolvimento de *Aedes aegypti* L. (1762).

Juliane Nancy de Oliveira Silva¹, Patryck Ermerson Monteiro dos Santos¹, Lidiane Quérolin Macena da Silva², Alex Michel Silva Araújo², Rômulo Carlos Dantas da Cruz², João Paulo Pimentel de Oliveira Cruz³, Emmanuel Viana Pontual⁴, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Gustavo Ferreira Martins³, Thiago Henrique Napolião¹, Ana Patrícia Silva de Oliveira¹, Thâmarah de Albuquerque Lima¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

⁴Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

Resumo/Abstract

Devido a quantidade de doenças que o *Aedes aegypti* pode transmitir ao humano, é de grande importância para a saúde pública que este inseto seja controlado. A romã popularmente conhecida por suas propriedades médicas no tratamento de diversas doenças, também possui atividades biológicas já estudadas, inclusive a inseticida. Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar a interferência do extrato salino de sarcotesta de *P. granatum* no desenvolvimento de *Ae. aegypti* e observar a ação de enzimas digestivas das larvas, do sistema nervoso e alterações morfológicas no intestino do inseto em cada fase de vida. Foi definido a concentração letal capaz de

matar 50% (CL₅₀) durante a fase larval, e a partir dela foi definido uma concentração subletal onde larvas do *Ae. aegypti* no terceiro estágio entraram em contato com o extrato (5 e 10 %) e logo após 24h foram lavadas e alimentadas para o acompanhamento de seu desenvolvimento, até a fase adulta e contagem dos ovos. Além disso, foi analisada a ação do extrato da romã sobre as enzimas digestivas (amilase e tripsina) e do sistema nervoso (acetilcolinesterase) das larvas do inseto. Foi feita também a análise histológica do intestino de cada fase (larva, pupa e adulto), que foi tratada com o extrato durante a fase larval. Como resultado, a CL₅₀ encontrada para as larvas foi de 12,2%. No teste da ação do extrato da romã no ciclo de vida do *Ae. Aegypti*, foi observada uma diminuição na taxa de desenvolvimento das larvas até a fase adulta para ambas as concentrações testadas. Além disso, na maior concentração, houve uma redução na quantidade de ovos depositados. O extrato também afetou as enzimas, aumentando a atividade da tripsina em 45,8% na maior concentração testada (10%) e inibindo acetilcolinesterase. O extrato também causou alterações morfológicas tanto nas larvas quanto nos adultos. Com isso, concluímos que o extrato da sarcotesta da romã pode ser considerado um inseticida natural, ampliando assim as alternativas de inseticidas para controle do mosquito.

Palavras-chaves: Romãzeira. Mosquito. Inseticida Natural. Histologia.

Introdução

Aedes aegypti é o principal mosquito responsável pela transmissão de doenças como a dengue, ZIKV e CHIKV em vários países, inclusive no Brasil. Devido a sua facilidade de adaptação a ambientes urbanos, esse mosquito se espalhou pelos continentes principalmente em ambientes tropicais e subtropicais (Lima-Camara, 2024). A transmissão dessas doenças ocorre quando a fêmea do mosquito, após se alimentar de sangue de um hospedeiro em fase virêmica, adquire o vírus, que circula e se replica no corpo do inseto até atingir as glândulas salivares. Na próxima alimentação sanguínea, o vírus é transmitido para o humano que não apresentava a doença (Gómez et al., 2022). Por isso, é fundamental o controle populacional do mosquito para que haja a diminuição na transmissão dessas doenças (Heyrani et al., 2024).

Devido aos efeitos adversos em organismos não alvo, há uma preocupação

quanto a utilização de inseticidas sintéticos e um aumento na busca por inseticidas ambientalmente seguros. Esses inseticidas sintéticos afetam não apenas o organismo alvo, mas também os outros seres presentes no ambiente, como predadores, plantas, microrganismos e impacta o ecossistema presente no solo (Mamy et al., 2023; Okagu et al., 2023). Inseticidas botânicos são um exemplo de inseticidas naturais que podem ser utilizados no combate a insetos-praga ou transmissores de doenças, devido a presença de diversos compostos que agem como uma das principais vias de defesa da planta (Wahengbam et al., 2021). Diversos inseticidas botânicos já foram encontrados e identificados e demonstram ação letal contra mosquitos, inibindo o seu desenvolvimento, reprodução e impedindo a oviposição (Demirak e Canpolat, 2022; Botina e Martins, 2024).

Punica granatum, conhecida popularmente como romã, é uma planta cultivada e utilizada desde a antiguidade na região do mediterrâneo e do Norte da África. Ela tem sido estudada por seu histórico na medicina popular, onde o seu consumo foi aplicado ao tratamento de doenças, tais como as do trato digestivo e urinário (Dogara, Hama e Ozdemir, 2024). O fruto de *P. granatum* apresenta múltiplas sementes revestidas por um arilo (sarcotesta), que representa cerca de 40% do seu peso. A romã é rica em polifenóis, os quais são encontrados em uma quantidade significativa, principalmente em seu suco (Moga et al., 2021). A romã apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas a inseticida. O extrato metanólico de suas folhas apresentou atividade contra mosquitos, como *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* (Jebanesan et al., 2021).

Neste presente estudo, extrato da sarcotesta de *P. granatum* foi testado contra larvas de *Ae. aegypti*, e também foi avaliado o seu efeito no desenvolvimento do mosquito. Ainda, foi analisado o efeito do extrato sobre as enzimas das larvas e alterações morfológicas no intestino das diferentes fases de vida do inseto.

Materiais e métodos

Material Vegetal e Preparação do Extrato

O fruto de *P. granatum* foi coletado em Recife, Pernambuco, Brasil, com autorização (nº 36,301) do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio). Após a coleta, os frutos foram passados em peneira (1 mm) para a

separação da sarcotesta (parte comestível) e das sementes, obtendo-se o suco. Em seguida, foi adicionado NaCl 0,15 M em uma proporção 9:1 (suco/NaCl) e homogeneizado em um agitador magnético por 6 h à 25 °C. A mistura foi filtrada e centrifugada a 3000 x g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e considerado como extrato final. Essa metodologia de extração foi baseada no protocolo pré-estabelecido por Silva *et al.* (2016). O estudo foi registrado no Sistema Nacional e Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (nº A5D89BD).

Teste de desenvolvimento do *Aedes aegypti*

Insetos

A colônia do *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) foi mantida no Laboratório de Toxicologia, Departamento de Antibióticos na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os insetos foram mantidos em temperatura ideal de $27 \pm 0,5$ °C, com umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo 12:12 h (claro/escuro).

Ensaio larvicida e determinação da CL₅₀

Os ovos de *Ae. aegypti* foram colocados em água destilada junto com ração de gato (Whiskas®) para a alimentação das larvas. As larvas em estágio L3 foram coletadas para a execução do experimento. O ensaio larvicida foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Navarro *et al.* (2003). As larvas (n=20) foram incubadas com o extrato da romã nas concentrações de 10 a 30%, por tratamento, obtendo um volume final de 20 mL. Após 48h do início do ensaio, a mortalidade das larvas foi observada. Como controle negativo as larvas foram incubadas com 10% de NaCl 0,15 M e água destilada com as mesmas condições.

Ensaio do efeito do extrato de *P. granatum* no ciclo de vida do *Ae. aegypti*

Inicialmente, 20 larvas (L3) de *Ae. aegypti* foram incubadas por 24h com o extrato de *P. granatum* nas concentrações de 5 e 10%. Para o controle, as larvas foram incubadas apenas com água destilada. Em seguida, as larvas vivas foram

lavadas em água destilada (30 mL) e após 10 dias do início do ensaio, o número e o estágio de desenvolvimento de cada indivíduo foi observado. Para cada concentração foram realizadas 10 replicatas. O desenvolvimento do *Ae. aegypti* foi observado até a fase adulta. Os adultos emergidos foram colocados em caixas por 48 h para a cópula e mantidos com solução sacarose 10% (p/v). Após a cópula, foi oferecido para as fêmeas sangue de carneiro desfibrinado para a realização do repasto sanguíneo. Após 72h do repasto sanguíneo, duas fêmeas por replicata foram separadas em potes plásticos (350 mL) contendo papel filtro embebidos em água destilada para a oviposição (Fernandes et al., 2019). Após 5 dias, os ovos foram capturados e contados em estereomicroscópio. Em seguida, os ovos foram colocados em potes plásticos (200 mL) contendo água destilada e ração. A porcentagem de viabilidade dos ovos e número de larvas foi observado.

Efeito do extrato da *P. granatum* na ação das enzimas das larvas

As larvas de *Ae. Aegypti* foram tratadas por 24 h com o extrato da *P. granatum* na concentração de 5 e 10%. Também foram utilizadas larvas do controle, tratadas apenas com água destilada. Em seguida, 50 larvas foram lavadas com água destilada, imobilizadas e maceradas em diferentes tampões. Posteriormente, os homogenatos foram centrifugados (9000 x g, 4 °C) e o sobrenadante foi coletado (extrato larval). O extrato larval teve sua concentração de proteínas determinada de acordo com metodologia estabelecida por Lowry et al. (1951).

O efeito do extrato de *P. granatum* sobre a atividade de tripsina foi determinado de acordo com Kakade et al. (1969). Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato foi adicionado o extrato das larvas (75 µL) em Tris-HCl (0,1 M pH 8,0), 110 µL do tampão Tris-HCL + 15 µL do substrato BapNa (N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida a 8mM). Para o 100% enzimático (controle) foi utilizado o extrato das larvas não tratadas com o extrato de *P. granatum*. Em seguida, as placas foram incubadas na estufa por 60 min (37 °C) e realizada a leitura a 405 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e as absorbâncias foram observadas no tempo 0 e 60 min. Uma unidade de atividade de tripsina foi determinada como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol do substrato (BapNa) por minuto.

O efeito do extrato de *P. granatum* sobre a enzima α -amilase foi realizado de acordo com o método de Bernfeld (1955). O homogenato das larvas previamente

tratadas com o extrato *P. granatum* em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,5) (50 µL), foram incubados a 50 °C por 10 min com 200 µL de amido solúvel 0,1 M (substrato). Para o 100% enzimático foram utilizadas as larvas do grupo controle. Cada teste foi realizado em triplicata. Em seguida, 250 µL de DNS (ácido dinitrosalicílico) foi adicionado à solução e essa foi aquecida a 100 °C por 6 min e rapidamente resfriada em gelo por 15 min. A leitura da absorbância (540 nm) foi realizada e a quantidade de açúcares redutores foi determinada utilizando uma curva padrão de glicose ($y=0,0735x-0,0158$). Uma unidade de atividade de α -amilase foi definida como a quantidade de enzima para produzir 1 µmol de glicose por min.

A análise da ação do extrato de *P. granatum* sobre a atividade da acetilcolinesterase foi realizada de acordo com o método de Ellmam *et al.* (1961). Inicialmente, 10 µL do extrato das larvas em tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 8,0), foi adicionado em placas de 96 com 10 µL do tampão, 20 µL de acetilcolina (0,062 M) e 200 µL de DTNB (0,25 mM), após 3 min de incubação a 25 °C, a absorbância foi analisada a 405 nm. Uma unidade de atividade da acetilcolinesterase foi definida como a quantidade de enzima para converter 1 µmol do substrato por min. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise Histológica

Os intestinos médios das larvas tratadas com o extrato (24h após exposição), pupas (fêmeas e machos) e adultos (fêmeas e machos) que se desenvolveram a partir das larvas tratadas com o extrato, foram dissecados (n=10 para cada estágio de desenvolvimento) e transferidos para solução fixadora (Paraformaldeído 4%). Logo após, as amostras foram retiradas do fixador e lavadas com água deionizadas e em seguida desidratadas em uma série de etanol (30-99%), e embebidas em historesina (Leica Microsystems, Heidelberg Mannheim, Alemanha) e seccionadas (5 µm) em um micrótomo (Reichert Jung 2050). As secções foram coradas com HE (hematoxilina e eosina) para detectar elementos celulares e alterações morfológicas, e em seguida foram examinadas e fotografadas em um microscópio Olympus BX53 acoplado a uma câmera digital Olympus DP 73 (Olympus Optical Co., Tóquio, Japão).

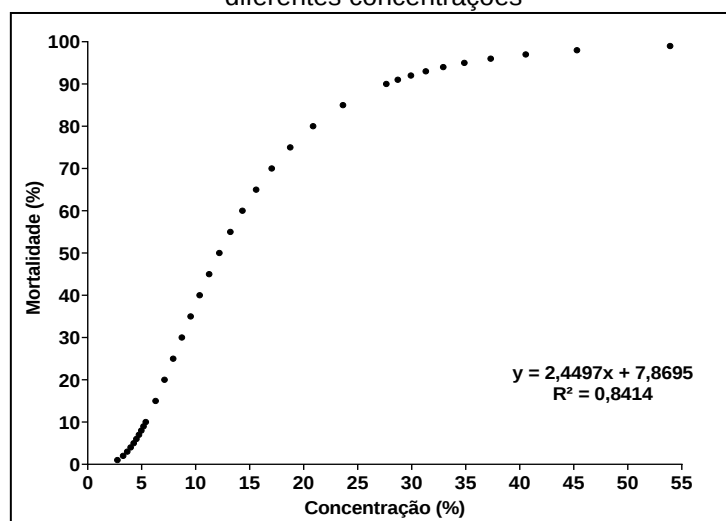
Análise estatísticas

As análises estatísticas foram avaliadas por meio do programa GraphPad Prism v. 8.0 para Windows. A concentração letal de 50% das larvas (CL₅₀) foi calculada via análise de probit com intervalo de confiança de 95% utilizando o software StatPlus (Analystsoft, Walnut, Canadá). Análise de atividade enzimática foi calculada utilizando Teste t de Student (significância de $p < 0,5$) usando programa SPSS Statistics versão 18.

Resultados e Discussões

Devido ao grande impacto dos inseticidas sintéticos ao meio ambiente, como a contaminação dos solos, águas e efeitos sobre organismos não-alvos, é de extrema importância a utilização de inseticidas naturais que reduzam esses impactos e que sejam mais eficazes e específicos. Por isso, a busca por novos bioinseticidas vem crescendo nos últimos anos (Struelens e Silvie, 2020). Diante disso, *Punica granatum* foi testada contra o *Aedes aegypti*, um dos principais transmissores de diversas arboviroses, para avaliar sua eficácia contra esse inseto. Como resultados da atividade larvicida, o extrato de *P. Granatum* apresentou uma CL₅₀ de 12,2 % (figura 1). Outros extratos vegetais também apresentaram atividade larvicida contra o *Ae. Aegypti*, tais como extrato de semente de *Annona squamosa* L, *Tabernaemontana cymosa* Jacq. e *Mammea americana* L., apresentando CL₅₀ de 58,44; 25,02 e 38,58 ppm respectivamente (Oliveros-Diaz et al., 2022).

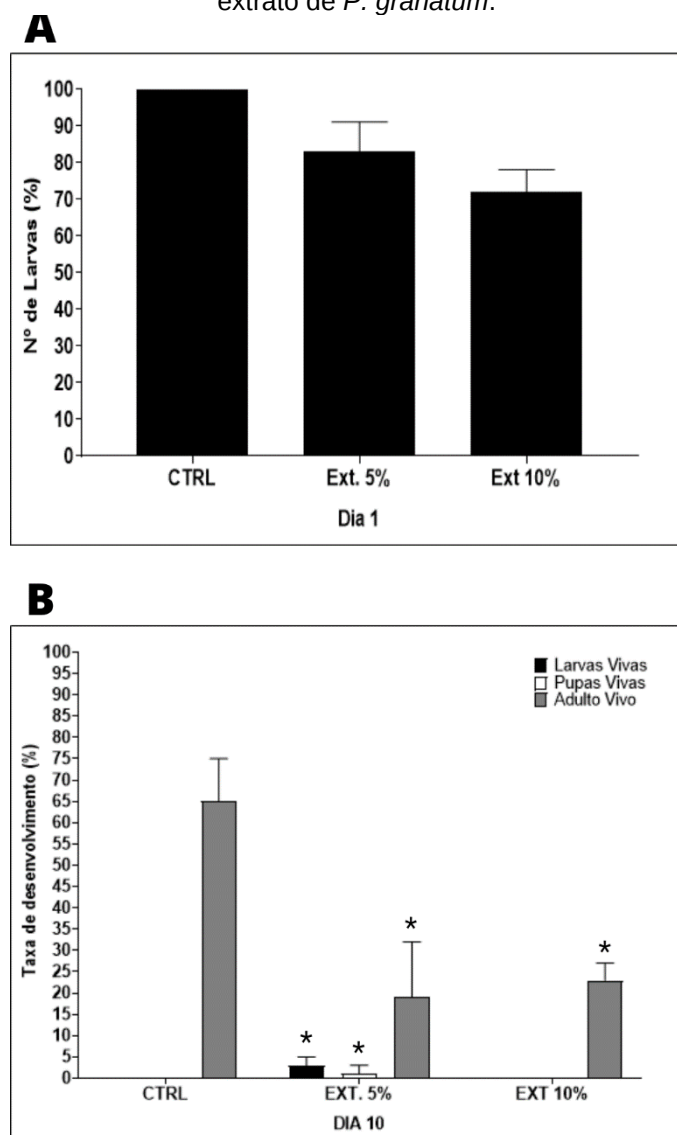
Figura 1 – Curva de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o extrato da romã em diferentes concentrações



Fonte: A Autora (2023)

Na avaliação do efeito do extrato da romã no ciclo de vida do *Ae. aegypti*, foi observado uma diminuição na taxa de desenvolvimento das larvas até a fase adulta (figura 2). Já no primeiro dia de teste (figura 2A), houve redução do número de larvas nas concentrações de 5 e 10%, de 17 e 28%, respectivamente. No décimo dia de análise (figura 2B), o grupo controle apresentou apenas mosquitos adultos, com uma taxa de sobrevivência de 65%. Já o tratamento com extrato de romã a 5% resultou na presença de larvas (3%), pupas (1%) e adultos vivos (19%). O tratamento com extrato de romã 10% apresentou apenas adultos vivos, porém com uma taxa de sobrevivência de 19%.

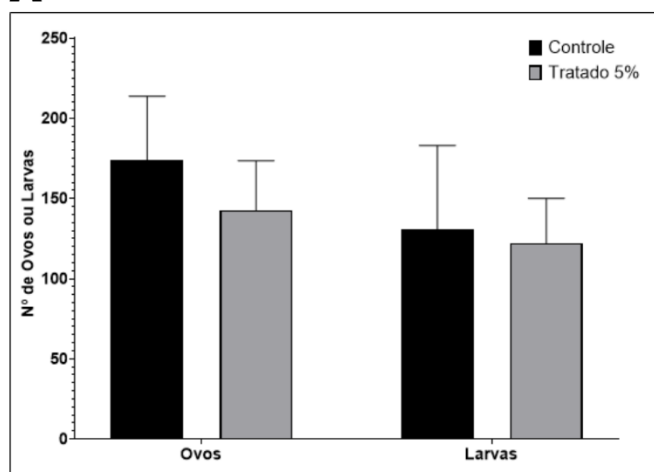
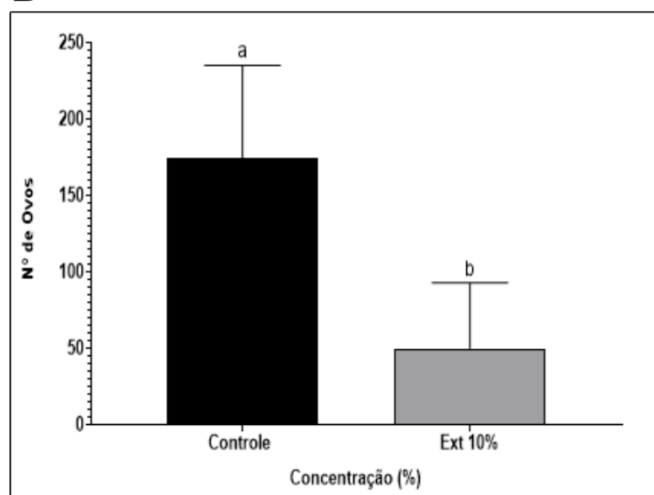
Figura 2 – Taxa de desenvolvimento do *Ae. Aegypti* no dia 1 (A) e dia 10 (B) após o contato com o extrato de *P. granatum*.



Os resultados apontam para um atraso no desenvolvimento do ciclo de vida do vetor e indução de mortalidade de maneira dose dependente, ao longo do período de exposição. Resultados semelhantes foram achados em um estudo feito com extrato aquoso e fração de sementes de *Moringa oleífera*, onde houve um atraso no desenvolvimento das larvas após 9 dias do contato. Além disso, o intestino médio das larvas e pupas tratadas apresentaram desorganização (Silva *et al.*, 2019).

As fêmeas que sobreviveram ao tratamento com o extrato foram alimentadas e, após a oviposição, os ovos foram contados e colocados para eclodir. Como resultado, no tratamento 5%, não foi observada diferença significativa no número de ovos depositados nem no número de larvas eclodidas (figura 3A). Já no tratamento com extrato 10% (figura 3B), foi observada uma diferença significativa na redução do número de ovos depositados. De maneira similar, Silva *et al* (2019) relataram que as fêmeas que se desenvolveram a partir de larvas tratadas com extrato e fração de sementes de *Moringa oleifera* apresentaram um menor número de ovos e taxa de eclosão.

Figura 3 – Contagem do número de ovos e larvas eclodidas do teste de oviposição das fêmeas tratadas com 5% (A) e 10% (B) do extrato no período larval

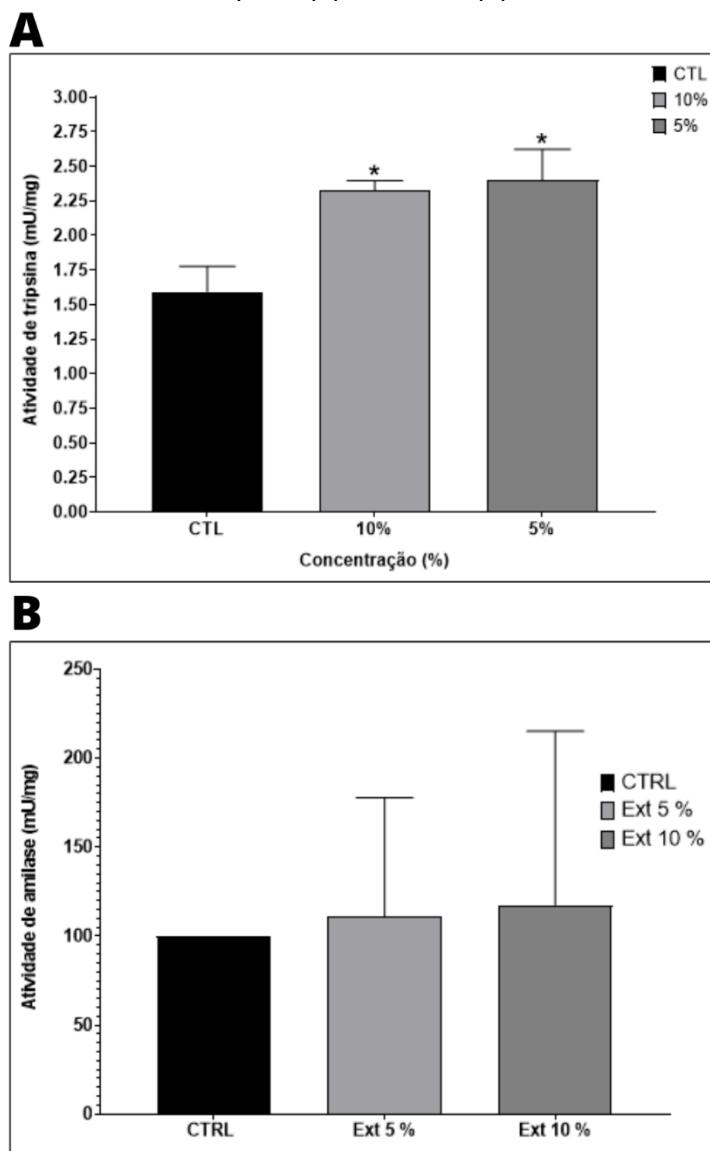
A**B**

Diversos compostos podem influenciar a ação das enzimas de larvas dos insetos, essas alterações podem provocar a mortalidade das mesmas, através de distúrbios alimentares (enzimas digestivas) ou até afetar as enzimas desintoxicantes que são responsáveis por metabolizar um grande número de toxinas em insetos (Chen et al., 2021). Além disso, esses compostos também podem afetar enzimas do sistema nervoso, como por exemplo, a acetilcolinesterase (Georgiev et al., 2022).

Com isso, foi investigada a atividade das enzimas digestivas tripsina e α -amilase, e da enzima do sistema nervoso, acetilcolinesterase, de larvas tratadas com salino de *P. Granatum*. De acordo com o resultado apresentado na figura 4, foi observado que o extrato de romã não alterou a atividade de amilase, porém aumentou significativamente a ação da tripsina em 50,5% e 45,8%, nas concentrações de 5% e 10%, respectivamente, comparado com o controle. Extrato etanólico de sementes de *Anona mucosa* Jacq. apresentou ação contra enzimas digestivas do *Aedes aegypti*,

com uma inibição na ação tanto da protease como da amilase (Rodrigues *et al.*, 2021).

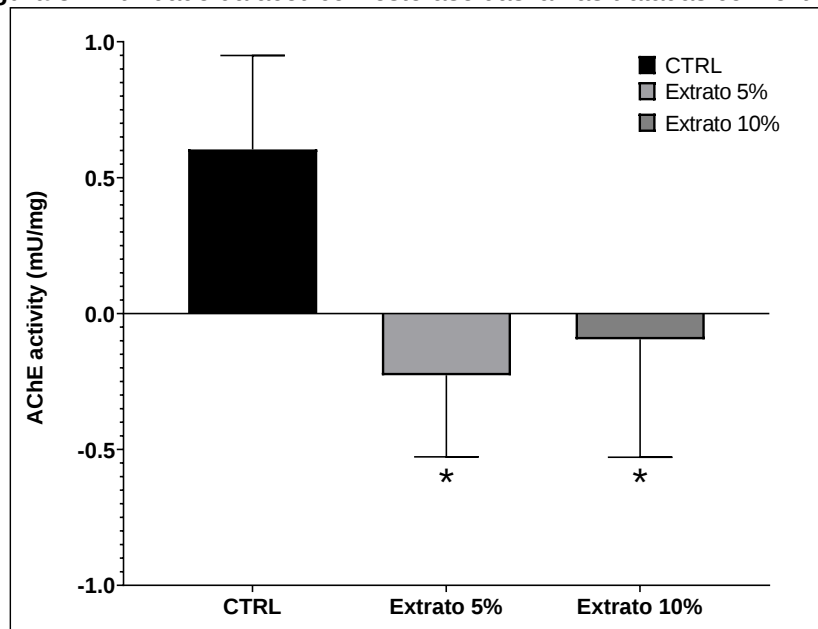
Figura 4 – Atividade das enzimas digestivas da larva tratadas anteriormente com o extrato da romã, tripsina (A) e Amilase (B).



A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que atua no sistema nervoso dos insetos como um condutor neural (Dai *et al.*, 2020). Larvas previamente tratadas com 5% e 10% de extrato da romã, apresentaram inibição na atividade desta enzima (figura 5), o que pode estar associado à mortalidade observada. Outro extrato que causou uma diminuição na atividade da AChE foi o extrato das folhas de *Cymbopogon citratus* e seus compostos bioativos, na concentração de 200 mg/mL testado contra *Drosophila melanogaster* (Johnson *et al.*, 2021). Extrato etanólico de *Artemisia absinthium*, além de apresentar atividade larvívica sobre o *Aedes aegypti* também

inibiu a ação da AchE, o que nos mostra um possível mecanismo de ação desses extratos inseticidas (Sofi *et al.*, 2022).

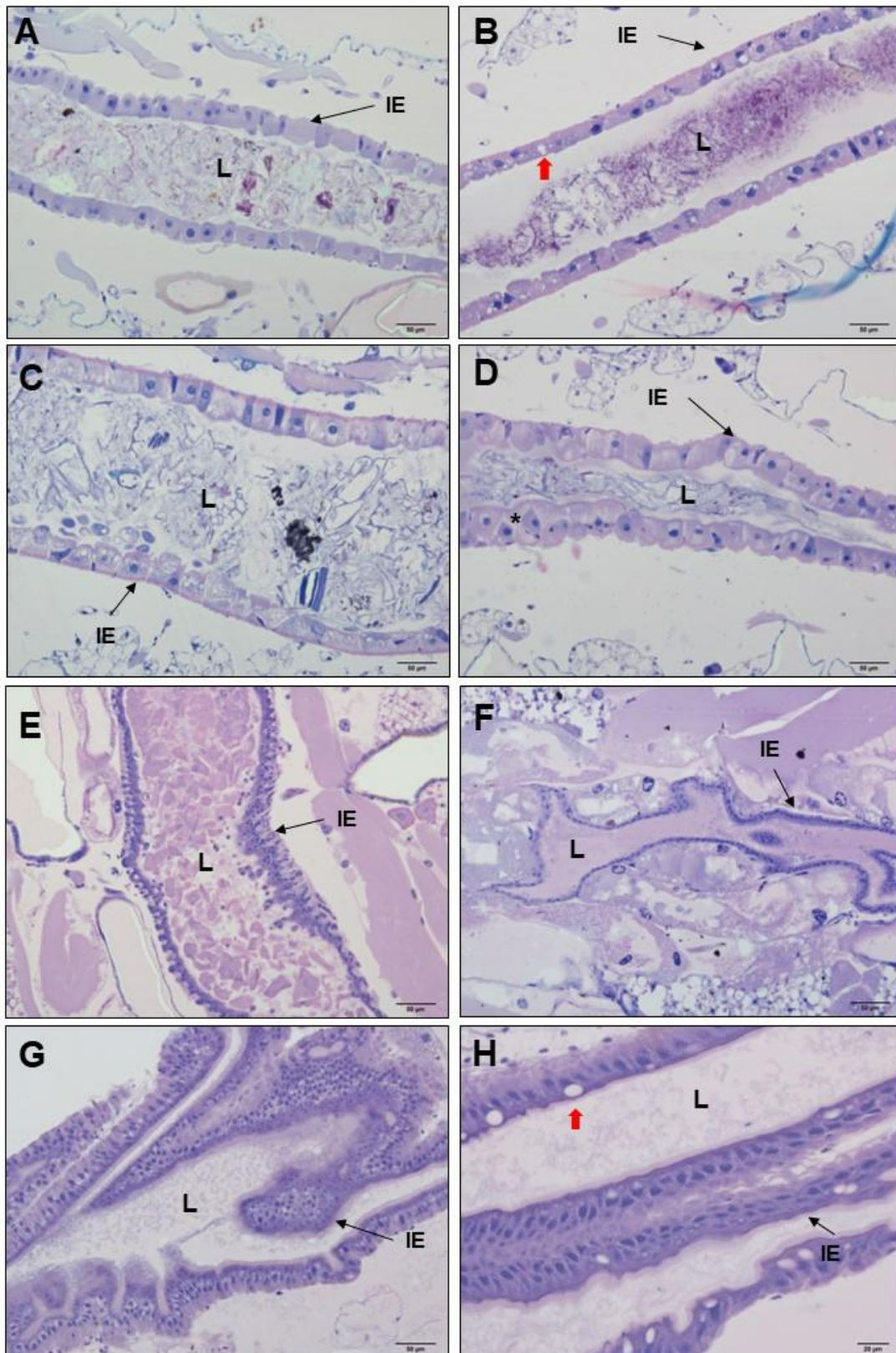
Figura 5 – Atividade da acetilcolinesterase das larvas tratadas com extrato da romã.



A análise histológica é importante para se observar alterações morfológicas no inseto e entender os danos causados pelos inseticidas (Daveci *et al.*, 2021). Como as larvas do mosquito se alimentam de matéria orgânica presentes na água, o intestino é um órgão vital para o desenvolvimento do inseto e com isso se torna importante alvo de estudos (Priya *et al.*, 2023). De acordo com a análise histológica (figura 6), o intestino de larvas na fase L3 de *Ae. aegypti* do grupo controle (6A) e tratados com o extrato de sarcotesta de *P. granatum* na concentração de 5% (6B), foi observado um aumento no número de vesículas ou vacúolos celulares, o que indica que a célula pode estar lesionada ou passando por um estresse devido à presença do extrato, causando uma degeneração celular ou apresentando autofagia celular e acúmulo de lipídios (Inierto *et al.*, 2021). A fase larval L4 é a mais resistente e a mais próxima da pupação (Priya *et al.*, 2023) e, de acordo com os resultados apresentados, foi observado um aumento na espessura do epitélio intestinal e uma desorganização celular, indicando que haja uma maior ativação das células do intestino (Figura 6 C e D). Já nas pupas, não foram observadas alterações entre o grupo controle e o tratado, sendo observada a presença do intestino e sua integridade (Figura 6 E e F). Na fase adulta foi observada a presença de vacúolos celulares presentes no intestino

comparando-se com o grupo controle (Figura 6 G e H), o que pode indicar reflexos na fase adulta das alterações discutidas anteriormente durante a fase larval. Outro extrato que causou danos morfológicos ao *Ae. aegypti* foi o etanólico de *Cyathocline purpurea*, *Blumea lacera*, *Neanotis lancifolia* e *Neanotis montholonii* afetaram a morfologia do intestino de larvas de *Ae. aegypti*, apresentando danos ao epitélio intestinal, perda da integridade celular, e do núcleo de acordo com a concentração de cada extrato, sendo dose dependente (Torawane et al., 2021). Compostos isolados de extratos também são testados em *Ae. aegypti*, como o composto secundário Acetato de Metil Trifenil, isolado de *Artemisia argyi* que causou danos ao intestino das larvas do inseto (Sivasankaran, et al., 2022).

Figura 6. Análise histológica do intestino médio de larva, pupa e adulto de *Ae. Aegypti* tratados com 5% do extrato salino de *P. granatum* durante a fase larval



Corte longitudinal de intestino médio de larvas, pupas e adultos de *Ae. Aegypti* do controle e tratados com extrato de *P. granatum* durante a fase larval, corados com HE (Hematoxilina e eosina). **A** Intestino de larvas no terceiro estágio do controle. **B** Intestino de larvas no terceiro estágio do tratamento com 5% do extrato salino de *P. granatum*, apresentando vacúolos (seta vermelha). **C** Intestino de larvas no

quarto estágio larval do controle precedendo a pupação. **D** Intestino de larvas no quarto estágio tratadas com o extrato durante a L3, apresentando desorganização no epitélio intestinal (*). **E** Intestino de pupa do controle. **F** intestino de pupa tratada com o extrato durante a fase larval. **G** Intestino de mosquito adulto do controle. **H** Intestino do mosquito adulto do tratamento com o extrato durante a fase larval apresentando vacúolos (seta vermelha). L- Lúmen; IE – Epitélio intestinal; setas vermelhas - vacúolos e * desorganização celular.

Conclusão

Extrato de *P. granatum* na concentração de 5% e 10% pode interferir no desenvolvimento do *Ae. aegypti*, não só durante a fase larval, mas também retardando a passagem de fases entre o ciclo de vida do inseto, além de afetar a oviposição de fêmeas previamente tratadas. Isso pode afetar a capacidade de sobrevivência a longo prazo, causando alterações na atividade das enzimas digestivas e do sistema nervoso, além de alterações morfológicas no intestino do inseto em diferentes fases. Sendo assim, o extrato de *P. granatum* pode ser considerado um inseticida natural promissor, com efeito prolongado sobre o *Ae. aegypti* e, portanto, uma nova alternativa sustentável e eficaz no controle populacional do mosquito, minimizando impactos ambientais e riscos à saúde humana.

Agradecimentos

A autora expressa gratidão a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001) pelo suporte financeiro, aos investigadores (BIOPROT, LIEF, LBMI e LabTox). Agradece também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Referências

BERNFELD, P. [17] Amylases, α and β . 1955.

BOTINA, L. L.; MARTINS, G. F. Biological mosquitocidal agents: potential and effects on non-target organisms. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, p. 100567, 2024.

CHEN, Y. 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.

DAI, L. et al. The active compounds and AChE inhibitor of the methanol extract of *Adonis coerulea* maxim against *Psoroptes cuniculi*. **Veterinary Parasitology**, v. 286, p. 109247, 2020.

DEMIRAK, M. Ş. Ş. ; CANPOLAT, E. Plant-based bioinsecticides for mosquito control: Impact on insecticide resistance and disease transmission. **Insects**, v. 13, n. 2, p. 162, 2022.

DEVECI, H. A. et al. An overview of the biochemical and histopathological effects of insecticides. **IntechOpen**, 2021.

DOGARA, A. M.; HAMA, H. A.; OZDEMIR, D. Update on the Potential of *Punica granatum* L. Traditional Uses and Pharmacological Uses: A Review. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2024, n. 1, p. 6523809, 2024.

ELLMAN G.L., COURTNEY K. D., ANDRES V., FEATHERSTONE R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 88, 1961.

FERNANDES, K. M. et al. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. **Chemosphere**, v. 221, p. 464-470, 2019.

GEORGIEV, B. et al. Plant products with acetylcholinesterase inhibitory activity for insect control. **BioRisk**, v. 17, p. 309-315, 2022.

GÓMEZ, M. et al. *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission?. **Parasites & vectors**, v. 15, n. 1, p. 287, 2022.

HEYRANI, A. et al. A comprehensive scoping review of global educational strategies and outcomes in aedes-borne disease control. **Archives of Public Health**, v. 82, n. 1, p. 1-28, 2024.

INIESTO, M. et al. Soft tissue histology of insect larvae decayed in laboratory experiments using microbial mats: Taphonomic comparison with Cretaceous fossil insects from the exceptionally preserved biota of Araripe, Brazil. **Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology**, v. 564, p. 110156, 2021.

JEBANESAN, A. 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**, v. 41, p. 1075-1085, 2021.

JOHNSON, T. O. et al. Biochemical evaluation and molecular docking assessment of *Cymbopogon citratus* as a natural source of acetylcholine esterase (AChE)-targeting insecticides. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 28, p. 101175, 2021.

KAKADE, M. L. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chem.**, v. 46, p. 518-526, 1969.

LIMA-CAMARA, T. N. Dengue is a product of the environment: an approach to the impacts of the environment on the *Aedes aegypti* mosquito and disease cases. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 27, p. e240048, 2024.

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

MAMY, L. et al. Impacts of neonicotinoids on biodiversity: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-36, 2023.

MOGA, M. A. et al. Pharmacological and therapeutic properties of *Punica granatum* phytochemicals: possible roles in breast cancer. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1054, 2021.

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.

OKAGU, I. U. et al. Overhauling the ecotoxicological impact of synthetic pesticides using plants' natural products: a focus on *Zanthoxylum* metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 26, p. 67997-68021, 2023.

OLIVEROS-DIAZ, A. F. et al. Larvicidal activity of plant extracts from Colombian North Coast against *Aedes aegypti* L. mosquito larvae. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 104365, 2022.

PRIYA, S. S. et al. Bioactive molecules derived from plants in managing dengue vector *Aedes aegypti* (Linn.). **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2386, 2023.

RODRIGUES, A. M. et al. Larvicidal activity of *Annona mucosa* Jacq. extract and main constituents rolliniastatin 1 and rollinacin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Industrial Crops and Products**, v. 169, p. 113678, 2021.

SILVA, L. L. S. 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, P. 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.

SIVASANKARAN, K. et al. Larvicidal and pupicidal effect of methyl triphenylacetate on larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). 2022.

SOFI, M. A. et al. Larvicidal activity of *Artemisia absinthium* extracts with special reference to inhibition of detoxifying enzymes in larvae of *Aedes aegypti* L. **Journal**

of King Saud University-Science, v. 34, n. 7, p. 102248, 2022.

STRUELENS, Q.; SILVIE, P. Orienting insecticide research in the tropics to meet the sustainable development goals. **Current opinion in insect science**, v. 40, p. 24-30, 2020.

TORAWANE, S. et al. Screening of some weed extracts for ovicidal and larvicidal activities against dengue vector *Aedes aegypti*. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 82, p. 1-9, 2021.

WAHENGAM, J. et al. Insecticides derived from natural products: diversity and potential applications. **Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture**, p. 403-437, 2021.

4.2 ARTIGO 2

Utilização do suco da romã na alimentação humana e suas atividades biológicas: uma revisão e avaliação da atividade toxicológica aguda do extrato salino de *Punica granatum* L. em camundongos

Juliane Nancy de Oliveira Silva¹, Patryck Ermerson Monteiro dos Santos¹, Matheus Cavalcanti de Barros¹, Emanoelli Vitória da Silva dos Santos¹, Simone da Paz Leôncio Alves², Fabiana Aparecida Cavalcante Silva³, Jacinto da Costa Silva Neto⁴, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Thiago Henrique Napoleão¹, Ana Patrícia Silva de Oliveira¹, Thâmarah de Albuquerque Lima¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

³Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Pernambuco, Brasil

⁴Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

Resumo/Abstract

Punica granatum, conhecida popularmente como romãzeira, é rica em nutrientes e compostos bioativos, sendo amplamente utilizada na alimentação e na medicina popular. No entanto, os níveis de toxicidade e as doses seguras para seu uso ainda não foram claramente definidos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do extrato salino da sarcotesta da romã e discutir a validação do uso popular seguro do suco do fruto da romã como um alimento de alto valor nutricional e com aplicações na medicina popular. A toxicidade aguda do extrato foi avaliada em camundongos fêmeas da linhagem Swiss, monitorados durante 14 dias. Posteriormente, foram realizadas análises bioquímicas, hematológicas, histológicas e hemolítica. Paralelamente, uma revisão sobre os fatores nutricionais e compostos bioativos presentes em *P. granatum* foi conduzida por meio de consultas a bancos de dados, como Google Acadêmico e Science Direct, cujos resultados foram reunidos para análise e discussão. O extrato salino da sarcotesta da romã, na dose de 2000 mg/kg, causou aumento no tamanho do baço e diminuição do peso corporal dos

camundongos. Contudo, não houve alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. *Punica granatum* é conhecida por ser rica em nutrientes e compostos bioativos, cuja concentração pode variar de acordo com a parte da planta, a sazonalidade e o tipo de cultivo. Muitos desses compostos estão distribuídos por toda a planta e apresentam importantes atividades biológicas, como as da punicalagina e do ácido elágico. Com base nos resultados, conclui-se que *P. granatum* é uma planta de elevado potencial funcional. Seu fruto, a romã, possui um extrato salino da sarcotesta atóxico, rico em nutrientes e compostos bioativos com propriedades benéficas para a saúde. O presente estudo reforça o papel de *P. granatum* na alimentação funcional e abre caminho para pesquisas futuras sobre suas aplicações medicinais.

Palavras-chave/Key words: Romã; Nutrientes; Bioativos; Toxicidade; Medicina popular.

Introdução

Devido ao seu elevado potencial biológico e à vasta diversidade existentes no planeta, as plantas têm sido amplamente utilizadas na medicina popular para diversas finalidades, especialmente no tratamento de doenças (Braz et al., 2024). Essas propriedades medicinais às tornam uma importante alternativa terapêutica, atendendo à crescente demanda por soluções naturais que diminuam o uso de substâncias químicas sintéticas, as quais podem ter efeitos adversos sobre o meio ambiente e os organismos vivos (Wei et al., 2023). Diversos estudos já relataram o uso de plantas no tratamento de doenças geniturinárias (Nicerine et al., 2024), doenças respiratórias (Jenipher e Ayyanar, 2024), patologias infecciosas (BA et al., 2024), diabetes mellitus (Obakiro et al., 2023) e até no combate ao câncer (Asiimwe et al., 2023).

Punica granatum L., popularmente conhecida como romã, pertence à família Lythraceae. Originária da Ásia Central e da região do Mediterrâneo, a planta se adaptou a ambientes de clima tropical e temperado (Machado, Ferreira e Soares, 2023). A romã é uma fruta histórica e tem sido utilizada na medicina tradicional há séculos, sendo considerada uma "farmácia natural" devido às suas atividades biológicas comprovadas (Moradnia et al., 2024). Relatos indicam o uso de todas as partes da romã para tratar diversas condições, como diarreia, vermes intestinais,

infecções microbianas, acidose e úlceras (Ge et al., 2021; El Hosry et al., 2023).

Uma das formas de consumo da romã é por meio da extração do suco de sua polpa, utilizado tanto no processamento de alimentos quanto no consumo direto (Cheng et al., 2023). Esse suco é rico em vitamina C e é uma fonte significativa de compostos bioativos, como punicalagina e ácido elágico. Além disso, minerais como potássio, cálcio, fósforo e zinco também foram identificados em sua composição (Maphetu et al., 2022). Estudos confirmam que a romã apresenta diversas atividades biológicas, como ações antimicrobiana (Kachkoul et al., 2023; Saini et al., 2023), antioxidante (Sihag et al., 2022), anti-inflamatória (Namdar et al., 2023), antitumoral (Yu et al., 2023), antiparasitária (Yang et al., 2022) e antinociceptiva (Solano et al., 2021).

Por meio de reações bioquímicas, as plantas também podem produzir toxinas naturais, os metabólitos secundários, que atuam como ferramentas de defesa contra outros organismos. Essas biomoléculas, no entanto, podem causar efeitos adversos à saúde humana e animal, incluindo danos a órgãos, morte celular, inflamação, estresse oxidativo e até óbito. Por esse motivo, é fundamental realizar estudos que avaliem a toxicidade dessas substâncias naturais, considerando seus potenciais impactos negativos (Nwaji et al., 2022; Ehtiati et al., 2023).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão do estado da arte sobre a utilização do fruto da romã na alimentação e demonstrar a segurança de uso de seu suco por meio de testes de toxicidade aguda.

Materiais e métodos

Pesquisa Bibliográfica

Neste estudo, foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre a utilização da romã na alimentação humana e suas principais atividades biológicas. Para isso, foram utilizados os bancos de dados “Science Direct” e “Google Scholar”, com palavras-chave como “*Punica granatum*”, “pomegranate”, “Biological activity of Pomegranate”, “ethnobotanical of *Punica granatum*” e “pomegranate nutritional value”. As informações obtidas foram organizadas em tabelas e discutidas de forma textual.

Animais

Os camundongos fêmeas da linhagem Swiss (n=10) foram obtidos por meio do Instituto Keizo Asami (iLIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais, com 60 dias de idade e pesando entre 25 e 30 g, foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de 22 °C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro e acesso ad libitum a dieta padrão. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, sob o número de processo 0081/2023.

Ensaio de Toxicidade aguda

O ensaio foi conduzido conforme o protocolo da OECD (2002). Para cada tratamento, foram utilizadas três fêmeas. O extrato de *Punica granatum*, liofilizado, foi diluído em solução de soro fisiológico nas dosagens de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg, sendo administrado por gavagem.

Após a administração, o comportamento dos camundongos foi observado por duas horas e comparado com os animais do grupo controle, que receberam apenas solução de soro fisiológico. Após esse período inicial, foram oferecidas água e ração, monitorando-se o consumo e o peso corporal ao longo de 14 dias.

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cetamina (77,3 mg/kg) e xilazina (13,3 mg/kg). O sangue foi coletado para análises bioquímicas e hematológicas, e alguns órgãos (baço, coração, fígado, pulmões e rins) foram coletados e pesados para posterior análise histológica.

Análise hematológica

Um tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foi homogeneizado com o sangue coletado dos animais. Em seguida, as amostras foram analisadas utilizando um analisador hematológico automático MaxCell Vet 500 D e um microscópio óptico Olympus. Os parâmetros avaliados incluíram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, além da contagem total e diferencial de leucócitos.

Análise Bioquímicas

Em outro tubo contendo gel separador, foi adicionado o restante do sangue coletado de cada animal. As amostras foram submetidas à centrifugação (822 x g por 10 minutos) para a separação do soro. Utilizando o soro obtido após a centrifugação, foram analisados os seguintes parâmetros por meio de kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) em um analisador automático COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics): proteínas totais, glicose, ureia, creatinina, bilirrubina, colesterol total, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Análise histológica

Os órgãos retirados dos animais tratados e do controle foram fixados em formalina (10%,v/v), e logo após desidratadas com etanol, diafanizadas em xilol e emersas em parafina. Em seguida, utilizando um micrótomo foram obtidos cortes histológicos (5 μ m) e corados com hematoxilina-eosina. Histopathological analysis was performed using ZEN blue edition ©Carl Zeiss Microscopy GmbH image capture system and Axio Zeiss microscope® (Ibrahim et al., 2018).

Atividade Hemolítica

Para a realização do ensaio hemolítico, o sangue foi coletado de um camundongo por punção da veia hepática e depositado em tubos contendo EDTA. Os eritrócitos foram lavados com solução de soro fisiológico a 0,9%. Em seguida, uma suspensão de eritrócitos (1,1 mL) foi incubada a 37°C por 2 horas com a amostra (400 μ L) diluída em série (31,25–1.000 μ g/mL). Saponina (2,5–50 μ g/mL) e soro fisiológico foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (1.000 g, 5 minutos), e o sobrenadante (200 μ L) foi transferido para uma placa de 96 poços para determinação da absorbância a 540 nm em leitor de microplacas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata, e a concentração efetiva capaz de resultar em 50% de hemólise (EC50) foi calculada com base nas observações comparadas aos controles.

Análises estatísticas

Para a análise dos dados de toxicidade aguda, os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. A normalidade foi avaliada previamente pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando o Teste t não pareado com correção de Welch, por meio do software Prism GraphPad 7.0. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

No caso da atividade hemolítica, os dados também foram representados como média $\pm$ SEM. A concentração efetiva capaz de causar 50% de hemólise (EC50) foi determinada por regressão não linear, empregando o software Prism GraphPad 7.0.

Resultados e Discussões

Informação nutricional da romã

As plantas produzem uma ampla gama de compostos bioativos, conhecidos como fitoquímicos, capazes de regular processos metabólicos e oferecer benefícios à saúde quando integrados à dieta regular (Ranjha et al., 2021). Entre essas plantas, a romã (*Punica granatum* L.) se destaca mundialmente por suas propriedades medicinais notáveis. Graças à sua composição química, a romã tem sido amplamente investigada, visando comprovar seu potencial na prevenção de doenças, redução do estresse oxidativo e como um suplemento alimentar saudável (Haghighian et al., 2021; Shaikh e Bhandary, 2021).

A composição química da romã pode variar de acordo com o clima, o tipo de cultivo e a região onde é produzida (Coronado-Reyes, Cortes-Penagos e González-Hernández, 2021). Contudo, é amplamente reconhecida como uma rica fonte de compostos fenólicos, especialmente os taninos hidrolisáveis, como os elagitaninos, sendo a punicalagina o principal representante. Além disso, a romã contém flavonoides, magnésio, potássio e ferro (Eghbali et al., 2021). Um estudo realizado com 14 variedades de romã na Flórida, por meio de Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC), identificou 14 compostos fenólicos. A punicalagina foi o principal composto no suco, enquanto os ácidos elágico e gálico predominaram na casca (Shahkoomahally et al., 2023).

O suco da romã, extraído do arilo (parte comestível), representa

aproximadamente 52% do peso total do fruto. Seu consumo é amplamente recomendado devido à alta concentração de compostos bioativos que promovem benefícios à saúde. O arilo é uma estrutura polposa que envolve a semente, sendo composto majoritariamente por açúcares, água e pectinas. Além disso, é fonte de minerais, como potássio, fósforo, cálcio, ferro e zinco, bem como fibras e vitamina C (Valero-Mendoza et al., 2023; Ullah et al., 2023). Outros componentes presentes no suco incluem ácidos orgânicos, como o ácido málico e o ácido cítrico, além de taninos hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides (Hegazi et al., 2021; Topalovic et al., 2021).

A casca da romã é amplamente utilizada na medicina popular devido à sua composição rica em compostos bioativos, que apresentam maior concentração em relação à parte comestível do fruto. Com um elevado teor de fibras alimentares (33–62%), a casca contribui para a saúde do sistema digestivo. Também contém vitaminas (C, B1 e B2), esteróides, alcaloides e polifenóis (Mo et al., 2022; Siddiqui, Singh e Nayik, 2024). A composição e a quantidade desses nutrientes podem variar conforme as condições de cultivo e o estágio de maturação da fruta. Minerais como potássio, cálcio, fósforo e sódio também são encontrados na casca. Entre os compostos bioativos, destaca-se a punicalagina, o tanino hidrolisável mais abundante, que apresenta diversas propriedades biológicas, incluindo forte ação antioxidante (Kaderides et al., 2021; Sarkar, Haque e Alam, 2024).

As sementes da romã também contêm compostos bioativos que trazem benefícios à saúde. Assim como a casca, possuem uma quantidade significativa de fibras brutas (27–43%), além de proteínas, carboidratos e minerais, como potássio, cálcio, sódio, magnésio e manganês. As sementes também são ricas em vitaminas solúveis em água, como a vitamina C, tiamina e riboflavina, e em vitaminas lipossolúveis, como a vitamina E (Fourati et al., 2020; Yamini et al., 2023).

Atividades Biológicas da romã

A *P. granatum* possui diversas atividades biológicas comprovadas através de diferentes estudos. Essas atividades já foram encontradas não apenas no suco da fruta, mas também em várias partes das plantas, como está listada na tabela 1. Foi visto que a romã possui atividade antioxidante, antimicrobiana, anticâncer e anti-inflamatória, e que esses estudos se concentram em sua maioria na casca do fruto.

Tabela 1 – Atividade biológica da *P. granatum* em suas diferentes partes

Parte da Planta	Tipo de Material	Atividade Biológica	Referência
Casca da romã	Extrato aquoso e etanólico	Antioxidante (90% de inibição DPPH), antibacteriana (<i>Escherichia Coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i>).	Kupnik et al., 2021
	Extrato rico em antocianinas	Ação inibitória na proliferação de células cancerígenas (HCT-116, MCF-7 e HepG2).	Abdelrahman et al., 2024.
	Biossíntese de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs)	Atividade antibacteriana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> e <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (MIC 250 µg/mL, 125 µg/mL, 31,2 µg/mL e 15,6 µg/mL respectivamente).	Chamkouri, Jomehzadeh e Naserzadeh, 2023.
	Extrato aquoso e etanólico	Atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> e <i>S. aureus</i> resistente à metilina.	Feng et al., 2022.
	Compostos fenólicos isolados	Atividade antioxidante DPPH, atividade antimicrobiana contra <i>Candida albicans</i> e <i>E. Coli</i> , e atividade antitumoral fraca em células Hela.	Ruan et al., 2022.
	Extrato aquoso	Atividade antifúngica contra <i>Phytophthora cinnamomi</i> e <i>Penicillium digitatum</i> ; Atividade antibacteriana contra <i>E. Coli</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Bacillus megaterium</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> ; E atividade antiacetilcolinesterase.	Elshafie et al., 2021

	Extrato utilizando água, etanol, acetona ou heptano	Extrato etanólico conseguiu apresentar uma atividade antimicrobiana mais significativa, atingindo um total de 10 bactérias gram-positivas, duas bactérias gram-negativas e uma cepa de levedura.	Gosset-Erard et al., 2021
	Extrato aquoso ou extrato junto com íon metálico de Zinco	Atividade antimicrobiana contra <i>Micrococcus luteus</i> , onde exerceu tanto a diminuição em seu crescimento, quanto na formação de biofilme, não só o extrato sozinho, mas principalmente junto com o íon metálico de zinco.	Celiksoy et al., 2021.
Suco da romã	Suco da romã fermentado com <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> (CRL2051 e CRL2030)	Melhora significativa no perfil sérico de glicose e triglicerídeos (diminuindo 40% e 48% respectivamente), e neutralizou o ganho de peso corporal.	Isas et al., 2023.
Semente	Óleo prensado a frio	Reduziu os níveis de oxidante total, o fator Kappa B, as citocinas pró-inflamatórias e a ação da mieloperoxidase, além de reduzir a lesão no cólon de ratos machos Sprague-Dawley.	Koyuncu et al., 2024
	Extrato etanólico	Suturas de seda e Vicryl foram revestidas com o extrato e foi visto que apresentou boa resistência à tração e atividade antimicrobiana, além de aumentar o potencial do processo de cicatrização de feridas.	Rexlin et al., 2024
Flores	Extrato etanólico	Exerceu algum efeito inibitório sobre a bactéria <i>Streptococcus mutans</i> e apresentou atividade antioxidante (DPPH, ABTS e radical dotO2).	Wu et al., 2021

Folhas	Extrato enriquecido com flavonoides oligômeros totais (TOFs)	Apresentou atividade contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>E. Coli</i> , além de apresentar efeito sinérgico com amoxicilina contra ambas as cepas resistentes à penicilina.	Trabelsi et al., 2020.
--------	--	---	------------------------

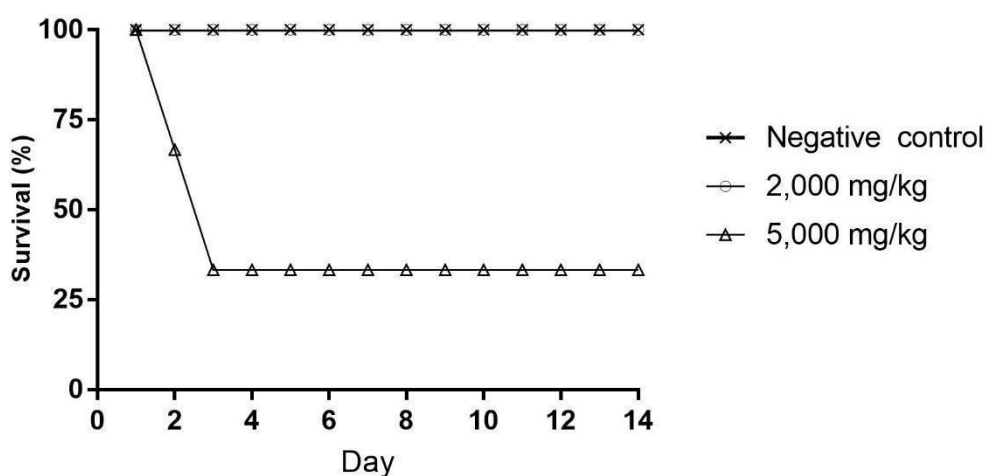
Toxicidade aguda

Para prevenir possíveis danos a organismos não alvo, é essencial que novas substâncias sejam submetidas a testes toxicológicos. Esses testes permitem determinar, de forma *in vivo*, diversos mecanismos responsáveis pelos efeitos de intoxicação (Sacco et al., 2022).

Nesse contexto, foi realizado um estudo de toxicidade aguda do extrato da sarcotesta da romã em camundongos Swiss. A curva de sobrevivência (Figura 1) demonstra que o tratamento oral com 2.000 mg/kg do extrato não causou morte nos animais durante os 14 dias de observação, resultando em 100% de sobrevivência, semelhante ao observado no grupo controle negativo. Entretanto, o tratamento com 5.000 mg/kg apresentou uma taxa de sobrevivência de apenas 33,3%.

Com base nesses resultados, estima-se que a dose letal mediana (DL50) do extrato situe-se entre 2.000 e 5.000 mg/kg. De maneira semelhante, um estudo anterior avaliou a toxicidade do suco de *Punica granatum* microencapsulado por spray em ratos Wistar e camundongos CD-1. Todavia nesse estudo, não foram registradas mortes após administração oral de 5.000 mg/kg em ratos e 3.000 mg/kg em camundongos (Álvarez-Cervantes et al., 2021).

Figura 1 – A curva de sobrevivência apresenta os dados obtidos ao longo de 14 dias de observação, comparando o grupo controle com os grupos tratados oralmente com uma dose única (2.000 ou 5.000 mg/kg) de extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum*.



Com base nos parâmetros avaliados de consumo de água, alimento e ganho de peso corporal dos camundongos (Tabela 2), observou-se uma redução no peso corporal dos animais tratados em comparação com o grupo controle negativo. Além disso, os animais tratados apresentaram menor consumo diário de água e alimento em relação ao controle. De maneira semelhante, estudos prévios demonstraram que o suco de romã microencapsulado também resultou em redução de peso corporal em ratos e camundongos (Álvarez-Cervantes et al., 2021).

Tabela 2 – Consumo médio diário de água (mL/animal), consumo de alimento (g/animal) e ganho de peso corporal (g) dos camundongos pertencentes ao grupo controle e ao grupo tratado oralmente com uma dose única de 2.000 mg/kg de extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum*.

Parâmetros		CN	2,000 mg/kg
Peso (g)	Inicial	33.67 ± 0.58	32.67 ± 0.58
	Final	36.0 ± 1.0	30.67 ± 1.53*
Consumo de água (mL/animal/dia)		6.21 ± 1.45	5.75 ± 2.29
Consumo de alimento (g/animal/dia)		4.82 ± 0.9	3.23 ± 1.67*

Valores correspondem a média ± SEM (n = 3/grupo). CN: Controle Negativo. *p < 0,05 em relação ao controle negativo

Na análise do peso relativo dos órgãos de cada animal (Tabela 3), foi observado um aumento significativo no peso do baço em comparação com o grupo controle. Em estudos anteriores, o extrato hidroetanólico da casca de *Punica granatum* L., testado em diferentes concentrações (87,5 – 700 mg/kg) em camundongos Swiss, não demonstrou toxicidade subaguda. Entretanto, na maior concentração administrada a longo prazo, foi evidenciada uma leve toxicidade histopatológica nos tecidos do baço, coração e rins (Vale et al., 2020).

Tabela 3 – Avaliação do peso relativo (mg/g de peso corporal animal) de camundongos controle ou tratado por via oral com dose única (2.000 mg/kg) de extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum*

Orgãos (mg/g)	CN	2,000 mg/kg
Fígado	49.89 ± 7.47	47.05 ± 6.10
Rim	13.05 ± 2.05	12.48 ± 0.83

Baço	4.72 ± 0.68	11.09 ± 3.54*
Coração	4.74 ± 0.37	4.85 ± 0.35
Pulmões	6.83 ± 0.49	7.51 ± 0.77

Valores correspondem a média ± SEM (n = 3/grupo). CN: Controle Negativo. *p < 0,05 em relação ao controle negativo

Para avaliar o estado geral de saúde dos animais e a funcionalidade de seus órgãos, é fundamental analisar os parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue (Costa et al., 2020). No presente estudo, os parâmetros hematológicos (Tabela 4) e bioquímicos (Tabela 5) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados e controle, indicando que o extrato não provocou danos relevantes ao organismo dos animais.

Resultados semelhantes foram observados com a lectina (PgTeL) isolada da sarcotesta da romã, que não causou alterações hematológicas, mas promoveu um aumento nos níveis de HDL e reduziu os níveis de triglicerídeos, LDL e VLDL (Silva et al., 2022a). Além disso, outros extratos de *P. granatum*, como os obtidos da casca da planta (em água, metanol, acetona e clorofórmio), também não apresentaram toxicidade em camundongos (Laaraj et al., 2022).

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos dos camundongos do controle negativo ou tratado oralmente com a dose única (2.000 mg/kg) de extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum*

Parâmetros	CN	2,000 mg/kg
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	7.30 ± 0.86	7.75 ± 0.21
Hematócrito (%)	36.37 ± 3.79	38.82 ± 1.76
Hemoglobina (g/dL)	11.97 ± 1.31	12.76 ± 0.54
VCM (fL)	49.90 ± 0.78	50.08 ± 1.86
HCM (pg)	16.43 ± 0.25	16.46 ± 0.62
CHCM (%)	32.90 ± 0.26	32.88 ± 0.41
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	3.73 ± 1.16	5.80 ± 1.13
Linfócitos (%)	74.00 ± 3.46	80.67 ± 7.37
Segmentados (%)	26.00 ± 3.46	17.67 ± 6.66

Monócitos (%)	0.0 ± 0.0	0.33 ± 0.58
Macrófagos (%)	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.0
Eosinófilos (%)	0.0 ± 0.0	0.33 ± 0.58
Plaquetas (10 ⁶ /mm ³)	1.00 ± 0.15	0.82 ± 0.12

VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. Valores correspondem a média ± SEM (n = 3/grupo). CN: Controle Negativo. *p<0,05 em relação ao controle negativo.

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos do controle negativo ou tratado via oral com dose única (2.000 mg/kg) de extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum*.

Parâmetros	CN	2,000 mg/kg
Proteína Total (g/dL)	4.63 ± 0.03	4.81 ± 0.23
Glicose (mg/dL)	116.30 ± 36.57	145.50 ± 22.27
Triglicerídeos (mg/dL)	135.80 ± 11.17	138.9 ± 28.55
CT (mg/dL)	165.90 ± 33.82	134.70 ± 14.6
ALT (U/L)	28.18 ± 5.5	27.3 ± 11.18
AST (U/L)	42.24 ± 15.9	56.23 ± 4.41
Creatinina (mg/dL)	0.0 ± 1.16	0.0 ± 0.68
Ureia (mg/dL)	57.03 ± 1.46	59.1 ± 2.52
Bilirrubina (mg/dL)	1.81 ± 0.09	1.83 ± 0.09

CT: Colesterol total; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase. Os valores correspondem a média ± SEM (n = 3/grupo). CN: Controle Negativo.

Os testes hemolíticos realizados indicaram que nenhuma das concentrações testadas do extrato salino da sarcotesta de *Punica granatum* promoveu hemólise (EC₅₀ > 1000 µg/mL). Como controle positivo, a saponina apresentou um EC₅₀ de 16,93 ± 0,26 µg/mL. Segundo Costa-Lotufo et al. (2005), extratos vegetais com EC₅₀ inferior a 200 µg/mL são considerados hemolíticos. Assim, os resultados obtidos demonstram que a preparação não possui potencial hemolítico. De maneira similar, a fração da sarcotesta rica em lectina também não apresentou toxicidade hemolítica

nem aguda em camundongos (Coelho et al., 2024).

A análise histológica dos tecidos dos camundongos tratados (Figura 2) revelou a preservação estrutural nos tecidos do coração e pulmão, comparável ao controle. No entanto, alterações leves foram identificadas no fígado, rins e baço. No fígado, observou-se infiltrados perisinusoidais leves; nos rins, variação no espaço de Bowman; e no baço, aumento dos componentes da polpa branca, com redução dos seios esplênicos. Esses achados corroboram com os resultados de segurança obtidos anteriormente.

De forma comparativa, o extrato etanólico do fruto de *Cyanometra cauliflora* também apresentou alterações histopatológicas leves no fígado e rins de camundongos ICR machos tratados oralmente com concentrações entre 100 e 400 mg/kg (Somsap et al., 2024).

O baço, como órgão essencial do sistema linfático e importante local de produção de sangue, é suscetível a alterações como a esplenomegalia, que pode ocorrer por fatores fisiopatológicos ou pelo aumento de sua função (hiperplasia e hipertrofia). Infecções, processos inflamatórios e até medicamentos podem influenciar no tamanho do órgão. Por exemplo, a oxaliplatina, utilizada no tratamento de câncer colorretal, induziu esplenomegalia em camundongos, mas houve normalização do tamanho do órgão após 101 dias de tratamento (Aldulaimi e Mendez, 2021; Less et al., 2020).

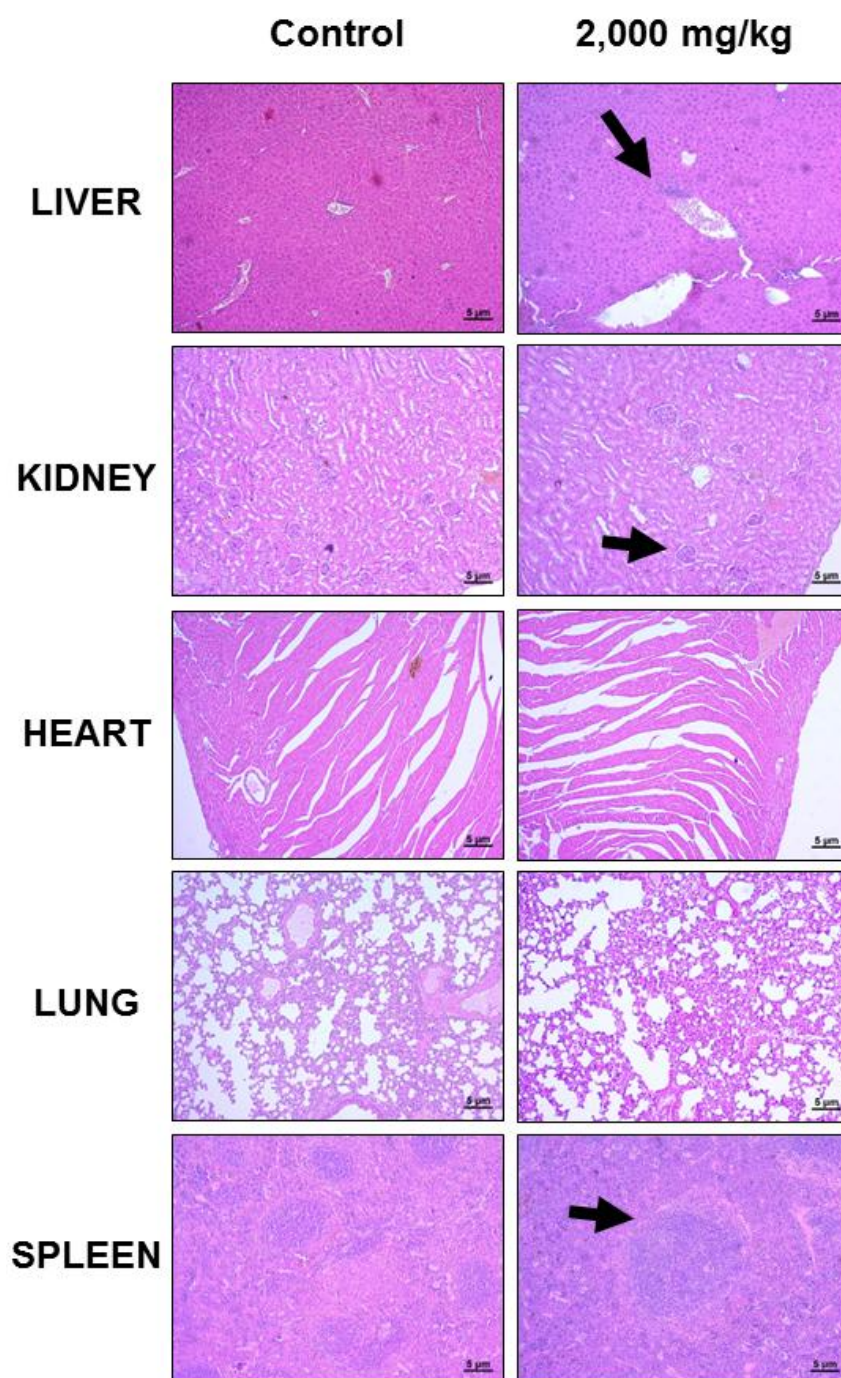


Figura 2. Fotografias microscópicas mostrando fígado, rim, coração, pulmão e baço de camundongos fêmeas do grupo controle e tratadas com 2,000 mg/kg de extrato de *Punica granatum*. Fígado: Estrutura tissular epática típica, ausência de esteatose e infiltrados inflamatórios (Controle). Infiltrado perisinusoidal leve (seta preta). Rim: Estrutural renal, incluindo compartimento glomerular, tubular, vascular e intersticial preservados. Ausência de modificações no espaço de Bowman e infiltrados (controle). Estrutura nefrótica com variação no espaço de Bowman (seta preta). Coração: Estrutura de endocárdica e miocárdica preservadas, com fibras musculares cardíacas típicas e ausência de infiltrados inflamatórios. Pulmão: Amostra com representação de bronquíolos terminais e alvéolos com características histológicas típicas. Baço: Estruturalmente preservado sem modificações histomorfológicas, incluindo cápsula, polpa branca e vermelha preservadas. Ausência de processos congestivos e reatividade e macrófagos típicos (controle). Baço com hiperplasia de componentes da polpa branca com diminuição dos seios esplênicos (seta preta).

Conclusão

Concluimos que o extrato da romã é uma fonte rica em nutrientes, com potencial para diversas atividades biológicas, devido à presença de inúmeros compostos bioativos. Entre os principais compostos encontrados em diferentes partes da planta, destacam-se os taninos hidrolisáveis, o ácido elágico, além de minerais, vitaminas e fibras alimentares.

A análise de toxicidade *in vivo* revelou que o extrato apresenta certa toxicidade, evidenciada por alterações histológicas no fígado, rins e aumento no tamanho do baço. Apesar dessas alterações, não foram observados óbitos nos camundongos, e os parâmetros bioquímicos e hematológicos permaneceram inalterados. Esses resultados sugerem que o extrato da romã pode ser utilizado como uma fonte promissora de compostos bioativos, desde que sejam realizadas mais investigações para confirmar sua segurança em diferentes contextos.

Agradecimentos

A autora expressa gratidão a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001) pelo suporte financeiro, aos investigadores (BIOPROT, CETENE, LACM, LIEF). Agradece também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Referências

ABDELRAHMAN, K. N. et al. Anthocyanins from Pomegranate Peel (*Punica granatum*), Chili Pepper Fruit (*Capsicum annuum*), and Bougainvillea Flowers (*Bougainvillea spectabilis*) with Multiple Biofunctions: Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer. **Heliyon**, 2024.

ALDULAIMI, S.; MENDEZ, A. M. Splenomegaly: diagnosis and management in adults. **American Family Physician**, v. 104, n. 2, p. 271-276, 2021.

ÁLVAREZ-CERVANTES, P. et al. Subacute and subchronic toxicity of microencapsulated pomegranate juice in rats and mice. **Toxicology Research**, v. 10, n. 2, p. 312-324, 2021.

ASIIMWE, J. B. et al. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the management of cancer in Uganda. **Journal of Herbal Medicine**, v. 42, p. 100808, 2023.

BA, A. et al. Antibacterial and anti-coronavirus investigation of selected Senegalese plant species according to an ethnobotanical survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 328, p. 118070, 2024.

BRAZ, D. M. et al. Folk medicine, biological activity, and chemical profiles of *Brazilian Acanthaceae* (Lamiales)-A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 327, p. 117980, 2024.

CELIKSOY, V. et al. Synergistic in vitro antimicrobial activity of pomegranate rind extract and zinc (II) against *Micrococcus luteus* under planktonic and biofilm conditions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 851, 2021.

CHAMKOURI, N.; JOMEHZADEH, N.; NASERZADEH, N.. Rapid biosynthesis and antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles using fruit peel of *Punica granatum* L as cellulose. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 6, p. 100366, 2023.

CHENG, J. et al. Bioactive compounds and health benefits of pomegranate: An updated narrative review. **Food Bioscience**, p. 102629, 2023.

COÊLHO, L. V. A. et al. Evaluation of cytotoxicity, acute toxicity, genotoxicity and antioxidant and antigenotoxicity activities of the sarcotesta fraction of *punica granatum* L. rich in lectin (PgTel). **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part A, v. 87, n. 14, p. 592-603, 2024.

CORONADO-REYES, J. A.; CORTES-PENAGOS, C. J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*): a review. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e29420, 2021.

COSTA, W. K. et al. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112059, 2020.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 21-30, 2005.

EGHBALI, S. et al. Therapeutic effects of *Punica granatum* (pomegranate): an updated review of clinical trials. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2021, 2021.

EHTIATI, S. et al. Promising influences of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against natural and chemical toxins: A comprehensive and mechanistic review. **Journal of Functional Foods**, v. 107, p. 105637, 2023.

EL HOSRY, L. et al. Phytochemical composition, biological activities and antioxidant potential of pomegranate fruit, juice and molasses: A review. **Food Bioscience**, p. 103034, 2023.

ELSHAFIE, H. S. et al. Study of bio-pharmaceutical and antimicrobial properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) leathery exocarp extract. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 153, 2021.

FENG, Y. et al. Compositions and biological activities of pomegranate peel polyphenols extracted by different solvents. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4796, 2022.

FOURATI, M. et al. Bioactive compounds and pharmacological potential of pomegranate (*Punica granatum*) seeds-a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, p. 477-486, 2020.

GE, S. et al. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. **Journal of ethnopharmacology**, v. 271, p. 113877, 2021.

GOSSET-ERARD, C. et al. Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129396, 2021.

HAGHIGHIAN, M. K. et al. Effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract supplementation on serum lipid profile and oxidative stress in obese women with knee osteoarthritis: A double blind, randomized, placebo controlled study. **Advances in Integrative Medicine**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 2021.

HEGAZI, N. 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.

IBRAHIM, K. E. et al. Histopathology of the liver, kidney, and spleen of mice exposed to gold nanoparticles. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1848, 2018.

ISAS, A. S. et al. Fermentation of pomegranate juice by lactic acid bacteria and its biological effect on mice fed a high-fat diet. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102516, 2023.

JENIPHER, C.; AYYANAR, M. Ethnobotanical Analysis of Medicinal Plants Used by Kani Tribals of Tirunelveli District (Tamil Nadu, India) in Treating Respiratory Diseases. **Journal of Herbal Medicine**, v. 43, p. 100826, 2024.

KACHKOUL, R. et al. In vivo Anti-lithiasis activity and antibacterial effect of hydroalcoholic extract and infusion of *Punica granatum* L. peel. **Scientific African**, v. 22, p. e01918, 2023.

KADERIDES, K. et al. Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 380-390, 2021.

KOYUNCU, A. G. et al. Pomegranate seed oil alleviates colitis: Therapeutic effects achieved by modulation of oxidative stress and inflammation in a rat model. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 173, p. 106837, 2024.

KUPNIK, K. et al. A comprehensive study of the antibacterial activity of bioactive juice and extracts from pomegranate (*Punica granatum* L.) peels and seeds. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1554, 2021.

LAARAJ, N. et al. Phytochemical analysis, α -Glucosidase and α -Amylase inhibitory activities and acute toxicity studies of extracts from pomegranate (*Punica granatum*) bark, a valuable agro-industrial by-product. **Foods**, v. 11, n. 9, p. 1353, 2022.

LEES, J. G. et al. Oxaliplatin-induced haematological toxicity and splenomegaly in mice. **Plos one**, v. 15, n. 9, p. e0238164, 2020.

MACHADO, J. C. B.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Punica granatum* leaves as a source of active compounds: A review of biological activities, bioactive compounds, food, and technological application. **Food Bioscience**, v. 51, p. 102220, 2023.

MAPHETU, N. et al. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L.(pomegranate) plant extracts: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113256, 2022.

MO, Y. et al. Pomegranate peel as a source of bioactive compounds: A mini review on their physiological functions. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 887113, 2022.

MORADNIA, M. et al. The Power of *Punica granatum*: A Natural Remedy for Oxidative Stress and Inflammation; a narrative review. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 118243, 2024.

NAMDAR, A. B. et al. Effect of *Punica granatum* Extract Supplementation in Patients With Liver Cirrhosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Journal of Herbal Medicine**, v. 42, p. 100795, 2023.

NICERINE, O. et al. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of genito-urinary diseases in the region of Fez, Morocco. **Journal of Herbal Medicine**, p. 100861, 2024.

NWAJI, A. R. et al. Natural toxins and one health: A review. **Science in One Health**, v. 1, p. 100013, 2022.

OBAKIRO, S. B. et al. Ethnobotanical study of plants used in management of diabetes mellitus in Eastern Uganda. **Phytomedicine Plus**, v. 3, n. 4, p. 100486, 2023.

OECD, Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, **OECD Publishing**, Paris, 2002.

RANJHA, M. M. A. N. et al. A comprehensive review on phytochemistry, bioactivity and medicinal value of bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum*). **Advances in Traditional Medicine**, p. 1-21, 2021.

REXLIN, P. J. et al. Characterisation of resorbable and non-resorbable sutures coated with *Punica granatum* seed extract: an *in vitro* pilot study. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 24, n. 1, p. 101952, 2024.

RUAN, J.-H. et al. Phenolic compounds and bioactivities from pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 3678-3686, 2022.

SACCO, M. A. et al. Kambo: Natural drug or potential toxic agent? A literature review of acute poisoning cases. **Toxicology reports**, v. 9, p. 905-913, 2022.

SAINI, S. et al. Antimicrobial potency of *Punica granatum* peel extract: Against multidrug resistant clinical isolates. **Gene Reports**, v. 30, p. 101744, 2023.

SARKAR, A.; HAQUE, M. A.; ALAM, M. Unlocking the potential of pomegranate peels as a valuable source of bioactive compounds through effective drying strategies. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100622, 2024.

SHAHKOOHAHALLY, S. et al. Profiling phenolic compounds in juice and peel of fourteen pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties grown in Florida, USA. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100225, 2023.

SHAIKH, S. B.; BHANDARY, Y. P. Therapeutic properties of *Punica granatum* L (pomegranate) and its applications in lung-based diseases: A detailed review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. e13684, 2021.

SIDDIQUI, S. A.; SINGH, S.; NAYIK, G. A. Bioactive compounds from pomegranate peels-Biological properties, structure–function relationships, health benefits and food applications—A comprehensive review. **Journal of Functional Foods**, v. 116, p. 106132, 2024.

SIHAG, S. et al. Antioxidant properties and free radicals scavenging activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels: An in-vitro study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102368, 2022.

SILVA, A. R. et al. Acute toxicity and genotoxicity assessment of PgTeL, a lectin from pomegranate sarcotesta, in mice. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 301-308, 2022a.

SOLANO, J. A. G. et al. Antinociceptive effect of ethanolic peel extracts from three varieties of Mexican pomegranate (*Punica granatum* L.) in the formalin test. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 177, p. S90, 2021.

SOMSAP, O-A. et al. Evaluation of Acute Toxicity of Ethanolic Extract from Fruit of *Cyanometra cauliflora* in ICR Mice. **Trends in Sciences**, v. 21, n. 9, p. 8091-8091, 2024.

TOPALović, A. et al. Phytochemical screening of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from the market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 100, p. 103933, 2021.

TRABELSI, A. et al. Phytochemical study and antibacterial and antibiotic modulation activity of *Punica granatum* (pomegranate) leaves. **Scientifica**, v. 2020, n. 1, p. 8271203, 2020.

ULLAH, A. et al. A review of pomegranate supplementation: A promising remedial avenue for Alzheimer's disease. **Heliyon**, 2023.

VALE, E. P. et al. Cytogenetic and toxicological effects of *Punica granatum* Linnaeus fruit peel hydroethanolic extract in mice. **South African Journal of Botany**, v. 130, p. 465-470, 2020.

VALERO-MENDOZA, A. G. et al. The whole pomegranate (*Punica granatum* L.), biological properties and important findings: A review. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100153, 2023.

WEI, Z. et al. The role of extracellular polymeric substances (EPS) in chemical-degradation of persistent organic pollutants in soil: A review. **Science of The Total Environment**, p. 168877, 2023.

WU, W. et al. Simultaneous process optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and ellagic acid from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers and its biological activities. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 80, p. 105833, 2021.

YAMINI, S. et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed: A review on nutritional profile, functional food properties, health benefits, and safety aspects. **Annals of Phytomedicine**, v. 12, n. 1, p. 93-104, 2023.

YANG, Y. et al. Punicalagin: a monomer with anti-*Eimeria tenella* effect from fruit peel of *Punica granatum* L. **Poultry Science**, v. 101, n. 10, p. 102100, 2022.

YU, M. et al. Study on the antineoplastic and toxicological effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf infusion using the K14-HPV16 transgenic mouse model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 174, p. 113689, 2023.

5 CONCLUSÕES

- O extrato salino de sarcotesta de *P. granatum* apresentou atividade larvicida contra *Ae. aegypti*.
- O extrato interferiu no desenvolvimento do *Ae. aegypti*, retardando a passagem de seu ciclo de vida e isso pode afetar a sobrevivência do inseto à longo prazo.
- O extrato salino afetou a oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti* previamente tratadas no estágio larval.
- O extrato também interferiu na atividade da enzima digestiva (tripsina) e inibiu a ação da acetilcolinesterase, enzima do sistema nervoso, das larvas tratadas *in vivo*.
- Intestino de larvas e do inseto adulto apresentaram alterações morfológicas após contato com o extrato salino de *P. granatum*.
- No teste de Toxicidade aguda, foi visto que o extrato salino não apresentou toxicidade em camundongos Swiss fêmeas, apenas causando uma redução no peso do animal e aumentando o tamanho do baço.
- O extrato não causou alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais tratados.
- A romã possui muitos componentes com propriedades biológicas e nutricional, sendo uma alternativa natural eficiente como inseticida contra *Ae. aegypti*.

6 SÚMULA CURRICULAR

- Avaliador de trabalhos no III Congresso Virtual de Iniciação Científica da UFPE realizado em março de 2022.
- Membro da Equipe Organizacional do III Congresso Virtual de Iniciação Científica da UFPE realizado em março de 2022.
- Comissão organizadora do evento “I Encontro do PPGCB: A ciência como uma ferramenta da AGENDA 2030 para o desenvolvimento sustentável”, em setembro de 2022.
- Painel apresentado na Reunião Regional da FeSBE em junho de 2022, como coautora. Intitulado “Caracterização fitoquímica e avaliação antifúngica de extratos de folha de *Bixa orellana* L. em espécies de Trichophyton”.
- Colaborador no projeto de extensão “Rádio BIOPROT, TV BIOPROT e redes sociais: consolidação de ferramentas para comunicação e divulgação da ciência”, com carga horária de 120 horas. De agosto de 2021 a julho 2022.
- Apoio à equipe de organização da EXPO UFPE 2022, em outubro de 2022 (4 horas).
- Ministrante do evento de extensão “BIOPROT e LABTEC na Semana de Ciência e Tecnologia do Espaço Ciência”, em outubro de 2022 (30 horas).
- Avaliador da 27ª Ciência Jovem promovida pelo Espaço Ciência de Pernambuco em novembro de 2021 (12 horas).
- Avaliador da 28ª Ciência Jovem promovida pelo Espaço Ciência de Pernambuco em novembro de 2022 (10 horas).
- Ministrante e membro da comissão organizadora do evento de extensão “Trilha Ecológica do Catimbau”, em junho de 2023 (22 horas).
- Participação como coautora no artigo intitulado “Effects of Lectin Preparations from *Microgramma vacciniifolia* Rhizomes on the Survival, Digestive Enzymes, and Acetylcholinesterase Activity of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)”, publicado em julho de 2023.
- Poster apresentado durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Phytochemical profile and effect os saline extract of *Punica granatum* L. sarcotesta Against *Aedes aegypti* L. larvae”, em novembro de 2023.

- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Effects of lectin preparations from *Microgramma vacciniifolia* on *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera:Tenebrionidae)”, em novembro de 2023.
- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Insecticidal activity of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson leaves and its main compound (1,8-cineole) against *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera: Curculionidae)”, em novembro de 2023.
- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Bioactivity of the essential oil from *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. Leaves on *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)”, em novembro de 2023.
- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Antibacterial and antibiofilm activities of *Myrciaria tenella* essential oil”, em novembro de 2023.
- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Bioactivity of *Cratylia mollis* seed lectin preparation (cramoll 1,2,3) Against the termite *Nasutitermes corniger* and the mite *Tetranychus bastosi*”, em novembro de 2023.
- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Insecticidal activity of the fixed oil from *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Seeds Against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855”, em novembro de 2023.
- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Insecticidal activity of eucalyptol (1,8-cineol) for the control of *Nasutitermes corniger* MOTS., 1855”, em novembro de 2023.
- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Bioactivity of the essential oil of *Lippia alba* (MILL.) leaves against

Nasutitermes corniger (blattodea:termitidae)”, em novembro de 2023.

- Poster apresentado como coautora durante a XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), intitulado “Evaluation of the antibacterial and anti-biofilm potential of *Eugenia pohliana* L. (Myrtaceae) leaf essential oil”, em novembro de 2023.
- Menção Honrosa na categoria de poster realizada durante XV Reunião regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), com o trabalho intitulado “Phytochemical profile and effect os saline extract of *Punica granatum* L. sarcotesta Against *Aedes aegypti* L. larvae”, em novembro de 2023.
- Avaliador da 29º Ciência Jovem promovida pelo Espaço Ciência de Pernambuco em novembro de 2023 (8 horas).
- Membro da equipe executora do evento de extensão “Trilha Ecológica do Catimbau”, em junho de 2024 (20 horas).
- Ministrante do Programa de extensão “Conexões PPGCB”, de junho de 2023 a outubro de 2024 (98 horas).
- Membro Titular da banca do Trabalho de Conclusão de Curso de Quêren Hapuque Silva Pereira de Alcântara Vilarim no dia 27 de julho de 2024.
- Conclusão de curso de Biossegurança ofertado pela Fundação Oswaldo Cruz, novembro de 2024 (50 horas).
- Estágio no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos na Universidade Federal de Viçosa-MG, de outubro a dezembro de 2024.
- Membro da Comissão organizadora da I Escola de Verão em Bioquímica e Biotecnologia, realizado em janeiro de 2025 (60 horas).
- Participação como coautora no artigo intitulado “Insecticidal activity of lectin preparations from *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) seeds against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera:Tenebrionidae)”, publicado em fevereiro de 2025.

REFERÊNCIAS

- AGHA, S. B.; TCHOUASSI, D. P. Urbanisation of *Aedes* mosquito populations and evolution of arboviral disease risk in Africa. **Current Opinion in Insect Science**, p. 100988, 2022.
- AL-ASKAR, A. A. *et al.* Antiviral Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract against Tobacco Mosaic Virus. **Plants**, v. 12, n. 11, p. 2103, 2023.
- ÁLVAREZ-CERVANTES, P. *et al.* Subacute and subchronic toxicity of microencapsulated pomegranate juice in rats and mice. **Toxicology Research**, v. 10, n. 2, p. 312-324, 2021.
- AMELIA-YAP, Z. H. *et al.* Streptomyces derivatives as an insecticide: Current perspectives, challenges and future research needs for mosquito control. **Acta Tropica**, v. 229, p. 106381, 2022.
- BARREDO, E.; DEGENNARO, M. Not just from blood: mosquito nutrient acquisition from nectar sources. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 473-484, 2020.
- BARRERA, R. New tools for *Aedes* control: Mass trapping. **Current opinion in insect science**, v. 52, p. 100942, 2022.
- BÍBLIA. Nova versão internacional revista e corrigida/ Sociedade Bíblica Internacional. Santo André: **Geográfica**, 2018.
- BONDS, J. A. S.; COLLINS, C. M.; GOUAGNA, L.-C. Could species-focused suppression of *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito, and *Aedes albopictus*, the tiger mosquito, affect interacting predators? An evidence synthesis from the literature. **Pest Management Science**, v. 78, n. 7, p. 2729-2745, 2022.
- CARVAJAL-LAGO, L. *et al.* Implications of diet on mosquito life history traits and pathogen transmission. **Environmental Research**, v. 195, p. 110893, 2021.
- CHENG, J. *et al.* Bioactive compounds and health benefits of pomegranate: An updated narrative review. **Food Bioscience**, p. 102629, 2023.
- CLANCY, I. L. *et al.* Public health messages on arboviruses transmitted by *Aedes aegypti* in Brazil. **BMC Public Health**, v. 21, p. 1-11, 2021.
- EGID, B. R. *et al.* Review of the ecology and behaviour of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Western Africa and implications for vector control. **Current research in parasitology & vector-borne diseases**, v. 2, p. 100074, 2022.
- 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.

EL-GHIET, U. M. Abu *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in the Jazan region of Saudi Arabia, and their efficacy against *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* larvae. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 103721, 2023.

FACCHINELLI, L.; BADOLO, A.; MCCALL, P. J. Biology and Behaviour of *Aedes aegypti* in the Human Environment: Opportunities for Vector Control of Arbovirus Transmission. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 636, 2023.

FARAG, S. M. *et al.* Larvicidal, biological, and histopathological alterations induced by pomegranate peel extract, *Punica granatum* against *Culex pipiens* L.(Diptera: Culicidae). **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 25, n. 2, p. 139-161, 2021.

GANESAN, P. *et al.* Phytocompounds for mosquito larvicidal activity and their modes of action: A review. **South African Journal of Botany**, v. 152, p. 19-49, 2023.

GAO, C. *et al.* The acute oral toxicity test of ethanol extract of salt-processed *Psoraleae fructus* and its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity risk assessment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 309, p. 116334, 2023.

GIUNTI, G.; BECKER, N.; BENELLI, G.. Invasive mosquito vectors in Europe: from bioecology to surveillance and management. **Acta Tropica**, p. 106832, 2023.

GOMES, A. C. *et al.* Larvicidal potential of extracts and isolated compounds from Piper cubeba fruits against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Natural Product Research**, p. 1-8, 2022.

GÓMEZ, Marcela *et al.* *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission?. **Parasites & vectors**, v. 15, n. 1, p. 287, 2022.

GRABENSTEIN, J. D.; TOMAR, A. S.. Global geotemporal distribution of chikungunya disease, 2011–2022. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 102603, 2023.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta tropica**, v. 190, p. 99-111, 2019.

JOSHI, A.; MILLER, C. Review of machine learning techniques for mosquito control in urban environments. **Ecological Informatics**, v. 61, p. 101241, 2021.

KWOK, A. L. X.; BALASOORIYA, H.; NG, K. Efficacy of ellagic acid and ellagitannins on diabetes mellitus: A meta-analysis of preclinical and clinical trials. **Food Bioscience**, p. 102573, 2023.

LI, G. *et al.* Punicalagin damages the membrane of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 12, p. 2102-2106, 2020.

LU, G. *et al.* The multifaceted mechanisms of ellagic acid in the treatment of tumors: State-of-the-art. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 165, p. 115132, 2023.

LUZ, T. R. S. A. *et al.* Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) larvae. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105705, 2020.

MACHADO, J. C. B.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Punica granatum* leaves as a source of active compounds: A review of biological activities, bioactive compounds, food, and technological application. **Food Bioscience**, p. 102220, 2022.

MANNINO, F. *et al.* Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of ellagic and puninic acid in an in vitro model of cardiac fibrosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 162, p. 114666, 2023.

MAPHETU, N. *et al.* Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L.(pomegranate) plant extracts: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113256, 2022.

MARQUES, D. M. *et al.* Essential oils of caatinga plants with deleterious action for *Aedes aegypti*: A Review. **South African Journal of Botany**, v. 143, p. 69-78, 2021.

MOGA, M. A. *et al.* Pharmacological and therapeutic properties of *Punica granatum* phytochemicals: possible roles in breast cancer. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1054, 2021.

MOHAMED, G. S. Evaluation of the Insecticidal Activity of *Punica granatum* L. and *Olea europaea* L. against the Dry Bean Beetle, *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 11, n. 11, p. 571-578, 2020.

NASCIMENTO, J. do *et al.* Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control**, v. 165, p. 104792, 2022.

NIKOOKAR, S. H. *et al.* Zika; a continuous global threat to public health. **Environmental Research**, v. 188, p. 109868, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue and severe dengue. 2023. Acesso: 19/03/2025. Disponível em: <Dengue and severe dengue (who.int)>

PIERDOMENICO, M.; RICCIONI, C.; BENASSI, B. Anti-inflammatory effect of a pomegranate extract on LPS-stimulated HepG2 cells. **Natural Product Research**, p. 1-8, 2023.

RAMLAGAN, P. *et al.* Advances towards the analysis, metabolism and health benefits of punicalagin, one of the largest ellagitannin from plants, with future perspectives. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 3, p. 100313, 2022.

ROSAS, E. C.; CORREA, L. B.; HENRIQUES, M. G. Antiinflammatory properties of *Schinus terebinthifolius* and its use in arthritic conditions. In: **Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases**. Academic Press, 2019. p. 489-505.

RUEDA, L. M.; DEBBOUN, M. Taxonomy, identification, and biology of mosquitoes. In: Mosquitoes, communities, and public health in Texas. **Academic Press**, 2020. p. 3-7.

SAAD, A. M. *et al.* Polyphenolic extracts from pomegranate and watermelon wastes as substrate to fabricate sustainable silver nanoparticles with larvicidal effect against *Spodoptera littoralis*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 10, p. 5674-5683, 2021.

SACCO, M. A. *et al.* Kambo: Natural drug or potential toxic agent? A literature review of acute poisoning cases. **Toxicology reports**, v. 9, p. 905-913, 2022.

SAINI, S. *et al.* Antimicrobial potency of *Punica granatum* peel extract: Against multidrug resistant clinical isolates. **Gene Reports**, v. 30, p. 101744, 2023.

SANTOS, D. R. dos *et al.* New weapons against the disease vector *Aedes aegypti*: from natural products to nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 123221, 2023.

SANTOS, E. N. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: From biopesticides to anticancer agents. **Biochimie**, v. 192, p. 83-90, 2022.

SAPARBEKOVA, A. A. *et al.* Potential of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) by-product with significant antioxidant and therapeutic effects: A narrative review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 103553, 2022.

SARMA, R. *et al.* Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1091-1096, 2019.

SCATULARO, C. E. *et al.* Zika & heart: A systematic review. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 32, n. 1, p. 52-58, 2022.

SCAGLIONE, E. *et al.* Antimicrobial efficacy of *Punica granatum* Lythraceae peel extract against pathogens belonging to the ESKAPE group. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1383027, 2024.

SIHAG, S. *et al.* Antioxidant properties and free radicals scavenging activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels: An in-vitro study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102368, 2022.

SILVA, A. R. *et al.* Acute toxicity and genotoxicity assessment of PgTeL, a lectin

from pomegranate sarcotesta, in mice. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 301-308, 2022b.

SILVA, A. C. *et al.* Prevalence and Epidemiological Aspects of Chikungunya Fever in States of the Northeast Region of Brazil: a systematic review. **Acta Tropica**, p. 106872, 2023a.

SILVA, A. S. da *et al.* Larvicidal activity and docking study of *Ramalina complanata* and *Cladonia verticillaris* extracts and secondary metabolites against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 195, p. 116425, 2023b.

SILVA, J. N. O. *et al.* Effects of saline extract and lectin from *Punica granatum* seed sarcotesta on *Aedes aegypti* larvae. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 357-364, 2022a.

SILVA, P. 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.

SILVÉRIO, M. R. S. *et al.* Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, 2020.

SOUSA, D. L. *et al.* Chemical composition and repellent potential of essential oil from *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) leaves against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, p. 102549, 2023.

TCHOUASSI, D. P. *et al.* The distinctive bionomics of *Aedes aegypti* populations in Africa. **Current Opinion in Insect Science**, p. 100986, 2022.

TUELLS, J.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; FRANCO-PAREDES, C. Yellow Fever: A Perennial Threat. **Archives of Medical Research**, v. 53, n. 7, p. 649-657, 2022.

VALE, E. P. *et al.* Cytogenetic and toxicological effects of *Punica granatum* Linnaeus fruit peel hydroethanolic extract in mice. **South African Journal of Botany**, v. 130, p. 465-470, 2020.

VALERO-MENDOZA, A. G. *et al.* The whole pomegranate (*Punica granatum*. L), biological properties and important findings: A review. **Food Chemistry Advances**, p. 100153, 2022.

VAN BREE, J. W. M. *et al.* Novel approaches for the rapid development of rationally designed arbovirus vaccines. **One Health**, v. 16, p. 100565, 2023.

VENKATESAN, P. *et al.* Structural and quantitative analysis of intermolecular solid-state interactions in cocrystals obtained from nucleobases and methylxanthines with gallic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1280, p. 135074, 2023.

VINAUGER, C.; CHANDRASEGARAN, K. Context-specific variation in life history traits and behavior of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Frontiers in Insect Science**, v. 4, p. 1426715, 2024.

WU, W. *et al.* Simultaneous process optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and ellagic acid from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers and its biological activities. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 80, p. 105833, 2021.

XIE, X. *et al.* Punicalagin promotes autophagic degradation of human papillomavirus E6 and E7 proteins in cervical cancer through the ROS-JNK-BCL2 pathway. **Translational Oncology**, v. 19, p. 101388, 2022.

YISIMAYILI, Z.; CHAO, Z. A review on phytochemicals, metabolic profiles and pharmacokinetics studies of the different parts (juice, seeds, peel, flowers, leaves and bark) of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Food Chemistry**, p. 133600, 2022.

YUSEFI, M. *et al.* Evaluating anticancer activity of plant-mediated synthesized iron oxide nanoparticles using *Punica granatum* fruit peel extract. **Journal of Molecular Structure**, v. 1204, p. 127539, 2020.

ZHANG, L. *et al.* The Component of the *Chamaecyparis obtusa* Essential Oil and its Insecticidal Activity and Mechanism Against *Tribolium castaneum* (Herbst). Available at **SSRN** 4472175, 2023.

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 02 de setembro de 2024

Ofício nº 70/24

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Thâmarah de Albuquerque Lima

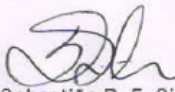
Departamento de Bioquímica

Processo nº 0081/2023

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da toxicidade aguda, dérmica e genotoxicidade do extrato salino de sarcotesta de Punica granatum**”, Registrado com o nº 0081/2023 sob a Responsabilidade da Prof. **Thâmarah de Albuquerque Lima**, Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/08/2024

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2024 a 01/04/2025
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Swiss albinos (Mus musculus)
Nº de animais	37 Animais
Peso/Idade	25 - 30 g / 60 dias
Sexo	Fêmea (22) Macho (15)
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFPE

Atenciosamente


Prof. Sebastião R. F. Silva
Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691