

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Thais Martins da Silva

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE GEL DE CARBÔMERO CONTENDO EXTRATO DE CASCA
DE *Punica granatum* PARA USO EM LESÕES CUTÂNEAS EM CÃES**

ALEGRE-ES

2021

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE GEL DE CARBÔMERO CONTENDO EXTRATO DE CASCA
DE *Punica granatum* PARA USO EM LESÕES CUTÂNEAS EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Orientadora: Profa. Dra.: Janaína Cecília
Oliveira Villanova

Coorientadora: Profa. Dra: Juliana Alves
Resende

ALEGRE-ES

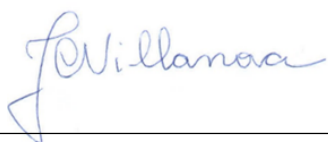
2021

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE GEL DE CARBÔMERO CONTENDO EXTRATO DE CASCA DE *Punica granatum* PARA USO EM LESÕES CUTÂNEAS EM CÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovada em 31 de agosto de 2021.

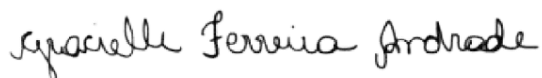
COMISSÃO EXAMINADORA



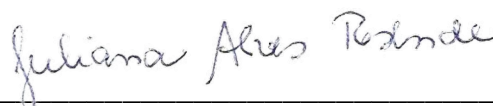
Prof^a. Dr^a. Janaína Cecilia Oliveira Villanova
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Cristiane dos Santos Giuberti
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Externo



Prof^a. Dr^a. Gracielle Ferreira Andrade
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Externo



Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Resende
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D111d da Silva, Thais Martins, 1994-
Desenvolvimento farmacotécnico e atividade antimicrobiana e antioxidante de gel de carbômero contendo extrato de casca de *Punica granatum* para uso em lesões cutâneas em cães / Thais Martins da Silva. - 2021.
94 f. : il.

Orientadora: Janaina Cecília Oliveira Villanova.
Coorientadora: Juliana Alves Resende.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Ferimentos e lesões. 2. Matéria medica vegetal. 3. Cicatrização de ferimentos. 4. Produtos naturais. 5. Taninos. 6. Antioxidantes. I. Villanova, Janaina Cecília Oliveira. II. Resende, Juliana Alves. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me fortalecer, guiar, cuidando sempre dos detalhes. À Ele, toda honra e toda glória.

À minha família: mãe Cibele e irmão Paulo, por sempre me ajudarem, me apoiarem e acreditarem em mim até quando eu não acreditava. Me ensinaram a ser forte e a sonhar. Devo tudo a vocês, que são as melhores pessoas que eu conheço.

Aos amigos e companheiros de Laboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos (LDPF) e dos grupos “Orientados da Janah e Ex-orientados da Janah”, obrigada pela ajuda, pelos papos e conselhos. Em especial, à Daiana, Nubya e Kamila, com as quais passei muitas e muitas horas trabalhando.

Ao Sanderson, *in memoriam*: gratidão por ter trabalhado e convivido com você. Sempre prestativo, companheiro, feliz e contagiante.

Às minhas amigas, Nathalia, Amanda, Cidinha, Maria, Lohanna e Mayra pelas gargalhadas, pelas conversas e os memes do Instagram.

À minha orientadora, Janaína, quem me motivou, com quem aprendi e aprendo tanto. Obrigada, pela amizade, pelos conselhos e puxões de orelha. Sempre para o meu bem.

À minha coorientadora Juliana Resende, uma pessoa alegre e sempre disposta a me ajudar. Sempre paciente, entretanto, firme. Continuo aprendendo muito com você.

A professora Juliana Severi, por toda ajuda nos experimentos, também sempre paciente. Agradeço pelas boas conversas, incentivo e apoio.

À UFES e à coordenação do PPGCV, pelo suporte durante todo o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo fomento referente ao Edital FAPES nº 09/2019 - Programa de Iniciação Científica Junior - PICJr (TO #050/2020).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela concessão de bolsa (código de Financiamento 001).

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

Desenvolvimento farmacotécnico e atividade antimicrobiana e antioxidante de gel de carbômero contendo extrato de casca de *Punica granatum* para uso em lesões cutâneas em cães. 2021. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES.

A casca é um dos biorresíduos dos frutos de romã formados após a extração do suco, com potencial de ser convertido em produtos de valor agregado para inúmeras aplicações, entre elas, a farmacêutica, uma vez que contém inúmeros compostos bioativos de interesse farmacológico. O objetivo do presente trabalho foi preparar um gel contendo extrato bruto seco das cascas de romã (EBSCR) com vistas ao uso como antimicrobiano no manejo de lesões na farmacoterapia veterinária de cães, com o intuito de fundamentar o interesse pela agregação de valor aos biorresíduos do romã. Inicialmente, realizou-se a determinação do teor de fenóis totais e da atividade antioxidante do extrato, sendo definidas a CE_{50} (Concentração efetiva para inibir 50%) e a CE_{90} (Concentração efetiva para inibir 90%), utilizando BHT (Butilhidroxitolueno) como padrão. Após caracterização química, foram preparadas formulações de géis de carbômero a 1% p/p contendo o EBSCR em diferentes concentrações (1,25, 2,5 e 3,75% p/p), nomeadas FG1, FG2 e FG3, que foram submetidas à pesquisa de atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão. Para tal, foram empregadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25.922) e *Candida albicans* (ATCC 24.433). Depois de eleita a formulação com a melhor concentração do extrato para a continuidade do estudo, foram preparados 1,5 Kg do gel base (GB) e em 1 Kg foi incorporado o extrato na concentração eleita para o estudo (FG2; 2,5% p/p). O produto foi fracionado e as amostras foram armazenados sob refrigeração (5 ± 2 °C) e em temperatura ambiente (27 ± 2 °C), determinada no período de execução do estudo, para avaliação da estabilidade preliminar. Os seguintes testes físico-químicos foram realizados em FG2 ao longo de 90 dias: aspecto, pH, resistência ao estresse térmico e mecânico, perfil de textura, determinação do teor de fenóis totais, qualidade microbiológica e manutenção da atividade antimicrobiana. O teor de fenóis totais encontrado foi de 61,92% EAG e a atividade antioxidante total determinada para uma solução a 40

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi 93,8%, com valores das concentrações mínimas eficazes (CE) para reduzir o DPPH em 50% e 90% de 14,44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 39,82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A incorporação do EBSCR a 2,5% p/p no gel base originou um gel opaco, de cor amarelo-intensa, com pH de 6,10. Ao longo do tempo, o pH, os parâmetros de textura e o teor de fenóis totais diminuíram, sendo as maiores alterações notadas nos produtos armazenados sob refrigeração. Ao final de 30 dias a redução no teor de fenóis totais na formulação foi inferior a 9% somente para a amostra armazenada sob refrigeração. No que diz respeito à qualidade microbiológica, as formulações atenderam aos requisitos farmacopeicos para a contagem de microrganismos mesófilos totais e ausência de microrganismos patogênicos, sem alterações no período de 90 dias. A eficácia antimicrobiana foi mantida ao longo tempo. A partir dos resultados pode-se inferir que a formulação FG2, preparada a partir do gel base de carbômero a 1% p/p contendo EBSCR a 2,5% p/p, armazenada durante 30 dias sob refrigeração, pode ser empregada para a finalidade pretendida, sendo útil para agregar valor à biorresíduos do romã.

Palavras-chave: *Punica granatum*, biorresíduos, atividade antimicrobiana, gel de carbômero.

ABSTRACT

Formulation, antimicrobial activity and antioxidant evaluation of carbomer gel containing *Punica granatum* peel total extract for use in skin lesions in dogs.

2021. 94p. Veterinary Medicine Postgraduate Degree - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES.

The peel is one of the biowaste of pomegranate's fruits formed after the extract of the juice, with the potential to be converted into products with added value for many applications, including the pharmaceutical. The purpose of this present work was to prepare a gel containing dry total extract from pomegranate peel (named EBSCR) with purpose on the use of handling of skin lesions in veterinary's pharmacotherapy of dogs, with the intention of substantiating the interest of value's added on the biowastes of pomegranate. At first, was carried out the determination of the content of total phenols and the total antioxidant activity on the extract, being defined as CE50 (effective concentration to suppress 50%) e a CE90 (effective concentration to suppress 90%), using BHT (butylhydroxytoluene) as a pattern. After chemical characterization, was prepared formulations of carbomer's gel with 1% p/p containing the EBSCR with different concentrations (1.25, 2.5, and 3.75% p/p), called FG1, FG2, and FG3, then was submitted to activity's research antimicrobial through the disc-diffusion method. In order to do this, was used strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25.922) e *Candida albicans* (ATCC 24.433). After of being elected the formulation with the best concentration of the extract for the continuation of the research was prepared 1.5 kg of base gel e in 1 kg was incorporated the extract in the concentration elected for the research (FG2; 2.5% p/p). The product was fractionated, and the samples were stored under refrigeration ($5 \pm 2^{\circ}$ C) and at a temperature ($27 \pm 2^{\circ}$ C), determined on executions' period of the research to the evaluation of preliminary stability. The physicochemical tests were carried out on FG2 for 90 days: aspect, pH, thermal and mechanical stress, texture profile, contents of all phenols, microbiological quality, and antimicrobial activity maintenance. The research of the constituents on the extract by UHPLC suggests the existence of phenols composites of interest to the antimicrobial and healing activity in the extract. The content of total phenols found was of 61.92 g/EAG and the antioxidant activity total determined for a solution with $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ was

93.8% with the values of the minimum effective concentrations (EC) to reduce the DPPH to 50% and 90% of 14.44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 39.82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The incorporation of the EBSCR to 2.5% on the base's gel created an opaque gel, with intense yellow color, with a pH of 6.10. During the time, the pH, texture profile, and phenols content decreased, being the biggest alterations noted on the products kept out of the refrigerator. At the end of 30 days, the reduction on the phenols content total in the formulation was lower than 9%, only to the sample stored under refrigeration. Concerning about the microbiological quality, the formulations were in according to the count of mesophiles microorganism total and absence of pathogenic microorganisms, without changes for 90 days. The antimicrobial effectiveness was kept during the study time. With the results can infer that the formulation FG2, prepared as of carbomer base's gel to 1% p/p containing EBSCR at 2.5% p/p, stored during 30 days under refrigeration can be used to the intended purpose, being useful to add value to biowastes of pomegranate.

Keywords: *Punica granatum*, biowastes, antimicrobial activity, carbomer gel.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAT	Atividade antioxidante total
ACE	Acemanana
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMP	Aminometilpropanol
ANOVA	Teste de análise de variância
BHI	<i>Brain hearth infusion</i>
BHT	Butilhidroxitolueno
CE ₅₀	Concentração efetiva para inibir 50%
CE ₉₀	Concentração efetiva para inibir 90%
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Ultra Efficiency Liquid Chromatography
CSD	Caldo Sabouraud-Dextrose
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalente em ácido gálico
ECM	Matriz extracelular
EBSCR	Extrato bruto seco de casca de romã
FG1	Gel contendo 1,25% p/p
FG2	Gel contendo 2,5% p/p
FG3	Gel contendo 3,75% p/p
FT	Teor de fenóis totais
GB	Gel base
IL-1	Interleucina 1
MHA	Mueller-Hinton Agar
MTT	<i>Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TFA	Ácido trifluoroacético
TLBP	Terapia à laser de baixa potência
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Radiação ultravioleta

XLD

Xilose lisina desoxicolato

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura		Página
Figura 1	Esquema estrutural da pele evidenciando as camadas da epiderme, derme e hipoderme.....	17
Figura 2	Representação esquemática da regeneração tecidual. Painel A: Imagens representativas das fases da cicatrização. Painel B: Tempo de duração usual (em dias) das fases da cicatrização. Painel C: elementos envolvidos nas fases da cicatrização.....	19
Figura 3	Imagem representativa de um fruto de romã e seus componentes anatômicos (A); das sementes do fruto (B); das cascas de romã secas ao sol (C); e do pó grosseiro das cascas (D).....	30
Figura 4	Estrutura geral dos compostos fenólicos de maior importância presentes nas cascas do romã: (a) cianidina, (b) delphinidina, (c) perlagonidina, (d) ácido elágico-glicosídeo, (e) ácido elágico, (f) punicalina, (g) punicalagina, (h) ácido gálico, (i) ácido cafeico e (j) catequina.....	32
Capítulo 1		
Figura 1	Cromatogramas do extrato bruto secoetanólico de casca de romã obtidos pela análise em UPLC nos seguintes comprimentos de onda: (A) 520 nm, (B) 360 nm, (C) 320 nm e (D) 280 nm.....	65
Figura 2	Reta analítica e equação da reta do ácido gálico obtida por espectrofotometria a 725 nm, em metanol, pelo método do reagente Folin-Ciocalteu.....	67
Figura 3	Porcentagem de inibição do radical DPPH pelo BHT e o EBSCR.....	71

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		Página
Tabela 1	Composição qualitativa e quantitativa do gel base e com diferentes concentrações do extrato (1,25, 2,5 e 3,75% p/p).....	60
Tabela 2	Diâmetro das zonas de inibição (mm \pm DP) observadas para as formulações contendo o extrato a 1,25% p/p (FG1), 2,5% p/p (FG2) e 3,75% p/p (FG3).....	69
Tabela 3	Valores médios obtidos para o pH da formulação FG2 determinados nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, sob as diferentes condições de armazenagem.....	72
Tabela 4	Parâmetros de textura das formulações GB e FG2 sob diferentes condições de armazenagem, nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias.....	74
Tabela 5	Retenção de fenóis totais nos géis ao longo do tempo.....	76
Tabela 6	Diâmetro das zonas de inibição (mm \pm DP) encontrados para as formulações armazenadas ao longo do tempo.....	77
Tabela 7	Contagem de microrganismos viáveis em amostras do gel contendo extrato mantidos sob diferentes condições de armazenagem, nos tempos 0 e 90 dias.....	79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Pele e reconstrução tecidual de lesões cutâneas em cães	16
2.2 Manejo das lesões cutâneas em cães	21
2.3 Romã	29
2.3.1 Extratos de romã em produtos com finalidade antimicrobiana e cicatrizante ...	32
2.4 Géis	35
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 1	52
1. Introdução.....	55
2. Materiais e Métodos.....	57
2.1 Materiais.....	57
2.2 Quantificação de fenóis totais.....	58
2.3 Determinação da atividade antioxidante total.....	59
2.4 Preparo dos géis base e medicamentoso.....	59
2.5 Definição da melhor concentração do extrato no gel	60
2.6 Avaliação de atributos de qualidade físico-química do gel.....	61
2.6.1 Análise visual e sensorial.....	62
2.6.2 Determinação do pH.....	62
2.6.3 Resistência ao estresse térmico e mecânico	62
2.5.3 Análise do perfil de textura (TPA).....	62
2.7 Doseamento do teor de FT nos géis e manutenção da atividade antimicrobiana.....	62
2.8 Análise estatística.....	64
2.9 Avaliação da qualidade microbiológica do gel.....	64
2.9.1 Contagem do número total de microrganismos mesófilos.....	64
2.9.2 Pesquisa de microrganismos patogênicos.....	64
3. Resultados e Discussão.....	65
3.1 Caracterização química do EBSCR.....	65

3.2 Definição da melhor concentração do EBSCR no gel	69
3.3 Avaliação da qualidade físico-química do gel FG2	70
3.4 Pesquisa do teor de fenóis totais e manutenção da atividade antimicrobiana.....	76
3.5 Controle de qualidade microbiológico	79
4.Conclusões.....	80
Referências.....	82

1. INTRODUÇÃO

A dermatologia é uma especialidade clínica de extrema importância na medicina veterinária. Um elevado percentual dos atendimentos realizados em consultórios se relaciona a enfermidades de pele em animais de companhia, especialmente, cães e gatos. Em um estudo realizado por Cardoso et al. (2011), entre 819 prontuários de cães avaliados, cerca de 32% apresentavam alguma dermatopatia como diagnóstico primário ou secundário. Os problemas dermatológicos são as razões mais comuns para os animais serem levados a uma consulta em função da alta prevalência dos mesmos e porque estas alterações são mais fáceis de serem visualizados pelos tutores, fazendo-os procurar ajuda especializada (CARDOSO et al., 2011; HILL et al., 2006; SOUZA, et al., 2006).

Entre as dermatopatias mais comuns em cães se destacam as infecções bacterianas, parasitárias e fúngicas, seguidas das desordens imunológicas, de queratinização (seborreica e outras), dermatoses psicogênicas e otite externa (CARDOSO et al., 2011). As dermatopatias podem ou não estar associadas ao surgimento de lesões ou úlceras, popularmente chamadas de feridas, o que se caracteriza como outro motivo para a busca por consultas especializadas (PINHO, et al., 2013; WILKINSON; HARVEY, 2004).

Entre os inúmeros tratamentos disponíveis para as lesões, figura a abordagem farmacológica, fundamentada no uso de antimicrobianos, anti-inflamatórios, enzimas debridantes, agentes imunomoduladores e substâncias absorvedoras de exsudatos. Usualmente, estes ingredientes ativos são incorporados em formas farmacêuticas convencionais, tais como pó, solução, creme, loção, pomada e gel. Após aplicação do medicamento, as feridas devem ser recobertas e devem ser realizadas trocas dos curativos, durante as quais ocorre tanto remoção quanto reaplicação dos produtos, podendo causar dor e desconforto para os animais. Neste cenário, a seleção da forma farmacêutica que permitirá o manejo das feridas com maior conforto deve ser considerada (MANDENBAULM; SANTIS; MANDEUBAULM, 2003).

Nas últimas décadas, tem sido dada grande atenção para o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos em substituição aos ingredientes ativos de origem sintética (RUSSO; AUTORE; SEVERINO, 2009; VIEGI et al., 2003; YUNES;

PEDROSA; FILHO, 2001). Acredita-se que medicamentos baseados em compostos bioativos naturais, oriundos de fontes renováveis, apresentam maior segurança para o uso sob dadas condições e, causam menos danos ao meio ambiente (VEIGA, et al., 2005).

As sementes e as cascas do romã representam cerca de 54% da massa residual gerada após a extração do suco, sendo consideradas biorresíduos dos frutos de romã. Em escala global, são gerados anualmente cerca de 1,62 milhões de toneladas de resíduos provenientes das cascas de romãs utilizados, primariamente, na produção de suco (MAGANGANA et al., 2020). Uma vez que é constituída por inúmeros compostos bioativos de interesse farmacológico, há um grande potencial da casca dos frutos ser convertida em produtos de valor agregado para inúmeras aplicações, entre elas, a farmacêutica (CHARALAMPIA; KOUTELIDAKIS, et al., 2017; KO; DADMOHAMMADI; ABBASPOURRAD, 2021).

Resultados de inúmeras pesquisas mostram que aos diversos tipos de extratos de romã são atribuídas atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e cicatrizante (FARIA; PEREIRA, 2019; FERNANDES, 2017; COSTA, 2019; FLECK, et al., 2016; SANTOS, 2019; MACHADO et al., 2003). A ação antimicrobiana dos extratos de romã, por sua vez, pode ser atribuída à presença de taninos, metabólitos secundários capazes de se complexarem com proteínas e inativarem enzimas dos microrganismos. Já a ação cicatrizante é relacionada à presença de grandes quantidades de fenóis totais, dotados de ação antioxidante, que favorecem a re-epitelização (CAMPOS; CARLI; COTA, 2018; FLECK et al., 2016; HAYOUNI et al., 2011; MACEDO; SOUZA; GUIMARÃES, 2020; MOORTHY et al., 2013; SILVA, et al. 2020). Dessa maneira, o extrato de romã se apresenta como um potencial agente farmacológico alternativo para o tratamento de feridas em cães.

Entre as formas farmacêuticas de uso tópico disponíveis para incorporação de extratos hidrossolúveis, inclusive o EBSCR, se destacam os géis. Estes podem ser definidos como formas farmacêuticas semissólidas preparadas a partir de um polímero formador do gel (agente gelificante) disperso em água. O agente gelificante é responsável pelo fornecimento de viscosidade para o sistema, que apresenta partículas de dimensões coloidais. Além do gelificante, o gel pode conter conservantes, sequestrantes e antioxidantes, consoante o tipo de ingrediente farmacologicamente ativo a ser incorporado na formulação. Ainda, podem conter umectantes, tamponantes ou modificadores de pH, conforme a necessidade e a

indicação de uso (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013). Outras vantagens para o uso dos géis no manejo das lesões são a facilidade de aplicação e de remoção dos produtos, o que favorece o conforto no uso e, o alto conteúdo de água (CORRÊA et al., 2005; MORE; ARRUDA, 2007).

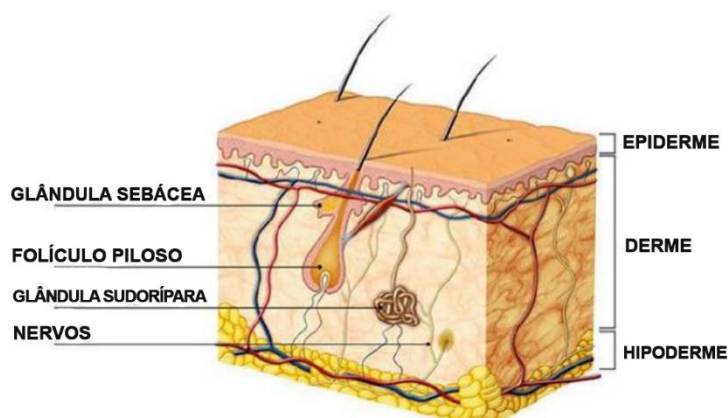
Neste contexto, o presente trabalho foi proposto com o intuito de preparar um gel contendo extrato bruto seco das cascas de romã (EBSCR) com atividade antimicrobiana e cicatrizante para uso no tratamento de lesões cutâneas em cães, fundamentando o interesse pela agregação de valor à biorresíduos do romã, oriundos da agroindústria. O relato da existência de atividade antimicrobiana e cicatrizante para diferentes extratos obtidos das cascas de romã justifica o interesse no desenvolvimento de formas farmacêuticas tópicas baseadas no EBSCR para a finalidade pretendida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele e reconstrução tecidual de lesões cutâneas em cães

Segundo Pinho, Monzon e Simões (2013), assim como no homem, a pele é o órgão mais extenso dos animais, podendo representar de 10 a 25% da massa corporal dos cães. Entre as importantes funções que desempenha, a pele atua como barreira de proteção, regula a temperatura e o equilíbrio hidroeletrólítico, proporciona a percepção dos sentidos e age como via de administração para fármacos. Portanto, deve ser mantida íntegra e saudável. Algumas áreas da pele dos animais são modificadas em sua espessura e estrutura para se adaptarem a funções específicas. O pelo que recobre a pele também varia em densidade e volume para cada espécie e raça (SALAZAR; BITENCOURT, 2009). Assim como nos humanos e nos demais animais, a pele dos cães é dividida em três camadas, como pode ser observado esquematicamente na Figura 1 (ALVES, 2013; SCOTT, 1992).

Figura 1- Esquema estrutural da pele evidenciando as camadas da epiderme, derme e hipoderme



Fonte: KNEGT; VIEIRA, 2019.

A primeira camada, mais externa, é a epiderme, proveniente da ectoderme e responsável pelas propriedades de barreira e regulação. Quando comparada com o homem, a espessura da epiderme dos cães é menor, com *turnover* de 22 dias. A segunda é a derme, originada da região mesodérmica e responsável por proporcionar

sustentação à epiderme. Nos animais a derme é dividida em superficial e profunda. A derme está envolvida na regulação do crescimento e proliferação celular. Nessa camada de pele, estão alojadas as estruturas anexas, como as glândulas sudoríparas, os folículos de pelos, as glândulas sebáceas e o músculo eretor do pelo, além de vasos sanguíneos, linfáticos e estruturas nervosas. A terceira é a hipoderme ou tecido conjuntivo, camada que confere sustentação às superiores (ALVES, 2013; SCOTT, 1992).

Entre as principais diferenças entre a pele dos cães e a dos humanos, além da ausência de glândulas sudoríparas écrinas nos primeiros, é o valor do pH: a dos cães é mais alcalina, com o pH entre 5,5 e 7,2. Conforme a região, valores mais elevados podem ser observados (6 e 9,5). Usualmente, a maior alcalinidade da pele dos cães aumenta a predisposição para o surgimento de infecções cutâneas por bactérias e fungos (MATOUSEK et al., 2003a; MATOUSEK et al., 2003b).

Feridas ou úlceras se caracterizam como qualquer interrupção na continuidade de tecidos cutâneo-mucosos, que acarretam alterações estruturais e fisiológicas dos tecidos afetados, apresentando extensão e profundidade variáveis, podendo ser aguda ou crônica e de origem traumática ou não (BRASIL, 2002; BRASIL, 2008). O rompimento da integridade física da pele pode ser causado por fatores extrínsecos e intrínsecos. Traumas físicos, acidentais ou não, originados por queimaduras, cirurgias, atritos, brigas (arranhões e mordidas) e, traumas químicos, decorrentes do contato com substâncias cáusticas, são fatores extrínsecos, responsáveis por grande parte da ocorrência de feridas em cães. Em lesões de descolamento no tronco ou membros, comumente originada em atropelamentos, a pele é cortada ou arrancada. A perda de pele costuma ser extensa e os tecidos mais profundos podem ser envolvidos. Usualmente, as áreas mais acometidas pelos diferentes tipos de feridas nos cães são as patas, o abdome e os olhos. Patologias associadas, consideradas fatores intrínsecos, também podem ser responsáveis por feridas, especialmente, as de origem oncológica (FAHIE; SHETTKO, 2007; WINKLER, 2019).

As feridas podem ser subdivididas em agudas e crônicas de acordo com o tempo necessário para que ocorra reconstituição tissular. Nas feridas agudas, a reconstituição tecidual é rápida, ocorrendo dentro de um prazo estimado curto. Por outro lado, feridas crônicas apresentam tempo de reconstrução tecidual aumentado, ultrapassando o tempo esperado (AMALSADVALA; SWAIM, 2006).

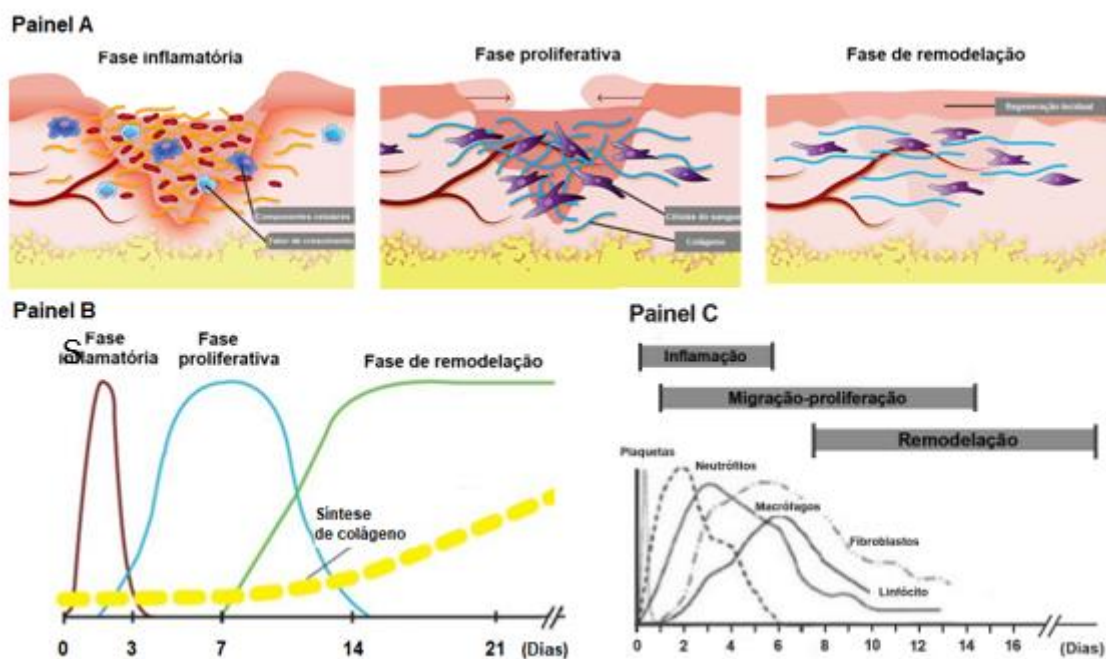
As feridas podem ser classificadas ainda como limpas, contaminadas ou infectadas, sendo nestas últimas, observada concentração de microrganismos superior a 10^5 por grama de tecido. As feridas limpas são aquelas provenientes de intervenções cirúrgicas, em ambientes assépticos. O nível de contaminação, o suprimento de sangue e a causa da ferida contribuem para o desenvolvimento das condições necessárias para a infecção e, cada caso deve ser avaliado individualmente (WINKLER, 2019).

Segundo a extensão do dano tissular, as feridas podem ser classificadas em superficiais, quando alcança somente a epiderme; intermediárias, quando atinge a camada mais profunda da epiderme e parte superior da derme; e profundas, quando alcança estruturas internas da epiderme, a derme e o tecido subcutâneo, podendo abranger músculos e ossos, com perda tecidual (FAHIE; SHETTKO, 2007). Feridas intermediárias e profundas são abertas e, frequentemente, devem ser tratadas por vários dias, semanas ou mesmo meses, até completo fechamento ou cicatrização por segunda intenção (MICKELSON; MANS; COLOPY, 2016).

De forma geral, o processo de re-epitelização e reconstrução tecidual, conhecido como popularmente como cicatrização, ocorre de forma semelhante e envolve as mesmas fases, tanto no homem como nos animais (BOHLING, 2006; HOSGOOD, 2006). As fases de cicatrização tecidual se dividem em três, ocorrendo ao longo dos dias e se sobrepondo. São elas a inflamatória, a proliferativa e a de remodelação (ou maturação) (FIGURA 2, Painel A). Alguns autores consideram a existência de uma fase intermediária entre a inflamatória e a proliferativa, chamada de fase de debridamento. No entanto, as classificações mais modernas consideram que os fenômenos debridantes ocorrem dentro da fase inflamatória (MICKELSON; MANS; COLOPY, 2016).

Logo nos primeiros 5 a 15 minutos da ocorrência de uma lesão é iniciado, localmente, o fenômeno da homeostasia, sinalizando para o início da vasoconstrição, com a intenção de parar o sangramento. Na homeostasia, a liberação de mediadores vasoativos, citocinas e fatores de crescimento é iniciada. Em seguida, começa a fase inflamatória, na qual há aumento do fluxo sanguíneo e extravasamento de fluidos, combinado com o bloqueio da drenagem linfática. Tais fenômenos são responsáveis pelos sinais clássicos da inflamação: calor, vermelhidão e o inchaço.

Figura 2- Representação esquemática da regeneração tecidual. Painel A: Imagens representativas das fases da cicatrização. Painel B: Tempo de duração usual (em dias) das fases da cicatrização. Painel C: elementos envolvidos na cicatrização.



Fonte: PARK; BARBUL, 2004; ORSINI; DIVERS, 2014 (Adaptado).

A fase inflamatória aguda dura de 1 a 3 dias, podendo persistir em condições desfavoráveis (MICKELSON; MANS; COLOPY, 2016). Na fase inflamatória acontece a migração dos glóbulos brancos para a área lesionada, dando início ao debridamento da ferida, com a intenção de mantê-la “limpa”. Células mediadoras da inflamação são recrutadas para a região, entre as quais os neutrófilos, monócitos que se diferenciam em macrófagos maduros e, os linfócitos. Os neutrófilos são as células que liberam enzimas proteolíticas que removem os restos dos tecidos necróticos e bactérias (ISAAC et al. 2010; LAUREANO; RODRIGUES, 2011). Já os macrófagos são as células dominantes dentro de 3 a 5 dias após ocorrência da lesão e desempenham papel fundamental na transição entre as fases inflamatória e a reparadora. Nesta etapa são liberadas, entre outras substâncias, fatores de crescimento que estimulam a conversão de células mesenquimais em fibroblastos e promovem o começo da sinalização para a síntese de colágeno e a angiogênese (OZTURK;

ERMERTCAN, 2011; PORTOU et al., 2015). A fase proliferativa começa cerca de 3 a 4 dias após a lesão e é caracterizada por fibroplasia, angiogênese e epitelização. Neste estágio, os fibroblastos dérmicos, estimulados por fatores de crescimento, proliferam, migram e se diferenciam em miofibroblastos contráteis, células responsáveis para a produção da matriz extracelular (ECM), composta por colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e elastina. Outro fenômeno importante que se inicia é o crescimento de novos vasos (angiogênese) a partir dos pré-existentes, adjacentes à ferida. A angiogênese ocorre quando as células endoteliais dérmicas migram sob influência do fator angiogênico derivado de macrófagos e do fator de crescimento vascular endotelial. A combinação dos fibroblastos, novos capilares e colágeno forma o tecido de granulação. A fase proliferativa culmina na epitelização, que envolve a proliferação e a migração de queratinócitos para as bordas da ferida, sua diferenciação entre as células dos estratos da epiderme e a restauração da membrana basal, conectando a epiderme à derme subjacente (MICKELSON; MANS; COLOPY, 2016; OZTURK; ERMERTCAN, 2011).

Por fim, na fase da remodelação é iniciada 1 a 2 semanas após a lesão, com a deposição de colágeno na ferida. A principal atividade durante esta fase é o fortalecimento e remodelação do colágeno recém-formado, com substituição do colágeno tipo II pelo colágeno tipo I. As fibras de colágeno se remodelam, alinham e reticulam, com ganho de resistência mecânica e atenuação das depressões, com suavização e nivelamento tecidual. A contração ajuda a fechar a ferida diminuindo a lacuna entre suas margens dérmicas e reduzindo a área de superfície da ferida. A fase de maturação é a mais longa, continuando por semanas a meses após a lesão, dado o tipo de lesão ocorrida e as condições teciduais (LAUREANO; RODRIGUES, 2011; MICKELSON; MANS; COLOPY, 2016; OZTURK; ERMERTCAN, 2011).

A cicatrização de feridas pode ocorrer por primeira intenção, quando a lesão é superficial, não há perda de tecido e as extremidades da pele permanecem justapostas uma à outra. Já a cicatrização por segunda intenção ocorre em lesões mais profundas, nas quais houve perda tecidual e as extremidades da pele ficam afastadas umas das outras, sendo necessária formação de tecido de granulação até que a contração e re-epitelização aconteçam (BLANES, 2004; BOHLING; HENDERSON 2006).

2.2 Manejo das lesões cutâneas em cães

O tipo de manejo para determinada ferida será escolhido pelo veterinário após realização de inspeção inicial, irrigação e limpeza da lesão. Verificada se a ferida é aberta ou fechada, o procedimento será estabelecido. Feridas limpas, com pele em quantidade suficiente, podem ser suturadas cirurgicamente com linha ou cola, caso necessário. Em casos de grande possibilidade de contaminação ou pouca pele, a ferida não deve ser fechada. Assim, a ferida será drenada, passará por debridamento tecidual seguida de lavagem e administração de medicamentos (KIRBY; GELLAT; WILKINS, 2011). De acordo com o grau de profundidade e do tipo de lesão, pode ser requerida sedação para o manejo, uma vez que a realização dos curativos e, tanto a remoção quanto a aplicação dos medicamentos, podem causar grande dor e desconforto para o animal (KIRBY; GELLAT; WILKINS, 2011).

Finalizado os procedimentos, a ferida deverá ser recoberta, o que pode ser feito com diferentes tipos de coberturas (bandagens), consoante suas características. As coberturas podem ser classificadas como primária, secundária e mista. A cobertura primária é aquela que permanece em contato direto com a úlcera e tem a finalidade de absorver o exsudato, preservando o ambiente úmido e a não-aderência. Já a cobertura secundária é aquela que recobre a cobertura primária, com a finalidade de adsorver o excesso de drenagem, proporcionando proteção e compressão. Coberturas mistas possuem as duas camadas: uma em contato com o leito da úlcera e outra em contato com o ambiente externo (MANDENBAULM; DI SANTIS; MANDEUBAULM, 2003). Na atualidade, coberturas interativas ou substitutos de pele e coberturas bioativas têm sido utilizadas com sucesso no tratamento das feridas. As coberturas interativas são aquelas capazes de modificar a fisiologia no microambiente das feridas mantendo-as úmidas e otimizando a cicatrização. Já as coberturas bioativas são aquelas que agem também como reservatório de fármacos com o objetivo de atuar como barreira e tratar as feridas, promovendo a regeneração tecidual (BOATENG; CATANZANO, 2015).

No que diz respeito ao tratamento farmacológico das feridas em animais, este é fundamentado no uso de medicamentos contendo fármacos sintéticos e/ou compostos bioativos naturais aos quais são atribuídas atividade proliferativa e, portanto, cicatrizante. As classes de maior interesse para as quais há relatos na literatura de sucesso quando empregados em processos de cicatrização são anti-

inflamatórios, imunomoduladores e debridantes. Anestésicos locais também podem ser utilizados para aumentar o conforto dos animais (FAHIE; SHETTKO, 2007; MICKELSON; MANS; COLOPY, 2016).

Inúmeras pesquisas avaliaram a eficácia e a segurança de fármacos sintéticos e/ou plantas medicinais, com ações farmacológicas diversas, em processos de cicatrização de feridas de ocorrência natural ou induzidas, em animais. Ribeiro *et al.* (2009), pesquisaram a efetividade da ketanserina tópica sobre a cicatrização de feridas cutâneas induzidas na região da garupa de equinos e observaram que o fármaco sozinho não produziu resultados significativos como promotor de cicatrização tecidual. Por outro lado, há relatos do sucesso da associação do tartarato de ketanserina com o asiaticosídeo, um composto bioativo isolado da *Centella asiatica*, em processos de cicatrização tecidual em cães. A ketanserina é um antagonista dos receptores de serotonina que atua aumentando a microvascularização e proporcionando resposta inflamatória mais efetiva na fase inicial da cicatrização, ampliando a ativação de macrófagos. Já o metabólito da *C. asiatica* estimula a síntese de colágeno tipo I favorecendo a resistência mecânica tecidual e a rápida cicatrização. O medicamento é comercializado com o nome fantasia Regepil®, para administração tópica por *spray* (OURO FINO, 2020).

A acemanana (ACE) é um polissacarídeo encontrado na babosa (*Aloe vera*), ao qual são atribuídas excelentes propriedades imunomoduladoras. A ACE atua como fator de crescimento estimulador de macrófagos, modulando o aumento na secreção de interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), o estímulo da angiogênese, a deposição de colágeno e a diferenciação dos queratinócitos (SWAIM; GILLETE, 1998). Autores relataram que géis contendo ACE apresentaram ação positiva sobre a contração e re-epitelização de feridas de pata em cães e estimulou a formação de tecido de granulação sobre o osso exposto (SWAIM; RIDELL; MCGUIRE, 2013). Ao ACE também são atribuídas também atividade antifúngica e atividade antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Seu uso é recomendado desde a fase inflamatória até a proliferativa (HENGEL; HAAR; KIRPENSTEIJN, 2013).

Outro metabólito secundário presente no *Aloe vera* é a alantoína, composto capaz de estimular a reparação tecidual em feridas supurativas e persistentes. Assim como a ACE, seu uso é recomendado desde a fase inflamatória até a proliferativa (FOSSUM, 2013). Em um estudo realizado por Araújo *et al.* (2010), não foram observadas diferenças significativas nas análises planimétricas realizadas nas áreas

das lesões induzidas em ratos do grupo que recebeu tratamento com creme de alantoína a 5% p/p quando comparados aos animais dos grupos controle. No entanto, os resultados das análises histológicas mostraram que ocorreu o estímulo à proliferação fibroblástica e síntese de ECM de maneira mais intensa e rápida nos animais do grupo tratado, sugerindo que ocorreu controle da resposta inflamatória. Resultados semelhantes foram observados por Silva *et al.* (2014) que avaliaram o uso da pomada Alantol[®] (alantoína a 3% p/p associada ao óxido de zinco) promoveu um período cicatricial reduzido em feridas cutâneas induzidas em equinos.

Os agentes anti-inflamatórios são comumente usados para o tratamento de feridas, com a finalidade de inibir processos inflamatório progressivos. Todavia, esteroides tópicos, por exemplo, podem inibir ou prolongar a fase inflamatória, essencial no processo de cicatrização (HEDLUND, 2007). Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são usados habitualmente em casos de dor, febre e inflamações, tanto pelos humanos quanto pelos animais. Entretanto o seu uso é considerado limitado principalmente nos animais, pois apresenta diversos efeitos colaterais, como problemas gastrointestinais e nos rins (BERBERTH; FERREIRA 2004). Além da via de administração oral, os anti-inflamatórios podem ser usados na via tópica que compreende a aplicação do medicamento sobre a superfície da pele, alcançando a epiderme e derme. Dessa forma se caracteriza como uma via de administração local e limitada, onde apenas uma porção discreta é passada para corrente sanguínea. A via tópica possivelmente reduz as reações adversas, diminuem a toxicidade sistêmica e aumenta a ação local (EBSERH, 2016; PEREIRA; RIBEIRO; CICONELLI, 2006).

As enzimas debridantes são enzimas proteolíticas responsáveis por fazer a remoção de material estranho e desvitalizado, comumente chamado de necrosado, responsável por contaminar feridas, auxiliando no processo de cicatrização (FALANGA, 2002). As enzimas proteolíticas são aplicadas no leito da ferida sem que haja prejuízo ao tecido viável. São classificadas de acordo com o mecanismo usado para clivar proteínas, como proteinases da serina (quimotripsina, tripsina, plasmina, elastase); proteases de cisteína (papaína); proteinases aspárticas (renina, pepsina) e metaloproteinases (colagenase) (HOPPE; GRANICK, 2012).

Porsani *et al.* (2016) relatam três casos de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras (UFLA, Brasil) com feridas infectadas, necrosadas, de etiologia variada e consideradas extensas e graves. As lesões foram tratadas com gel-creme de papaína a 3 ou 5% p/p. O tratamento dos animais

demonstrou efetividade na recuperação das feridas, com a formação de grande quantidade de tecido de granulação, em um menor tempo quando comparados a tratamentos convencionais.

Hamilton e Kožár (2016) investigaram os efeitos de pomadas contendo colagenase (Iroxol® Mono) na concentração de 1,2 µg no debridamento de feridas em cães e gatos e, observaram que o tempo de cicatrização das feridas diminuiu e tecido de granulação foi desenvolvido alguns dias após o uso da pomada.

Santana (2015) investigou o efeito do tratamento tópico do gel de papaína a 3% p/p em lesões agudas induzidas em camundongos saudáveis, mediante avaliação dos fatores de crescimento e citocinas presentes localmente, utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e estudos imuno-histoquímicos. No estudo, camundongos saudáveis foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo parte tratados com o gel de papaína e os demais, com o gel placebo. No exame macroscópico, nos animais do grupo tratado com a enzima, as áreas das lesões observadas foram menores, bem como as taxas de contração. Quantidades menores de células inflamatórias, aumento na neovascularização e síntese acelerada de fibras de colágeno, com maior organização destas últimas, foram observadas. Resultados semelhantes foram observados por Gonçalves (2017), que comparou os efeitos da solução de papaína a 2% p/p com o uso de terapia à laser de baixa potência (TLBP) no processo cicatricial de feridas de segunda intenção em ratos. Os resultados obtidos pelo autor evidenciaram maior contração das lesões e maior re-epitelização nos animais do grupo que recebeu o gel de papaína, quando comparados aos do controle e do grupo tratado com laser, durante a fase inflamatória.

Um aspecto importante a ser observado no correto manejo das lesões é a contaminação do leito da ferida por microrganismos, quer por exposição da área lesionada ou pela sua introdução durante a ocorrência da lesão. Como discutido anteriormente, a pele dos animais atua como barreira física frente à danos químicos, físicos, mecânicos e microbiológicos. A secreção das glândulas sebáceas e sudoríparas, a presença de lipídios e o pH da epiderme se constituem como primeira linha de defesa contra os microrganismos (LLOYDE, et al., 2007). Portanto, danos à barreira cutânea podem favorecer a ocorrência de infecções, uma vez que a pele saudável do animal possui microrganismos comensais e oportunistas, como fungos e bactérias (KNEGT; VIEIRA, 2019).

A composição da microbiota da pele dos cães pode variar de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos tais como a espécie, a região do corpo do animal, seu habitat, a alimentação e a densidade populacional. Ainda segundo Lacerda (2018), a composição da microbiota de tecidos lesionados está ligada ao tipo de dano ocorrido no tecido. Lesões causadas por mordedura, por exemplo, estão sujeitas a infecções de etiologia polimicrobiana, nas quais estão presentes em maior quantidade, microrganismos aeróbios. Já nas lesões cirúrgicas ou de origem traumáticas podem ocorrer infecções polimicrobianas tanto por bactérias aeróbicas quanto anaeróbicas. Logo, além dos contaminantes em feridas serem introduzidos pela lesão, também podem ser da própria pele do animal (LACERDA, 2018).

Os microrganismos da pele podem ser classificados como residentes, transitórios. Os microrganismos ditos residentes são aqueles que convivem em simbiose com o hospedeiro, atuando na proteção da derme. Já aqueles chamados transitórios são os que não estão presentes na pele dos animais em condições normais e podem causar infecções oportunistas. Entre os residentes da microbiota dos cães se destacam as bactérias dos gêneros estafilococos (*Staphylococcus epidermidis*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. pseudintermedius*); *micrococcus spp.*; estreptococos alfa-hemolíticos e *Acinetobacter spp.* Já entre as transitórias, as principais são *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Alcaligenes spp.* e *Staphylococcus spp.* (KNEGT; VIEIRA2019; LACERDA, 2018). Um exemplo de bactéria patogênica comumente associada à ocorrência de infecções na pele de cães, é a *S. pseudintermedius*. Entre os fungos mais encontrados na pele de cães, a *Malassezia pachydermatis* se destaca, sendo considerada um microrganismo oportunista (KNEGT, 2019).

Composto por leveduras comensais, o gênero *Candida* está presente na microbiota do homem e de animais, que geralmente vivem em regime domiciliar e que frequentam serviços de estética frequentemente, não causam danos ao hospedeiro, exceto pelo desequilíbrio biológico e físico de proteção da pele. Infecções por este gênero são pouco comuns em animais, entretanto podem ser vistos em cães, pois pode estar relacionado com fatores ambientais, como no caso de animais domésticos pelo maior contato com humanos, e fatores como a eficiência imunológica do hospedeiro, pois com o sistema imune comprometido, as leveduras

se tornam patogênicas e podem gerar infecções sistêmicas (ALVES; KOMMERS; SOUZA, 2020; BRITO et al., 2009). Paixão et al. (2001) investigaram o possível envolvimento de fungos sapróbios em dermatomicoses em cães e gatos e detectaram a incidência de 6,8% de *Candida* spp. em lesões cutâneas dos animais investigados. Bentubo, Gambale e Fischman (2010) investigaram a presença de fungos no pelame de cães domésticos sadios e a espécie *Candida albicans* foi isolada 20 dos 21 animais estudados. Para os autores, a alta frequência desse microrganismo caracteriza exposição e risco de infecção tanto para os animais quanto para os proprietários suscetíveis que mantêm estreito contato com os mesmos.

Quando se trata de um tecido lesionado no qual a resposta imunológica do indivíduo se encontra comprometida, os microrganismos chamados de comensais passam a se multiplicar e causar alterações nas lesões que retardam o processo de cicatrização (LACERDA, 2018). Dessa maneira, o tratamento de lesão em cães visa, entre outros procedimentos, evitar e/ou reverter a infecção não somente pelo controle de microrganismos patogênicos que não fazem parte da microbiota, mas, também, dos comensais, uma vez que estes também são capazes de gerar a infecção, devendo ser levado em consideração o agente etiológico, o paciente e o local da lesão (LACERDA, 2018). Portanto, o uso de soluções de lavagem contendo antissépticos e de formulações com antimicrobianos devem ser considerados no tratamento das lesões abertas contaminadas ou em caso de feridas crônicas. Cabe ressaltar que, segundo Williams e Moores (2009) e Fossum (2013), o uso de antimicrobianos não deve ser instituído como escolha terapêutica única, substituindo outros procedimentos, como a lavagem e debridamento, devendo ser considerada abordagem complementar, com a intenção de reduzir a infecção e contribuir para um desfecho favorável da cicatrização.

Usualmente, antimicrobianos de amplo espectro, como a gentamicina e penicilina são prescritos para o tratamento de lesões contaminadas (CAPELLA, et al., 2020). Altoé (2019) investigou o uso da doxiciclina no processo de reparo cutâneo em ratos Wistar machos. Os animais foram divididos em três grupos e receberam o tratamento durante 21 dias, via gavagem. Após o tratamento foram avaliados a taxa de contração das lesões e mediante análise histológica. Os resultados demonstraram que animais tratados com a doxiciclina apresentaram maior proporção macrófagos e

mastócitos e dos componentes da matriz extracelular (colágeno e fibra elástica), resultando em maior contração da ferida e melhor cicatrização em relação ao controle.

Sampaio *et al.* (2009) analisaram a influência do uso de metronidazol oral a 4% p/v na cicatrização de feridas induzidas no dorso de ratos Wistar, soro fisiológico como controle. A avaliação da contração da ferida foi realizada nos dias 14 e 21 dias, além da determinação de parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos. Os resultados demonstraram que houve maior concentração de colágeno nos animais tratados com metronidazol em todos os tempos investigados e os autores concluíram que o metronidazol contribuiu para o processo de cicatrização.

Outras substâncias antimicrobianas podem ser eficazes no tratamento de feridas, tais como o mel. Além das atividades farmacológicas a ele atribuídas - atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, o mel cria um filme sobre a superfície da lesão, impedido a entrada de patógenos e a saída de fluidos, favorecendo a hidratação local. Sua alta osmolaridade justifica a ação antimicrobiana a ele atribuída (BACKES *et al.*, 2005). Rahal *et al.* (2003) investigaram a influência do mel e própolis na cicatrização de feridas limpas por segunda intenção, induzidas cirurgicamente em ratos Wistar, divididos em três grupos e que receberam tratamento com própolis (grupo I), mel (grupo II) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (grupo controle). Histologicamente, os animais tratados com mel e própolis promoveram redução da resposta inflamatória e melhora na cicatrização, sendo a re-epitelização mais rápida nos animais tratados com própolis. Dos Santos *et al.* (2012) comparou a eficácia do mel e do açúcar mascavo na cicatrização de feridas induzidas em porquinhos da Índia (cobaias da raça Abissinia), em feridas induzidas cirurgicamente. Os tratamentos foram realizados diariamente e consistiam na troca dos curativos, avaliação macroscópica das feridas, medida da temperatura retal e pesagem dos animais. Na avaliação macroscópica das feridas foi observado o tamanho e contração das feridas, a presença de hemorragia, a formação de crosta, edema e pus, e, a formação do tecido de granulação. Em todos os grupos, as feridas não apresentaram sinais macroscópicos de infecção durante todo o estudo e, a partir do terceiro, houve formação de crosta. Nas feridas tratadas com mel, foi observada ligeira diminuição no diâmetro até ao quarto dia de tratamento, seguido de diminuição acentuada mantida até ao 16º dia de tratamento. Segundo os autores, o mel promoveu a cicatrização mais rapidamente por estimular a formação de tecido de granulação e re-epitelização quando comparado ao açúcar mascavo.

Apesar do grande número de estudos disponíveis na literatura que relatam abordagens farmacológicas tópicas para o tratamento de feridas em animais, há resultados controversos sobre a recomendação do uso de algumas substâncias, uma vez que um ou mais parâmetros do processo de cicatrização podem ser comprometidos (FAHIE; SHETTKO, 2007). Estudos relatam, por exemplo, o uso de formulações contendo sulfato de gentamicina a 0,1% nas formas de creme e solução no tratamento de feridas em cães. Ambos os produtos foram eficazes no controle do crescimento bacteriano nas feridas quando comparados aos grupos não tratados. No entanto, o uso da forma farmacêutica creme retardou a contração das lesões quando comparadas com a solução, que não interferiu no processo (LEE et al., 1984). Pomadas contendo bacitracina, sulfato de neomicina e sulfato de polimixina B apresentaram efeito positivo sobre a re-epitelização de tecido lesionado em porcos, com re-epitelização potencializada pela presença do zinco na formulação. Por outro lado, a contração da ferida foi comprometida pela presença do zinco (FAHIE; SHETTKO, 2007). Em um estudo realizado por Lozier, Pope e Berg (1992), foi feita uma comparação dos efeitos de soluções de diacetato de clorexidina diluídas a 0,05% p/v em diferentes solventes, na cicatrização de feridas em cães. Todas as diluições apresentaram atividade antimicrobiana, mas não promoveram diferenças entre os grupos tratados e controles em relação à contração da ferida e re-epitelização.

Como mencionado anteriormente, a antibioticoterapia não deve ser empregada como terapêutica única no tratamento das lesões, uma vez que as infecções comprometem a cicatrização, mas, não são a única causa do não recrudescimento de determinadas lesões (FOSSUM, 2013; WILLIAMS, 2009). Em um estudo realizado por Arias *et al.* (2008), foi pesquisaram a susceptibilidade de microrganismos coletados de feridas traumáticas naturalmente contaminadas de 18 animais (17 cães e 1 gato) à várias classes de antibióticos. A coleta era realizada em feridas cujos tratamentos não apresentaram boa evolução com o uso de medicamentos administrados pelas vias tópica e sistêmica. Foi coletada secreção das feridas com swab, inoculados em ágar sangue, obtendo-se 20 isolados bacterianos. Destes, 70% eram bacilos Gram-negativos como *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Klebsiella sp.* *Escherichia coli*, e 30% Gram-positivos como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* Verificou-se a ocorrência de baixa suscetibilidade aos 11 antimicrobianos testados pela *Klebsiella sp* (7 a 50%) e os autores destacaram que, os antibióticos que foram testados em mais de quatro isolados bacterianos,

apresentaram 100% de resistência à amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina e cefalotina. Neste contexto, o emprego de um extrato preparado a partir de uma planta medicinal de uso popular consagrado, ao qual são atribuídas atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante, é de grande interesse.

2.3 Romã

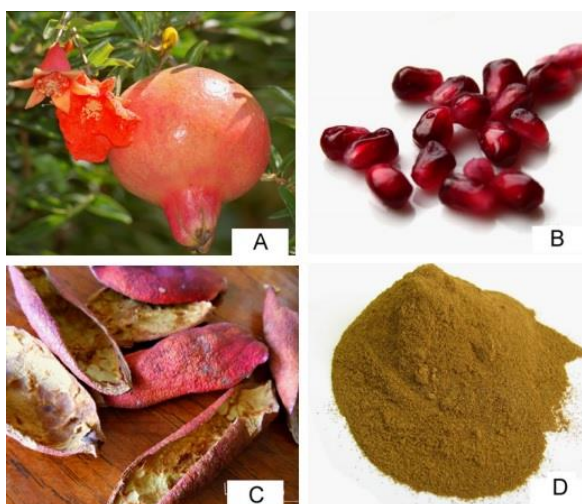
A romãzeira (*Punica granatum* L.) é uma planta arbustiva, ramosa, que pertence à família Punicaceae, nativa do Afeganistão, Irã, China e subcontinente indiano. Hoje, é cultivada em todo o mundo, inclusive, no Brasil (GOMES, 2007). A planta mede até três metros de altura, possui folhas simples, cartáceas, dispostas em grupos de 2 ou 3, com comprimento de 4 a 8 cm. Suas flores são solitárias, com corola vermelho-alaranjado e cálice esverdeado duro. Seu fruto, a romã, é do tipo baga, globóide, podendo medir até 12 centímetros. As sementes são envolvidas por arilo róseo, líquido e doce (DEGÁSPARI; DUTRA; 2011; LORENZI; MATOS, 2008). Da massa total do fruto, as cascas representam cerca de 50%, os arilos 40% e as sementes, 10% (CHRISTAKI; BONOS; FLOROU-PANERI, 2011; PATHAK; MANDAVGANE; KULKARNI, 2016). Uma representação do fruto, das suas sementes e cascas e de um extrato seco das cascas do romã é dada na Figura 3.

A romã é bem conhecida por apresentar atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa, antiparasitária, imunomoduladora, anticonvulsivante, cardioprotetora, antiespasmódica, hipolipemiante, antitumoral, cicatrizante e antidiabética (FAZIO et al., 2018; FLECK et al., 2016; KAUR et al., 2006; MACHADO et al., 2003; SINGH et al., 2009). Na medicina popular é recomendada para tratar faringites, laringites, bronquites, lesões e abscessos de pele e mucosas, diarreias de origem bacteriana e parasitária, cólicas, hemorroidas, infecções de vias urinárias e genitais, viroses em geral, infecções por fungos, conjuntivites, gengivites, glossites e estomatites aftosas, entre outras patologias (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2006).

No Brasil, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde (2009a), regulamentou, como parte essencial das políticas públicas de saúde no país, as ações voltadas para a garantia do acesso seguro e uso racional às plantas medicinais e de produtos originados destas, bem como o

desenvolvimento de tecnologias e inovações relacionadas à produção de fitoterápicos e o fortalecimento das cadeias produtivas envolvidas neste processo. As ações do programa visam ainda estabelecer o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento econômico e social originado do uso das plantas medicinais. Uma das ações deste programa foi o lançamento, em 2006, da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que lista as espécies de plantas medicinais. Nesta lista consta 71 espécies, dentre elas a monografia da *Punica granatum* Linn. (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009b).

Figura 3- Imagem representativa de um fruto de romã e seus componentes anatômicos (A); das sementes do fruto (B); das cascas de romã secas ao sol (C); e do pó grosseiro das cascas (D)



Fonte: ISMAIL; SESTILI; AKHTR, 2012 (Reprodução autorizada pelo autor).

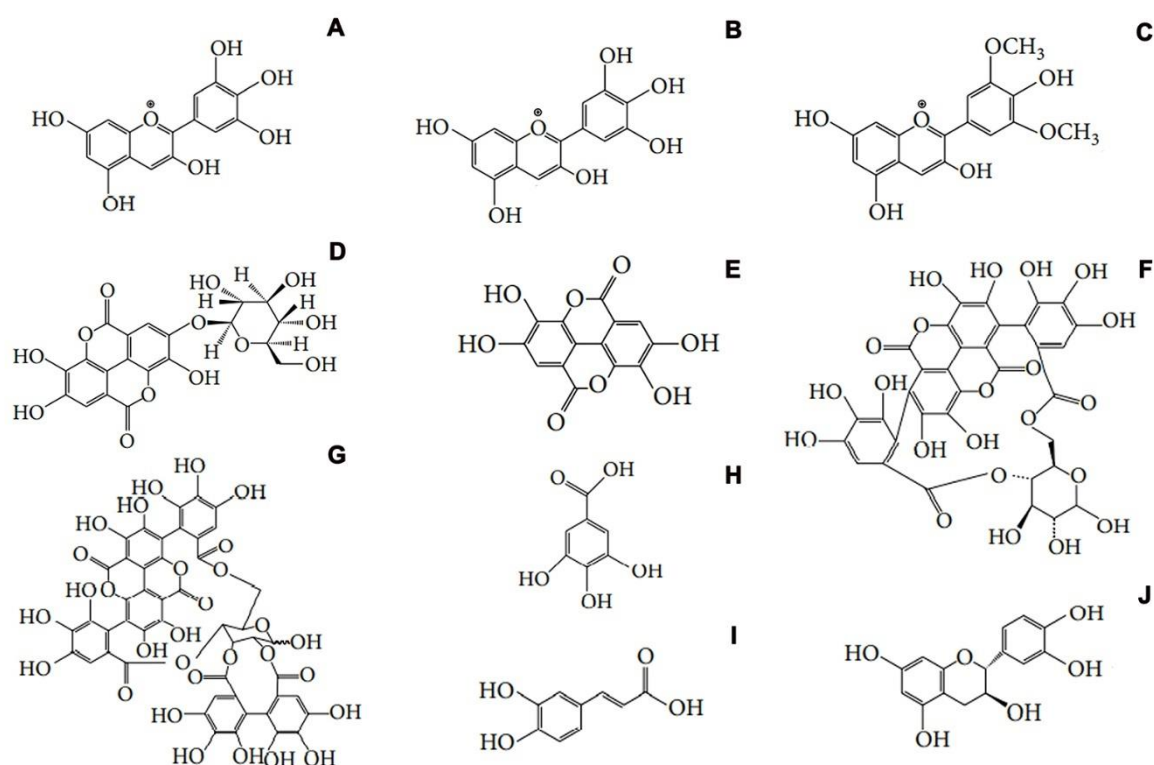
Entre as partes de interesse da planta, as cascas merecem destaque, sendo caracterizadas pela presença de rede interna de membranas e fibras (PHATAK; MADAVGANE; KUKARNI, 2016; VILADOMIU, et al. 2013). A fruta é rica em muitos compostos, entre eles estão Compostos fenólicos, flavonoides, polissacarídeos complexos e minerais (CHARALAMPPIA; KOUTELIDAKIS, 2017; CHIDAMBARA et al., 2004; LANSKY; NEWMAN, 2007; MONEIM, 2012; VILADOMIU, et al. 2013). As estruturas químicas dos principais metabólitos das cascas de romã são apresentadas na Figura 4. Estes compostos estão presentes tanto no suco quanto em extratos obtidos em diferentes solventes e sistemas solventes, tais como água, etanol, solução

hidroetanólica, metanol, acetonitrila, entre outros (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011; STALIKAS, 2007).

Aos diferentes extratos das cascas do romã são atribuídas atividades farmacológicas diversas, principalmente, antisséptica, antioxidante, anti-inflamatória, antiparasitária e cicatrizante (CHIDAMBRA et al., 2004; FLECK et al., 2016; HAYOUNI et al., 2011; NEMA et al., 2013). Dados sugerem também a existência de ação antimicrobiana significativa sobre a proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia* e *Klebsiella*, além de fungos como a *Candida* (MACEDO et al., 2020; PAI et al., 2011).

As cascas representam cerca de 60% da massa residual gerada após a extração do suco de romã, sendo considerada, juntamente com as sementes (11%), um agro-resíduo comumente descartado pelas indústrias. Em escala global, são gerados anualmente cerca de 1,62 milhões de toneladas de biorresíduos provenientes das cascas de romãs utilizadas na produção de suco (MAGANGANA et al., 2020; PATHAK; MANDAVGANE; KULKARNI, 2016; VILADOMIU, et al. 2013). Outros produtos preparados a partir do romã são bebidas gaseificadas e geleias (SAMSURI et al., 2020). Os subprodutos agrícolas e os resíduos do processamento de frutos se acumulam em áreas adjacentes aos locais de produção. Como consequência da putrefação desse material, pode ocorrer contaminação das águas superficiais e do solo, inclusive com a formação de compostos perigosos, como o metano (FAZIO et al., 2018). Uma alternativa para o gerenciamento desse tipo de resíduo, especialmente daqueles que contém alto teor de compostos potencialmente recuperáveis, é sua conversão em produtos de alto valor agregado (FAZIO et al., 2018; GERVASI et al., 2018). Uma vez que a casca de romã é constituída por inúmeros compostos bioativos de interesse farmacológico, há um grande potencial da casca ser convertida em produtos de valor agregado tais como insumos para uso nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (CHARALAMPIA; KOUTELIDAKIS, et al., 2017; FAZIO et al., 2018; GULLON et al., 2020; KO; DADMOHAMMADI; ABBASPOURRAD, 2021; SHABTAY et al., 2008). Portanto, justifica-se o interesse no preparo de formulações farmacêuticas baseadas em compostos bioativos extraídos das cascas de romã.

Figura 4- Estrutura geral dos compostos fenólicos de maior importância presentes nas cascas do romã: (a) cianidina, (b) delphinidina, (c) perlagonidina, (d) ácido eláiglico-glicosídeo, (e) ácido eláigico, (f) punicalina, (g) punicalagina, (h) ácido gálico, (i) ácido cafeico e (j) catequina



Fonte: VILADOMIU et al., 2013 (Adaptado).

2.3.1 Extratos de romã em produtos com finalidade antimicrobiana e cicatrizante

Muitas pesquisas propõem o uso de diferentes extratos de romã, provenientes de partes variadas da planta, para o tratamento de lesões cutâneas em função tanto da atividade antimicrobiana quanto da atividade antioxidante e anti-inflamatória, o que pode favorecer, de maneira geral, a eficácia do processo de cicatrização. A seguir são apresentados relatos do uso de romã com finalidade cicatrizante, empregando métodos *in vitro* e *in vivo*, em animais e no homem.

Murthy *et al.* (2004) observaram que a aplicação de gel de carbômero 940 contendo 10% p/p de extrato metanólico do pericarpo do romã acelerou a reparação

tecidual em excisões de pele em ratos Wistar, em cerca de 7 dias, quando comparados aos animais do grupo controle. A atividade de cicatrização de feridas foi avaliada pela medição da contração da pele e pela estimativa do conteúdo de colágeno em termos de conteúdo de hidroxiprolina.

Pirbalouti *et al.* (2010) avaliou a atividade cicatrizante de extratos etanólicos das flores de malva 5,6% e romã 10% associados na cicatrização de lesões induzidas em ratos Wistar. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em grupos tratados e não-tratados, utilizando pomada base como controle negativo, pomada de nitrofurazona como controle positivo e com os extratos sozinhos ou associados. Medidas da área das feridas e análises histopatológicas das lesões foram utilizadas. As lesões em animais diabéticos tratadas com extrato de malva associado ao de romã apresentaram redução significativa na área quando comparadas aos dos animais do grupo controle. Além disso, estudos histológicos de tecido da lesão obtido nos dias 9 e 18 após administração dos extratos associados mostraram aumento da organização das fibras de colágeno, aumento de fibroblastos e presença de poucas células inflamatórias. Tais achados indicam que os extratos estimularam, efetivamente, a contração das feridas.

Hayouni *et al.* (2011) avaliaram o sucesso da administração de uma pomada oleosa, preparada a partir de parafina, contendo extrato metanólico do pericarpo do romã a 5% p/p, na cicatrização de feridas em porquinhos da Índia. Os autores observaram, mediante avaliação da contração da ferida e avaliação do período de epitelização, que ocorreu cicatrização completa das lesões no 20º dia do tratamento, sugerindo a ocorrência de cicatrização total das lesões.

Nayak *et al.* (2012) realizaram um estudo no qual avaliaram o uso de extrato aquoso de cascas de romã veiculado em vaselina líquida na concentração (1:1) sobre a cicatrização de feridas induzidas em ratos. Os animais foram divididos em 3 grupos e foram tratados durante 15 dias. Os animais do primeiro grupo receberam apenas a vaselina líquida (controle negativo); do grupo 2, foram tratados com o extrato em vaselina, na concentração de 100 mg/Kg; e, do grupo 3, foram tratados com pomada de mupirocina a 100 mg/kg (controle positivo). Os autores observaram que animais tratados com a vaselina contendo o extrato exibiram redução de 95% da área da ferida em comparação com os controles (84%), o que foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$). Ainda, a re-epitelização foi mais rápida nestes mesmos animais.

Nema *et al.* (2013) pesquisaram a capacidade cicatrizante de uma pomada de lanovaselina contendo extrato metanólico de cascas de romã a 10 e 15% p/p na cicatrização de feridas em ratos Wistar. Pomada de nitrofurazona foi utilizada como controle positivo. Segundo os autores, as pomadas contendo o extrato em ambas as concentrações estudadas apresentaram maior habilidade de promover a contração das feridas em comparação ao grupo controle, sendo maior a contração para a concentração mais elevada do extrato. O tempo de fechamento das feridas também foi reduzido nos animais tratados com a pomada a 15% p/p.

Mo *et al.* (2013) investigaram a atividade cicatrizante de uma pomada contendo extrato padronizado de casca de romã (ácido elágico a 13%), em feridas induzidas em ratos Wistar. Creme de triancinolona 0,1% e gel de diclofenaco 1% foram usados como medicamentos de referência (controle positivo) e pomada base foi empregada como controle negativo. Quando comparados os resultados dos grupos tratado e controles, os autores observaram que o uso da pomada contendo o extrato acelerou a cicatrização das feridas em comparação aos demais.

Nascimento-Junior *et al.* (2016), investigaram a efetividade do suco da polpa e do chá das cascas dos frutos de romã na cicatrização de lesões induzidas por queimadura no dorso da língua de ratos Wistar, confeccionadas com instrumental odontológico padrão. Segundo os autores, o chá da casca aplicado localmente associado à ingestão do suco, se mostrou eficaz no tratamento das lesões, favorecendo a re-epitalização e a cicatrização total após 14 dias.

Bohneberger e Ramos (2018) avaliaram a ação do óleo de copaíba 5% associado ou não ao extrato etanólico de romã e incorporados em pomada 10%, no processo de cicatrização de lesões induzidas em línguas de ratos Wistar. O tratamento consistiu na aplicação das pomadas sobre as lesões durante 5 dias. Após sacrifício dos animais nos dias 3, 7 e 14, foram confeccionadas lâminas histológicas das lesões. Nos animais tratados com a pomada de romã foi observada redução na ocorrência de inflamação aguda e em 80% dos casos, foi observada cicatrização das lesões. Em 20% foi notada ocorrência de atrofia epitelial, significando cicatrização e fechamento da ferida.

Em um trabalho recente Zekry, Abdellatif e Azzazy (2020), relataram o preparo de filmes eletrofiados baseados em matriz de poli(álcool vinílico) contendo extrato metanólico de casca de romã a 1 e 2,5% p/p, associado ao mel. A citotoxicidade, a atividade antimicrobiana e a eficácia cicatrizante dos filmes foram pesquisadas. Os

autores observaram que os filmes se mostraram atóxicos, com atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* e *E. coli* e que induziram o aumento nas porcentagens de fechamento de feridas induzidas em ratos, em comparação aos grupos controle. Quando o veneno de abelha a 0,01% p/p foi incorporado nestes mesmos filmes, a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e os padrões histológicos das lesões apresentaram melhora. Segundo os autores, os filmes de nanofibras de extrato de romã e mel são promissores para o uso na cicatrização de feridas.

Batista *et al.* (2020) prepararam filmes eletrofiados contendo 1,25% p/p do mesmo extrato de casca de romã utilizado no presente trabalho e pesquisaram a biocompatibilidade e a atividade antimicrobiana preliminares dos filmes, empregando métodos *in vitro*. O filme apresentou hemocompatibilidade adequada e a inibição do crescimento foi observada para as cepas testadas, exceto para *E. coli*. Costa *et al.* (2020), utilizaram o mesmo extrato para preparar filmes poliméricos a partir de blendas poliméricas entre o poli(álcool vinílico), amido e poli(ácido acrílico), utilizando o método de moldagem e evaporação do solvente. De acordo com os autores, os filmes contendo o extrato a 1,25% p/p se mostraram não tóxicos e modularam positivamente a proliferação celular em ensaios *in vitro*, pelo método “*scratch assay*”. Ainda, os filmes apresentaram atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, se mostrando promissores para uso como antimicrobiano e cicatrizante.

2.4 Géis

As formas farmacêuticas usualmente empregadas no manejo farmacológico das lesões são as convencionais, tais como pó, solução, creme, loção, pomada, gel, espuma e filme polimérico (LEITE; OLIVEIRA 2018). Segundo More e Arruda (2007), para o adequado manejo farmacológico de feridas, é necessário o desenvolvimento de formulações que sejam de fácil aplicação e remoção, com o objetivo de minimizar o desconforto e permitir o exame das lesões sem a retirada do produto. Entre estas formas de apresentação se destacam os géis. Os géis hidrofílicos têm boa aceitação para uso no preparo de medicamentos para o tratamento de lesões por serem de fácil espalhamento e remoção e, por manterem a umidade adequada no local de aplicação, favorecendo a cicatrização (CORRÊA *et al.*, 2005).

Géis podem ser definidos como formas farmacêuticas semissólidas, preparadas a partir de um polímero espessante (agente gelificante) disperso em água. O agente gelificante é responsável pelo fornecimento de viscosidade para os sistemas, que são formados por partículas de dimensões coloidais. Além do gelificante, géis podem conter conservantes, sequestrantes e antioxidantes, consoante o tipo de ingrediente farmacologicamente ativo a ser incorporado na formulação. Ainda, podem conter umectantes, tamponantes ou modificadores de pH, conforme a necessidade e a indicação de uso (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Um dos principais polímeros gelificantes utilizados na área farmacêutica é o carbômero, conhecido comercialmente como Carbopol® ou Acrypol®, um polímero derivado do poli(ácido acrílico) que forma géis aquosos aniônicos, incolores e estáveis em pH entre 6 e 7. O carbômero tem sua monografia inscrita no *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, sendo seu uso considerado seguro nas condições corretas de uso (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013; ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Uma vez que o carbômero é um polímero polieletrólítico de natureza aniônica, deve ser neutralizado para atingir uma alta viscosidade, além de transparência e brilho máximos (VARGES et al., 2019). Frequentemente, dispersões aquosas de carbômeros são neutralizadas com alcalinizantes comuns, levando à formação de um sal a partir do polímero ácido. Quando neutralizadas, as cadeias poliméricas interconectadas pela presença de reticulações começam a se hidratar e se desenrolam parcialmente, devido à repulsão eletrostática, formando aglomerados irreversíveis, mantidos pela presença de cadeias ramificadas de poliacrilato de alto peso molecular. A formação destes emaranhados intercadeias impede o fluxo a baixas tensões de cisalhamento, mantendo a formação dos géis. Redução do pH a valores inferiores a 5 ou aumento acima de 8 podem levar à quebra destes emaranhados, com fluidificação dos géis. Durante a hidratação, as cadeias podem aumentar em até 10 vezes seu diâmetro original (KIM et al., 2003; VARGES et al., 2019).

Segundo o *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, o carbômero é um polímero, que possui classificações de acordo com seu peso molecular, que apresenta viscosidades variadas em função da densidade das cadeias interconectadas. Atualmente, os principais tipos de carbômero utilizados na fabricação de medicamentos e cosméticos são o 940, 980, 996 e o Ultrez®, sendo preferidos por não utilizarem solventes orgânicos como o metanol durante o processo de polimerização (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Malheiros *et al.* (2011), testaram o efeito cicatrizante de extrato de *Chamomilla recutita* (L.) a 10% p/p incorporado em gel de carbômero 1% p/p em creme base (cera automeulsionante não iônica a 8% p/p) sobre lesões em ratos Wistar. Na análise macroscópica, as lesões foram examinadas para verificar a presença de hemorragia, de extensão de crostas (total, parcial ou ausente), de secreção e de reparação tecidual (completa, parcial ou ausente). Na análise do diâmetro das lesões, verificou-se que houve diferença significativa após 7 dias entre os animais dos grupos tratados com gel de camomila quando comparado com o creme de camomila ($p < 0,001$), demonstrando que o gel de camomila apresentou maior efetividade na reparação tecidual ao longo de 14 dias. Os autores atribuíram a maior efetividade do gel devido a características umectantes e hidratantes do gel.

Yan *et al.* (2013) investigaram o efeito de um gel carbômero 940 contendo 30% p/p de extrato etanólico de cascas de romã na cicatrização de feridas induzidas em ratos diabéticos e observaram a ocorrência do fechamento da ferida nos animais do grupo tratado. O exame histológico mostrou a ocorrência de aumento da infiltração de fibroblastos, produção de colágeno, vascularização e re-epitelização na área da ferida.

Monteiro *et al.* (2015), avaliaram o processo de cicatrização de lesões cutâneas em ratos diante o gel de carbômero a 2% contendo extrato hidroetanólico das folhas de *Moringa oleifera* a 7%. Neste estudo foram utilizados 15 ratos wistar machos, divididos em grupos de acordo com o tempo de tratamento, G7 (7 dias), G14 (14 dias) e G21 (21 dias). Foram realizadas duas lesões no dorso dos animais, sendo que uma recebeu apenas o gel base (controle negativo), enquanto a outra recebeu o gel com o extrato a 7%. Após 21 dias foi observado formação de colágeno nas lesões tratadas com o gel contendo o extrato.

Alawdi *et al.* (2019) prepararam gel carbômero a 0,8% contendo extratos das plantas *Withania somnifera* (ginseng indiano), *Allium sativum* (alho) e *Curcuma longa* (açafrão) a 1% a fim de investigar a atividade cicatrizante das mesmas sobre feridas cutâneas em coelhos. Neste estudo foram utilizados 30 coelhos machos adultos e divididos em grupos de 6 animais, tratados com os géis dos extratos separadamente, com ciprofloxacino (controle positivo) e com gel base (controle negativo). Os animais receberam o tratamento uma vez ao dia por um período de 14 a 18 dias. Os animais que receberam o antibiótico apresentaram a cicatrização mais lenta, seguido pelo grupo tratado com gel base. Nos animais tratados com os géis dos extratos a

cicatrização foi mais rápida (14 dias), não havendo diferença significativa entre si e entre os mesmos.

Em outro estudo realizado por Duque *et al.* (2016) foi pesquisada a cicatrização de feridas *in vivo* e atividade antioxidante *in vitro* de géis de carbômero a 1% contendo extrato de *Cecropia pachystachya* (embaúba) em acetato de etila, a 2% e 5%. A atividade cicatrizante foi avaliada durante 21 dias em ratos machos da raça Wistar, divididos em 3 grupos. Análises histopatológicas foram realizadas em lâminas preparadas nos dias 3^o, 7^o, 14^o e 21^o de avaliação. Os autores observaram que os animais tratados com o extrato a 5% apresentaram edema e infiltrado inflamatório com menor intensidade que aqueles dos demais grupos. A presença de tecido reparo foi notada nos animais tratados com ambas as concentrações do extrato quando comparados aos animais do grupo controle (sem tratamento).

Sengupta (2017) investigou a atividade cicatrizante de géis de carbômero contendo extrato de hidroetanólico de *Calêndula officinalis* (CE) e *Ocimum basilicum* Linn (OE), sozinhos ou associados, ambos a 2,5%. A avaliação da cicatrização foi pesquisada pela contração da área da ferida e os resultados mostraram que houve aumento significativo na atividade cicatrização, com maior redução da área, nos animais tratados com os géis contendo os extratos em comparação com aqueles que receberam o tratamento com o controle (gel base).

A incorporação de substâncias ativas em géis, especialmente os iônicos, pode provocar variação na estabilidade dos mesmos, motivo pelo qual deve ser feito um rigoroso acompanhamento da formulação após o preparo e ao longo do tempo (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Segundo requerimentos farmacopeicos e regulatórios, em protocolos de delineamento e avaliação da qualidade de produtos semissólidos, os seguintes atributos de qualidade devem ser avaliados: aparência, pH, pesquisa de instabilidade frente a condições de estresse térmico e mecânico, densidade específica, viscosidade aparente, dureza, adesividade e teor do ingrediente ativo de interesse. Além disso, atributos relacionados à sensação tátil, como toque, conteúdo de água, espalhabilidade e o odor também devem ser avaliados, uma vez que são essenciais para a aceitação dos produtos. Além da análise sensorial e de características físico-químicas, a avaliação da qualidade microbiológica dos produtos também é requerida (ISAAC, et al., 2008)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi preparar um gel de carbômero contendo extrato bruto seco das cascas de romã (EBSCR) com potencial atividade antimicrobiana com vistas ao uso no manejo de lesões cutâneas de cães, com o intuito de fundamentar o interesse pela agregação de valor à biorresíduos do romã oriundo da agroindústria.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química do EBSCR utilizando métodos qualitativos e quantitativos;
- Determinar a concentração de interesse do EBSCR no gel mediante pesquisa da atividade antimicrobiana *in vitro*;
- Avaliar a estabilidade preliminar do produto ao longo de 90 dias, em amostras armazenados em temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e sob refrigeração ($5 \pm 2^{\circ} \text{C}$);
- Determinar o teor de fenóis totais no gel mantido em temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e sob refrigeração ($5 \pm 2^{\circ} \text{C}$), nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias;
- Avaliar a qualidade microbiológica do produto armazenado em temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e sob refrigeração ($5 \pm 2^{\circ} \text{C}$), nos tempos 0 e 90 dias;
- Pesquisar a manutenção da eficácia antimicrobiana nos produtos armazenados em temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e sob refrigeração ($5 \pm 2^{\circ} \text{C}$), nos tempos 0 e 30 dias.

4. REFERÊNCIAS

ALAWDI, S.H.; SHEHAB, M.; AL-MEKHLAFI, A. G. Formulation of herbal gel preparations from medicinal plants and evaluation of their wound healing activities. **Saudi Journal of Biomedical Research**. v.4, n.8, p. 279-284, 2019. DOI:10.21276/sjbr.2019.4.8.1

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9ª Ed., Porto Alegre; Artmed, 2016. 716p.

ALVES, F. S. Diagnóstico e tratamento das alterações de queratinização. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v.71, p. 73-75, 2013.

ALVES, R.C.; KOMMERS, G.D.; SOUZA, A.P. Candidose sistêmica em cães associada à cinomose. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.48, n.1, p.1–7, 2020. DOI:10.22456/1679-9216.103056

AMALSADVALA, T.; SWAIM, S. F. Management of hard-to-heal wounds. **The Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**. v.36, n.1, p.693-711, 2006. DOI: 10.1016/j.cvsm.2006.02.002

ARAÚJO, L. U.; GRABE-GUIMARÃES, A.; MOSQUEIRA, V.C.F.; CARNEIRO, C.M.; SILVA-BARCELLOS, N.M. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 5, p. 460-461, 2010. DOI:10.1590/S0102-86502010000500014

ARIAS, M. V. B.; BATTAGLIA, L.D.A.; AIELLO, G. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 861, 2008.

BACKES, D.; MARCHAND, E.; SPARVOLI, J.; MOURA, R.; MARTIM, S.; BRANCO, Z. Eficácia do uso de açúcar e de mel na cicatrização de feridas cutâneas: uma revisão sistemática. **Vittale**, v. 17, n. 1, p. 41–49, 2005. DOI:10.14295/vittalle.v17i1.7611

BATISTA, S.V.; SILVA, T.M.; SALOMÃO, S.B.; BASTOS, K.A.; SOUZA, S.O.L.; COTRIM, M.A.P.; ORÉFICE, R.L.; DE ANDRADE, S.F.; CARETA, F.P., SEVERI, J.A.; RESENDE, J.A.; OLIVEIRA VILLANOVA, J.C. *In vitro* activity of pomegranate peel extract alone and in electrospun poly(vinyl alcohol)/sodium alginate matrix. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**. v.17, n.1, p.1–19. DOI:10.19277/BBR.17.2.239

BENTUBO, H.D.L.; GAMBALE, W.; FISCHMAN, O. Leveduras isoladas do pelame de cães saudáveis que vivem em regime domiciliar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.62, n.1, p.1018–1021, 2010. DOI:10.1590/S0102-09352010000400039

BERBERT, L. R. H. Efeitos colaterais de anti-inflamatórios não esteróides

em cães e gatos. Orientador: Luiz Fernando Lucas Ferreira. 42f. Monografia (Pós-Graduação Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais). Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, 2004.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653–3680, 2015. DOI: 10.1002/jps.24610

BOHNEBERGER, G.; RAMOS, G. de O. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE FITOTERÁPICOS NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS BUCAIS INDUZIDAS EM RATOS WISTAR. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão**. 2018. Disponível em: <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/siepe/article/view/18122>. Acesso em: 18 ago. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2ª ed. Brasília: ANVISA. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas**. 2ª ed. Brasília: ANVISA. 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2006. Acesso: em 08/06/2020 Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, 2009a. Acesso em: 02/08/2020. 2015. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Espécies vegetais. Brasília, 2009b. Acesso: em 08/06/2020 Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>.

BRITO, E.H.S; FONTENELLE, R.O.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, v.39, n.1 p.2655–2664, 2009. DOI:10.1590/s0103-84782009000900046

CAMPOS, J.R.; CARLI, L.E.; COTA, L.O. M. Therapeutic effects of the use of pomegranate products (*Punica granatum*) as adjuvant in the treatment of periodontal diseases: a review of the literature. **Periodontia**, v.28, n.2, p.32–42, 2018.

CAPELLA, S.O.; ANDRADE JUNIOR, A.G.; KRUG, F.D.M.; SILVA, E.C.; PIÑEIRO, M.B.C.; NOBRE, M. O. Lesões cutâneas traumática em pequenos animais: características e tratamentos. **Brazilian Applied Science Review**. v. 4, n. 2, p.459–467, 2020. DOI: 10.34115/basrv4n2-005

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MELUSSI, M.; ZAMARIAN, T.P.; CARNIELLI, C.M.; JÚNIOR, J.C.M.F. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos.

Archives of Veterinary Science. v.16, n.2, p.66-74, 2011.
DOI:10.5380/avs.v16i2.18482

CHARALAMPPIA, D.; KOUTELIDAKIS, A. From pomegranate processing by-products to innovative value added functional ingredients and bio-based products with several applications in food sector. **BAOJ Biotechnology**, v.3, n1, p.1-7, 2017.

CHIDAMBARA, M. K.; REDDY, V. K.; VEIGAS, J. M.; MURTHY, U. D. Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. **Journal of Medicinal Food**, v.7, n.2, p.256-259, 2004. DOI: 10.1089 / 1096620041224111

CHRISTAKI, E.V.; BONOS, E.M.; FLOROU-PANERI, P.C. Dietary benefits of pomegranates in humans and animals. **Journal Food Agriculture**, v.9, n.1, p.142–144, 2011.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B., IGNÁCIO, R.F., LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p.73-78, 2005. DOI: 10.1590/S1516-93322005000100008

COSTA, Antonio Jaques da Silva et al. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATIZANTE A BASE DE ROMÃ (PUNICA GRANATUM), CONFREI (SYMPHYTUM OFFICINALE) E CALÊNDULA (CALENDULA OFFICINALE). **Mostra Científica da Farmácia**, v. 6, n. 1, 2019. ISSN 2358-9124. Disponível em: <<http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostracientificafarmacia/article/view/3539>>. Acesso em: 18 de agosto 2021.

COSTA, N.N.; DE FARIA LOPES, L.; FERREIRA, D.F.; PRADO, E.M.L.; SEVERI, J.A.; RESENDE, J.A.; CARETA, F.P., FERREIRA, M.C.P.; CARREIRA, L.G.; DE SOUZA, S.O.L.; COTRIM, M.A.P.; BOEING, T.; ANDRADE, S.F.; ORÉFICE, R.L.; VILLANOVA, J.C.O. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: *In vitro* analysis and physicochemical evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v.109, n.1, p.110643-11702, 2020. DOI:10.1016/j.msec.2020.110643

DEGÁSPARI, C. H.; DUTRA, A. P. C. Propriedades fitoterápicas da romã (*Punica granatum* L.). **Visão Acadêmica**, v.12, n.1, p.36–46, 2011. DOI: 10.5380/acd.v12i1.27237

DOS SANTOS, I. F. C.; GROSSO, S.L.S.; BAMBO, O.B.; NHAMBIRRE, A.P.; CARDOSO, J.M.M.; SCHMIDT, E.M. DOS S.; MARUJO, R.B. Mel e açúcar mascavo na cicatrização de feridas. **Ciência Rural**, v.42, n.12, p.2219–2224, 2012. DOI: 10.1590/S0103-84782012001200018

DUQUE, A. P. N.; PINTO, N.C.C.; MENDES, R.F.; SILVA, J.M.; ARAGÃO, D.M.O.; CASTAÑON, M.C.M.N.; SCIO, E. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 128–138, 2016. DOI:10.1111/jphp.12496

FAHIE, M. A.; SHETTKO, D. Evidence-based wound management: a systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelialization. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 37, n. 3, p. 559–577, 2007. DOI: 10.1016/j.cvsm.2007.02.001

FALANGA, V. Wound bed preparation and the role of enzymes: a case for multiple actions of therapeutic agents. **Wounds**. v.14, n.2, p.47-57, 2002.

FARIA, M. T.; PEREIRA, S. M. DE F. Avaliação da atividade antioxidante e características físico-químicas de polpa de romã (*Punica Granatum L.*). **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 14, n. 2, p. 20-27, 2019. DOI:10.29184/1980-7813.rcfmc.223.vol.14.n2.2019

FAZIO, A.; IACOPETTA, D.; LA TORRE, C.; CERAMELLA, J.; MUIÀ, N.; CATALANO, A.; SINICROPI, M. S. Finding solutions for agricultural wastes: antioxidant and antitumor properties of pomegranate Akko peel extracts and β -glucans recovery. **Food & Function**, v.9, n.1, p.6619-6632, 2018. DOI:10.1039/c8fo01394b

FERNANDES, R. AP. **Fitossíntese de nanopartículas de prata a partir de extrato de cascas de romã e desenvolvimento de formulação para tratamento de feridas: avaliação antimicrobiana, citotóxica e potencial cicatrizante em um modelo in vivo**. 120f. Tese (Doutorado em ciência odontológica) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, 2017.

FLECK, A.; CABRAL, P. F.; VIEIRA, F. F.; PINHEIRO, D. A.; PEREIRA, C. R.; SANTOS, W. C.; MACHADO, T. B. *Punica granatum L.* hydrogel for wound care treatment: From case study to phytomedicine standardization. **Molecules**, v. 21, n. 8, p.1059, 2016. DOI: doi:10.3390/molecules21081059

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3ª ed. São Paulo: EDUSP. 2003.

FOSSUM, T. W. **Surgery of the integumentary system**. 4ª ed. Missouri: Elsevier. 2013.

GERVASI, T.; PELLIZZERI, V.; CALABRESE, G.; DI BELLA G.; CICERO, N.; DUGO, G. Production of single cell protein (scp) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. **Natural Product Research**, v.32, n.6, p.648-653, 2018. DOI:10.1080/14786419.2017.1332617

GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira**. 13ª ed. São Paulo: Nobel. 2007.

GONÇALVES, MA.N.B. **Estudo comparativo de processo cicatricial cutâneo em ratos com uso de solução de papaína a 2% e laser de baixa potência**. Orientador: Kelly Cristiane Ito Yamauch. 60f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal.) - Programa de pós-graduação em biociência animal, Universidade de Cuiabá. Cuiabá, 2017.

GULLON, B. et al. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of

pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. **Food Control**, v. 59, p. 94–98, jan. 2016. DOI: 10.1016 / j.foodcont.2015.05.025

HAMILTON, L.; KOŽÁR, M. Efficiency of enzymatic debridement in the healing process of chronic wounds in small animal practice. **Folia Veterinaria**, v.61, n.1, p.38-42, 2017. DOI: 10.1515/fv-2017-0006

HAYOUNI, E.A.; MILED, K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; IWASKI, H.; OKU, H.; MATSUI, T.; LIMAM, F.; HAMDY, M. Phytomedicine hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum L.* peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 11, p. 976-984, 2011. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.02.011

HEDLUND, C. S. **Cirurgia do sistema tegumentar**. In: FOSSUM, T.W. Cirurgia de pequenos animais. 3ªed. São Luís. Missouri: Elsevier. 2007. p.94.

HENGEL, T. V.; HAAR, G. T.; KIRPENSTEIJN, J. **Wound management: a new protocol for dogs and cats**. Reconstructive surgery and wound management of the dog and cat. London: Manson Publishing, 2013.

HILL, P.B., LO, A., EDEN, C.A.N., HUNTLEY, S., MOREY, V., RAMSEY, S., RICHARDSON, C., SMITH, D.J., SUTTON, C., TAYLOR, M.D., THORPE, E., TIDMARSH, R., WILLIAMS, V. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice **Veterinary Record**. **Veterinary Record**, v. 158, n. 22, p. 763, 2006. DOI:10.1136/vr.158.16.533

HOPPE, I. C.; GRANICK, M. S. Debridement of chronic wounds: a qualitative systematic review of randomized controlled trials. **Clinics in Plastic Surgery**, v.39, n.3, p.221-228, 2012.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. Uma revisão crítica dos métodos de caracterização de compostos polifenólicos em frutas e vegetais. **Food Chemistry**, v.126, n.4, p.1821–1835, 2011.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.; RÊGO, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B.; FERREIRA, M.C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3-4, p.125-131, 2010. DOI:10.11606/issn.1679-9836.v89i3/4p125-131

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 397-405, 2012. DOI:10.1016/j.jep.2012.07.004

KAUR, G.; JABBAR, Z.; ATHAR, M.; ALAM, M.S.; *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 984–993, 2006. DOI: 10.1016/j.fct.2005.12.001

KIM, J. Y.; SONG, J.Y; LEE, E.J.; PARK, S.K. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**, v.281, p. 614-623, 2003.DOI: 10.1007/s00396-002-0808-7

KIRBY, R.; GELLAT, K. N.; WILKINS, P. A. **Wound management**. In: MSD Veterinary Manual, 2011. Acess em: 21/08/2020. Disponível em:<<https://www.msdsvetmanual.com/special-pet-topics/emergencies/wound-management>>.

KNEGT, F.T.G. VIEIRA, C. D. **Aspectos epidemiológicos e microbiológicos da espécie Staphylococcus pseudintermedius nas piодermites caninas: uma revisão da literatura**. Orientador: Cristina Dutra Vieira.39f. TCC (Especialista em Microbiologia.) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

KO, K.; DADMOHAMMADI, Y.; ABBASPOURRAD, A. Nutritional and bioactive components of pomegranate waste used in food and cosmetic applications: a review. **Foods**, v.10, n.3, p.657, 2021. DOI:10.3390/foods10030657

LACERDA, L.C.C. **Bactérias associadas à feridas cutâneas agudas e crônicas em cães**. Orientador: Paola Castro Moraes. 82f. Tese (Doutorado em medicina veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2018.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia**, v.69, p.355-367, 2011.

LEE, A. H.; SWAIM, S. F.; YANG, S. T.; WILKEN, L. O. Effects of gentamicin solution and cream on the healing of open wounds. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.8, p.87–92,1984.

LEITE, V. R. L. **Farmacologia das feridas: uma revisão de literatura**. Orientador: Fernando de Sousa Oliveira. 58f. TCC (Curso de Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2018.

LLOYD, D. H.; VIAC, J.; WERLING, D.; RÈME, C. A.; GATTO, H. Role of sugars in surface microbe-host interactions and immune reaction modulation. **Veterinary dermatology**, v.18, n.4, p.197-204, 2007. DOI:10.1111/j.1365-3164.2007.00594.x

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008.

LOZIER, S.; POPE, E.; BERG, J. Effects of four preparations of 0.05% chlorhexidine diacetate on wound healing in dogs. **Veterinary Surgery**, v.21, n.2, p.107-12, 1992. DOI: 10.1111/j.1532-950x.1992.tb00025.x.

ALTOÉ, L.S. Efeito do uso de antibióticos no processo de reparo cutâneo em modelo animal. 2019. 78 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2019.

MACEDO, D.R.R.B.; SOUZA, H.T.N.; GUIMARÃES, M.V. Ação antimicrobiana e anti-inflamatória da *Punica granatum L.* (romã) no tratamento da doença periodontal: uma revisão de literatura. **Revista Saúde**, v.14, n.1 p.52-58, 2020. DOI:10.33947/1982-3282-v14n1-2-4351

MACEDO, D.R.R.B.D.; SOUZA, H.T.N.; GUIMARÃES, M.V. Ação antimicrobiana e anti-inflamatória da *Punica granatum L.* (romã) no tratamento da doença periodontal: uma revisão de literatura. **Revista Saúde** v.14, n.1, p.52- 58, 2020. DOI:10.33947/1982-3282-v14n1-2-4351

MACHADO, T.B.; PINTO, A. V.; PINTO, M.C.F.R.; LEAL, I.C.R.; SILVA, M.G.; AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M.; NETTO-DOSSANTOS, K.R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, n.1, p.279–284, 2003. DOI:10.1016/S0924-8579(02)00349-7

MAGANGANA, T.P.; MAKUNGA, N.P.; FAWOLE, O.A.; OPARA, U.L. Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel waste: a review. **Molecules**, v.25, n.20, p.1-34. 2020. DOI:10.3390/molecules25204690

MALHEIROS, F. B. M.; GARCIA, A.C.; SOUZA, L.M.A.; SILVA, C.A. Efeito cicatrizante do extrato fluido da *Chamomilla recutita (L.)* rauschert em fórmulas magistrais semissólidas aplicadas em lesões cutâneas de ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 10, n. 3, p. 425-432, 2011. DOI: 10.5585/conssaude.v10i3.2541

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, É.P., SANT'ANA MANDELBAUM, M.H., Cicatrization: Current concepts and auxiliary resources. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.4, p.393-412, 2003. DOI:10.1590/s0365-05962003000400002

MATOUSEK, J. L. et al. The effects of four acidifying sprays, vinegar and water on canine cutaneous pH levels. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.39, n.1, p.29-33, 2003.(b) DOI10.5326/0390029

MATOUSEK, J. L.; CAMPBELL, K.L; KAKOMA, I.; SOLTER, P.F.; SCHAEFFER D. Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.67, n.1, p. 56-59, 2003.

MICKELSON, M. A.; MANS, C.; COLOPY, S. A. Principles of Wound Management and Wound Healing in Exotic Pets. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 33-53, 2016. DOI:10.1016/j.cvex.2015.08.002

MO, J.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; NITIRUANGJARAS, A.; REANMONGKOL, W. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 901-908, 2013. DOI: 10.1016/j.jep.2013.05.040

MONTEIRO, E. A. et al. Avaliação do extrato hidroetanólico das folhas de *Moringa oleifera* no processo de cicatrização em lesões cutâneas de ratos. **Revista de Saúde e Biologia**. v. 10, n. 3, p. 25-34, 2015.

MOORTHY, K.; PUNITHA, T.; VINODHINI, R.; THIPPAN, B. Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. (pericarp). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 9, p. 474-479, 2013. DOI: 10.5897/JMPR12.953

MORE, L. F.; ARRUDA, S. S. **Protocolo de cuidados de feridas**. Secretaria Municipal de Saúde de Florianópolis. Florianópolis: IOESC, 2007. 70 p. Acesso em: 14/08/2020. Disponível em: < http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/26_10_2009_10.46.46.f3edcb3b301c541c121c7786c676685d.pdf >

MURTHY, K. N.; REDDY, V. K.; VEIGAS, J. M.; MURTHY, U. D. Study on wound activity of *Punica granatum* peel. **Journal of Medicinal Food**, v.7, n.2, p.256-259. 2004. DOI: 10.1089/1096620041224111

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J. SANTOS, A.M.T.; SOUZA, A.T.; SANTOS, E.O.; XAVIER, M.R.; MENDES, R.L.; AMORIM, E.L.C. Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n.2, p.423-432, 2016. DOI: 10.1590/1983-084X/15_125

NAYAK, S.B.; RODRIGUES, V.; MAHARAJ, S.; BHOGADI, V.S. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 9, p.857-861, 2013. DOI:10.1089/jmf.2012.0229.

NEMA, N. et al. *In vivo* topical wound healing activity of *punica granatum* peel extract on rats. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v.1, n.2, p.195-200, 2013.

OLIVEIRA, L. P.; VIEIRA, M.S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; VALADARES, M.C.; OLIVEIRA, L.P.; PINHEIRO, R.C.; VIEIRA, M.S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; VALADARES, M.C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p. 201-207, 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000200011

ORSINI, J. A.; DIVERS, T. J. **Equine emergencies- treatment and procedures**. 4^a ed. St. Louis: Elsevier. 2014.

OURO FINO. **Avaliação da eficácia anti-inflamatória do Maxicam[®] solução oral, a base de meloxicam (0,1%), administrado em gatos pela via oral, durante 4 dias consecutivos**. Acesso em: 20/08/2020. Disponível em: <https://vetsmartparsefiles.s3.amazonaws.com/86ca951fd455b04bd61fedf27a25bab6_vetsmart_admin_pdf_file.pdf>.

OZTURK, F.; ERMERTCAN, A. T. Wound healing: a new approach to the topical wound care. **Cutaneous and Ocular Toxicology**. v.30, p.92-95, 2011. DOI:10.3109/15569527.2010.539586

PAIXÃO, G.C.; SIDRIM, J.J.C.; CAMPOS, G.M.M.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G. Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.1, p.568-573, 2001. DOI:10.1590/S0102-09352001000500010

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**. v.187, p.11-6, 2004. DOI: 10.1016/S0002-9610(03)00296-4

PATHAK, P. D.; MANDAVGANE, S. A.; KULKARNI, B. D. Valorization of pomegranate peels: a biorefinery approach. **Waste and Biomass Valorization**, v.8, n.4, p.1127-1137, 2016. DOI:10.1007/s12649-016-9668-0

PEREIRA, H.L.A; RIBEIRO, A. L. S.; CICONELLI, R.M.E. Tratamento com anti-inflamatórios Tópicos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n.3, p. 188-193, 2006.

PINHO, R.; MONZÓN, M. F.; SIMÕES, J. **Dermatologia veterinária em animais de companhia: (I) A pele e seus aspectos relevantes na prática clínica**. v. 5, n. 1, p. 1-2, 2013. Disponível em: <http://veterinaria.com.pt/media/DIR_27001/VCP5-1-2-e2.pdf> Acesso em: 24/06/2020.

PIRBALOUTI, A. G.; AZIZI, S.; KOOHPAYEH, A.; HAMED, B. Wound healing activity of *Malva sylvestris* and *Punica granatum* in alloxan-induced diabetic rats. **Acta Polonae Pharmaceutica Drug Research**, v. 67, n.5, p.511-516, 2010.

PORSANI, M.Y.H.; CARVALHO, L.A.R.; PEREIRA, C.S.; PALUDETTI, M.; ZANGERONIMO, M.G.; PEREIRA, L.J. The use of papain gel cream and sunflower oil in promoting healing in a wound in dogs: three case reports. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.5, p.1201-1206, 2016. DOI: 10.1590/1678-4162-8561

RAHAL, S. C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; TANAKA, C.Y.; GRILLO, T.P.; LEITE, C.A.L. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.1, p.61-67, 2003. DOI: 10.5380/avs.v8i1.4018

RIBEIRO, G.; MARTINS, C.B.; SILVA, M.A.G.; BORGES, V.P.; NETO, J.C.L. Uso tópico de ketanserina na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.1, p.144-148, 2009. DOI: 10.1590/S0102-09352009000100020

RODRIGUES, E. R.; MARTINS, C.H.G.; MORETI, D.L.C.; LOPES, R.A.; VASCONCELOS, M.A.L.; TAVEIRA, P.M.A.; LOPES, M.E. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. XVI. *Punica granatum L.* **Revista Científica da Universidade de Franca**, v.6, n.1, p.79-84, 2006.

DOI:10.26843/investigacao.v6i1.186

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5^a ed. London: Butler & Tanner. 2006.

RUSSO, R.; AUTORE, G.; SEVERINO, L. Pharmaco-Toxicological Aspects of Herbal Drugs Used in Domestic Animals. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1777-1784, 2009. DOI:10.1177/1934578X0900401230

SALAZAR, F.R.; BITENCOURT, M.S. Produtos veterinários dermatológicos manipulados. **Infarma**, v. 21, n. 5, p. 6-9, 2013.

SAMPAIO, C. P. P.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; TRINDADE, L.C.T.; FARIAS, R.E.; PIERIN, R.J.; MARTINS, R.C. Alterações inflamatórias provocadas pelo metronidazol em feridas: estudo experimental em ratos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 8, n. 3, p. 232-237, 2009. DOI: 10.1590/s1677-54492009000300008

SAMSURI, S.; LI, T.; RUSLAN, M.; AMRAN, N. Antioxidant recovery from pomegranate peel waste by integrating maceration and freeze concentration technology. **International Journal of Food Engineering**, v.16, n.10, 2020. DOI: 10.1515/ijfe-2019-0232

SANTANA, G.P.L. **Avaliação do reparo tecidual durante o tratamento tópico com solução de papaína em feridas de camundongos Black**. Orientador: Maria Helena Melo Lima. 65f. Dissertação. (Mestrado em ciências da saúde) - Programa de pós-graduação em enfermagem, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2015.

SANTOS, E.P.; RODRIGUES, F.S.; SANTOS, I.C.R.S.; SILVA, K.C.S.; COUTINHO, G.S.L.; FIRMO, W.D.C.A.; PINHEIRO, A.J.M.C.R. *Punica Granatum L.* (romã) e atividade antimicrobiana contra o biofilme dental: uma revisão bibliográfica. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 23, n. 2, p. 88, 2019. DOI: 10.17921/1415-6938.2019v23n2p88-93

SCOTT, L. Effects of four preparations of 0.05% chlorhexidine diacetate on wound healing in dogs. **Veterinary Surgery**, v.21, n.2, p.107-112, 1992. DOI:10.1111/j.1532-950X.1992.tb00025.x

SENGUPTA, R. Atividade combinada de cicatrização de feridas de folhas de *Calendula officinalis* e manjericão. **Journal Pharmacognosy Phytochemistry**, v.6, n.1, p. 173-176, 2017.

SHABTAY, A.; EITAM, H.; TADMOR, Y.; ORLOV, A.; MEIR, A.; WEINBERG, P.; KEREM, Z. Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.21, p.10063–10070. DOI:10.1021/jf8016095

SILVA, G.; SOUZA, J. H. A.; LIMA, A.E.C.M; SANTOS, L. M.R.; PINHEIRO, J.C.; LEITE, R.B.; BARBOZA, C. A.G.; MACEDO, M. R.C. Atividade antimicrobiana de substâncias fitoterápicas utilizadas no tratamento de afecções bucais: estudo *in*

vitro. **Revista Ciência Plural**, v. 6, n. 2, p. 113-124, 2020. doi:10.21680/2446-7286.2020v6n2ID19095.

SILVA, M. A.G.; CANOLA, P.A.; RIBEIRO A. P.C.; MENDONÇA, C.; TRENTO, T.; SCHMIDT, A.B. Eficácia da alantoína e do óxido de zinco (Alantol®) na cicatrização de feridas em equinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.17, n.3 p.54-54, 2014.

SINGH, K.; JAGGI, A. S; SINGH, N. exploring the ameliorative potential of *punica granatum* in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. **Phytotherapy Research**, v.23, n.11, p.1565-1574, 2009. DOI: 10.1002/ptr.2822

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives of Veterinary Science**. v.16, n.2, p.66-74, 2011. DOI:10.1590/s0103-84782006000200030

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Archives of Veterinary Science**, v.30, n.18, p.3268-3295, 2007.

SWAIM, S. F.; GILLETTE, R. L. An update on wound medications and dressings. **Compendium on Continuing Education for the Practising veterinarian**, v.20, n.11, p.33-44, 1998.

SWAIM, S. F.; RIDDELL, K. P.; MCGUIRE, J. A. Effects of topical medication on the healing of open pad wounds in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.28, p.1-4, 1992.

VARGES, P.R. Varges, P.R.; Costa, C.M.;Fonseca, B.S.; Naccache, M.F.; Souza Mendes, P.R. Rheological characterization of carbômero dispersions in water and in water/glycerol solutions. **Fluids**, v. 4, n.3, p.1-20, 2019. DOI:10.3390/fluids4010003

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005. DOI: 10.1590/s0100-40422005000300026

VIEGI, L.; PIERONI, A.; GUARRERA, P.M.; VANGELISTI, R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, n.2-3, p.221-234, 2003. DOI: 10.1016/j.jep.2003.08.003

VILADOMIU, M. et al. Mecanismos preventivos e profiláticos de ação dos constituintes bioativos da romã. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.1, n.1 p.1-18, 2013. DOI:10.1155/2013/789764

WILKINSON G, HARVEY R. **Atlas en color de dermatología de pequeños animales**, 2ª ed. Harcourt: Madrid. 2004.

WILLIAMS, J.; MOORES, A. Decision-making in wound closure. **Manual of canine and feline wound management and reconstruction**. 2ª ed. Hoboken, NJ.:BSAVA - British Small Animal Veterinary Association. 2009.

WINKLER, K. P. **Wound management in animals**. In: MSD Veterinary Manual. 2019. Acesso em: 18/08/2020. Disponível em:

<<https://www.msdtvetmanual.com/emergency-medicine-and-critical-care/wound-management/wound-management-in-animals>>.

YAN, H.; PENG, K.J.; WANG, Q.L.; GU, Z.Y.; LU, Y.Q.; ZHAO, J.; XU, F., LIU, Y.L.; TANG, Y.; DENG, F.M.; ZHOU, P.; JIN, J.G.; WANG, X.C.L. Efeito do gel polifenol de casca de romã na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos induzidos por aloxana, **Revista Médica Chinesa**, v. 126, n.1, p.1700-1706, 2013.

ZEKRY, S. S. A; ABDELLATIF, A.; AZZAZY, B M.E. Fabrication of pomegranate/honey nanofibers for use as antibacterial wound dressings. **Wound Medicine**, v.28, n.1, p.1-8, 2020. DOI:10.1021/jf010865b

CAPÍTULO 1

Gel de carbômero contendo extrato seco total de casca de romã como coproduto da agroindústria para uso como antimicrobiano e cicatrizante de feridas¹

Carbomer gel containing dry total pomegranate peel extract as a coproduct of agroindustry for use as antimicrobial and wound healing

Artigo a ser submetido à publicação ao periódico **Sustainable Chemistry and Pharmacy**

Thais Martins da Silva^a, Daiana Freitas Ferreira^a, Geanne Aparecida de Paula^b, Kamilla Âreas Bastos^b, Juliana Aparecida Severi^c, Juliana Alves Resende^a, Janaína Cecília Oliveira Villanova^{a,b}

¹Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, do primeiro autor.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e de Engenharia – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, s/n, 29500-00, Guararema, Alegre - ES

^bLaboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, s/n, 29500-00, Guararema, Alegre - ES

^c Departamento de Química Universidade Federal de Viçosa Viçosa – UFV, Av. P.H. Rolfs s/n - MG - Brazil, CEP: 36570-900

1 **Gel de carbômero contendo extrato bruto seco da casca de romã como**
2 **coproduto da agroindústria para uso antimicrobiano e cicatrizante**

3

4 Thais Martins da Silva^a, Daiana Freitas Ferreira^a, Geanne Aparecida de Paula^b,
5 Kamilla Áreas Bastos^b, Juliana Aparecida Severi^c, Juliana Alves Resende^a, Janaína
6 Cecília Oliveira Villanova^{a,b}

7

8 ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias
9 e de Engenharia - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto
10 Universitário, sem número, 29500-00, Guararema, Alegre - ES, Brazil

11 ^bLaboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, Centro de Ciências
12 Exatas, Naturais e da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo -
13 UFES, Alto Universitário, sem número, 29500-00, Guararema, Alegre - ES, Brazil

14 ^cLaboratório de Produtos Naturais, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde -
15 CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, sem
16 número, 29500-00, Guararema, Alegre - ES, Brazil

17

18 **Correspondência:** J.C.O. Villanova, Programa de Pós-graduação em Ciências
19 Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e de Engenharia - CCAE, Universidade
20 Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, sem número, Caixa Postal 16,
21 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brazil. E-mail: pharmacotecnica@yahoo.com.br

22

23 **Resumo:** A casca é um dos biorresíduos dos frutos de romã descartados após
24 extração do suco, com potencial de ser convertido em produtos de valor agregado
25 para aplicações farmacêuticas em função da presença de compostos bioativos de
26 grande interesse farmacológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da
27 preparação de uma formulação a partir de gel de carbômero contendo extrato bruto
28 seco das cascas de romã (EBSCR), fundamentando o uso de biorresíduos do romã
29 como coproduto. Inicialmente, foram realizados ensaios para caracterização
30 quantitativa do EBSCR e, em seguida, a melhor concentração do extrato para o estudo
31 foi pesquisada em géis contendo o extrato 1,25% p/p (FG1), 2,5% p/p (FG2) e 3,75%
32 p/p (FG3). No gel com a concentração eleita (2,5% p/p; FG2), armazenado em duas
33 condições (sob refrigeração e condição ambiente), foram realizadas análises físico-
34 químicas e microbiológicas ao longo de 90 dias, para avaliação da qualidade, da

35 manutenção do teor de fenóis totais e da atividade antimicrobiana. O teor de fenóis
36 totais encontrado no ESBCR foi de 61,92% e a atividade antioxidante total
37 determinada foi 93,8% (solução a 40 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; semelhante à solução na mesma
38 concentração do BHT). A incorporação do EBSCR a 2,5% p/p no gel base de
39 carbômero originou um gel opaco, de cor amarelo-intensa, consistente e com boa
40 capacidade de espalhamento e remoção. O pH do gel com extrato, após o preparo,
41 foi 6,1. Ao longo do período de estudo, tais parâmetros sofreram alterações, sendo as
42 maiores encontradas para os produtos armazenados em condições ambientais, por
43 mais de 30 dias. No entanto, as formulações se mantiveram íntegras e sem
44 fluidificação, ao fim do estudo. Nas amostras armazenadas por 30 dias (em condição
45 ambiente e sob refrigeração), não houve redução significativa do pH, a diminuição do
46 teor de fenóis totais foi menor que 10% e foi observada manutenção da atividade
47 antimicrobiana. A retenção de fenóis totais nos géis e a formação de ácido elágico e
48 ácido gálico, compostos bioativos que possuem atividade antimicrobiana, podem
49 explicar a alteração na cor das formulações, a diminuição do pH e a manutenção da
50 atividade antimicrobiana. Por fim, as formulações atenderam aos requisitos
51 farmacopeicos para a contagem de microrganismos mesófilos totais e ausência de
52 microrganismos patogênicos, sem alterações no período de 90 dias. A partir dos
53 resultados pode-se inferir que o emprego do EBSCR a 2,5% p/p no preparo de géis
54 com atividade antimicrobiana e cicatrizante é uma alternativa viável para o
55 aproveitamento de biorresíduos do romã.

56

57 **Palavras-chave:** *Punica granatum*, biorresíduos, gel de carbômero, atividade
58 antimicrobiana.

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69 1. Introdução

70

71 O cuidado no manejo de feridas envolve uma série de medidas, uma vez que
72 problemas de perfusão e oxigenação, inflamação excessiva e infecções são fatores
73 que contribuem para a cronicidade das lesões, que devem ser alvo de diferentes
74 abordagens, entre as quais, a farmacológica (HARDING; MOORE; PHILLIPS, 2005).
75 A administração de analgésicos, anti-inflamatórios, promotores de crescimento e
76 antimicrobianos, por via sistêmica ou tópica, pode favorecer a reparação tecidual no
77 menor tempo possível com o mínimo de dor e desconforto (ENOCH; LEAPER, 2005;
78 POLERÀ et al., 2019). O potencial uso de derivados vegetais como óleos essenciais
79 e extratos totais ou fracionados para o tratamento de feridas, em substituição a
80 fármacos sintéticos, tem sido relatado em inúmeros estudos (DAS et al., 2017;
81 PATTANAYAK et al., 2012; SHEDOEVA et al., 2019; ALVEN; NQORO; ADERIBIGBE
82 2020).

83 As cascas e as sementes dos frutos da romãzeira (*Punica granatum* L.;
84 Punicaceae), obtidos em diferentes solventes são ricos em compostos bioativos como
85 os ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido gálico, ácido ferúlico, entre outros),
86 antocianinas (cianidina, delphinidina, pelargonidina) e taninos hidrolisáveis
87 (elagitaninos, punicalagina, punicalina, granatina, principalmente), aos quais são
88 atribuídas inúmeras atividades (MACHADO et al., 2003; CHEN et al., 2020;
89 PUNEETH; CHANDRA, 2020). O emprego de diferentes partes do romã como
90 antimicrobiano e cicatrizante é amplamente relatado (MURTHY et al., 2004; ISMAIL;
91 SESTILI; AKHTAR, 2012; FLECK et al., 2016; FERNANDES, 2017; DOOSTKAM;
92 IRAVANI; BASSIRI-JAHROMI, 2019; FARIA; PEREIRA, 2019; SANTOS, 2019;
93 ABDEALSIEDE et al., 2020; COSTA et al., 2020). De acordo com a literatura, a
94 atividade antimicrobiana dos taninos se deve à capacidade destes se ligarem
95 quimicamente a proteínas dos microrganismos, promovendo precipitação e
96 promovendo a lise celular, com inativação microbiana. Já a atividade cicatrizante é
97 atribuída ao rico potencial antioxidante dos compostos fenólicos, capazes de inativar
98 radicais livres e reduzir o estresse oxidativo celular (GUO et al., 2008; CHEN et al.,
99 2020; KO et al., 2020; PUNEETH; CHANDRA, 2020; SOLTANZADEH et al., 2020).

100 As cascas representam cerca de 43% da massa residual gerada após a
101 extração do suco de romã, sendo considerada, juntamente com as sementes (11%),
102 um resíduo agroindustrial comumente descartado pelas indústrias. Em escala global,

103 são gerados anualmente cerca de 1,62 milhões de toneladas de biorresíduos
104 provenientes das cascas dos romãs usados na manufatura de suco (PATHAK;
105 MANDAVGANE; KULKARNI, 2016; KO et al., 2020; MAGANGANA et al., 2020).
106 Outros produtos preparados a partir do romã são bebidas gaseificadas e geleias
107 (SAMSURI et al., 2020). Os subprodutos agrícolas e os resíduos do processamento
108 de frutos se acumulam em áreas adjacentes aos locais de produção, levando à
109 putrefação desse material, causando contaminação das águas superficiais e do solo,
110 inclusive com a formação de compostos, como o metano (FAZIO et al., 2018). Uma
111 alternativa para o gerenciamento desse tipo de resíduo, especialmente daqueles que
112 contém alto teor de compostos potencialmente recuperáveis, é sua conversão em
113 coprodutos de alto valor agregado (FAZIO et al., 2018; GERVASI et al., 2018). Uma
114 vez que a casca de romã é constituída por inúmeros compostos bioativos de interesse
115 farmacológico, há um grande potencial da casca ser convertida em insumos para uso
116 nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (SHABTAY et al., 2008;
117 CHARALAMPIA; KOUTELIDAKIS, et al., 2017; FAZIO et al., 2018; GULLON et al.,
118 2020; KO; DADMOHAMMADI; ABBASPOURRAD, 2021; EL BARNOSSI,
119 MOUSSAID, HOUSSEINI, 2021).

120 Os compostos bioativos do romã podem ser obtidos em solventes e sistemas
121 solventes variados, sendo que os polares têm maior capacidade de extração dos
122 compostos polifenólicos de maior interesse (ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012). A
123 literatura relata a existência de alta atividade antioxidante para extratos de cascas de
124 romã obtidos em metanol, etanol e solução hidroetanólica, principalmente (NEGI;
125 JAYAPRAKASHA, 2003; STALIKAS, 2007; ZAHIN et al., 2010). Extratos obtidos a
126 partir destes solventes são, geralmente, hidrossolúveis, o que favorece a incorporação
127 em formas farmacêuticas hidrofílicas. Inúmeros estudos propuseram a incorporação
128 dos extratos de romã em formas farmacêuticas líquidas e semissólidas aquosas para
129 uso tópico, tais como soluções, géis, cremes e filmes poliméricos (MURTHY et al.,
130 2004; HAYOUNI et al. 2011; NAYAK et al., 2013; NEMA et al., 2013; AMAL et al.,
131 2015; FLECK et al., 2016; ZEKAVAT et al., 2016; MACHADO et al., 2019; BATISTA
132 et al., 2020; COSTA et al., 2020).

133 No manejo diário das feridas, especialmente das crônicas, atenção especial
134 deve ser dada para os procedimentos de limpeza e administração de medicamentos,
135 uma vez que o processo é doloroso e desconfortável para o paciente (PRICE et al.,
136 2008). Assim, o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de fácil aplicação e

137 remoção, que aumentam o conforto e a aceitação do paciente e, asseguram a
138 possibilidade de um fácil exame da região lesada, vem sendo objeto de estudos
139 (MACHADO et al., 2019). Quando aplicados topicamente, géis se espalham com
140 facilidade e favorecem a manutenção de um ambiente úmido, apresentando facilidade
141 de remoção e visualização das lesões (SAGHAZADEH et al., 2018).

142 Neste cenário, o objetivo do presente trabalho foi preparar um gel de carbômero
143 contendo extrato bruto seco obtido a partir de extração das cascas de romã em etanol
144 hidratado, com vistas ao uso como antimicrobiano no tratamento de lesões cutâneas
145 em cães. As cascas de romã, fonte ricas em compostos bioativos antimicrobianos e
146 antioxidantes, se caracterizam como resíduos e coprodutos subutilizados ou
147 descartados por indústrias agroalimentícias e, seu uso para a obtenção de extratos
148 para uso medicinal pode ser considerado uma estratégia promissora, agregando valor
149 ao produto e beneficiando o meio ambiente. Ainda, o emprego do extrato bruto seco,
150 sem fracionamento prévio, aumenta o rendimento e reduz os custos produtivos, uma
151 vez que utiliza menos solventes. Após o preparo das formulações, a qualidade físico-
152 química e microbiológica da formulação de interesse foram pesquisadas em produtos
153 armazenados em temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e sob refrigeração ($5 \pm 2^{\circ} \text{C}$),
154 durante 90 dias. A manutenção da eficácia antimicrobiana também foi avaliada.
155 Apesar de inúmeros trabalhos proporem o uso de biorresíduos do romã pra diversas
156 finalidades, nenhum artigo encontrado relata o preparo, a pesquisa da qualidade
157 físico-química e microbiológica e, a avaliação da atividade dos produtos obtidos.

158

159 **2. Materiais e Métodos**

160

161 **2.1 Materiais**

162 O carbômero ou poli(ácido acrílico) 980 (viscosidade média a 0,5% e pH de 7,5:
163 40.000 a 60.000 cP; teor de ácido carboxílico entre 56 e 68%), foi adquirido da
164 empresa Henrifarma. Os demais excipientes de grau farmacêutico utilizados na
165 manipulação do gel foram adquiridos de fornecedores nacionais. O tampão fosfato
166 salino (pH 7,4), a solução ácido citrato-dextrose e o DPPH, foram compradas da
167 Sigma-Aldrich (USA). Os meios de cultura Mueller-Hinton ágar (MHA), Brain Heart
168 Infusion (BHI), caldo e ágar caseína soja, ágar Sabouraud-Dextrose, caldo e ágar
169 MacConkey, ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), ágar cetrimida, ágar sal de manitol,
170 procederam do HiMedia Laboratories (India). O reagente Folin-Ciocalteu e o etanol

171 98,8% foram adquiridos da empresa Dinâmica; o ácido gálico e o carbonato de sódio,
172 da Vetec.

173 O extrato bruto seco das cascas de romã (EBSCR) utilizado neste estudo foi
174 preparado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Espírito
175 Santo (UFES), campus de Alegre (Brasil), como previamente descrito por Batista et
176 al. (2020). De maneira geral, o EBSCR foi obtido após maceração e percolação do pó
177 grosseiro proveniente das cascas em álcool etílico hidratado (92,8% p/p), seguido de
178 rotaevaporação para eliminação do solvente, congelamento em nitrogênio líquido e
179 liofilização até completa secagem do pó.

180

181 **2.2 Quantificação de fenóis totais**

182 O conteúdo de fenóis totais no EBSCR foi determinado pelo método
183 colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Resumidamente, em cada
184 poço de uma microplaca foram adicionados 50 µL de água purificada, 50 µL da
185 solução-estoque de ácido gálico e 50 µL da solução do extrato (0,6% p/v; água
186 purificada). Em cada um dos poços contendo as soluções diluídas foram adicionados
187 175 µL de água purificada e 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N). A placa foi
188 agitada e deixada em repouso por 5 min, ao abrigo da luz. Em seguida, em cada poço
189 foram adicionados 25 µL de solução aquosa de Na₂CO₃ a 10%. Após incubação (1 h,
190 temperatura ambiente, no escuro) a absorvância a 725 nm foi medida usando um
191 espectrofotômetro UV-VIS (THERMO FISHER, Multiskan GO, Finlândia). Os
192 resultados foram obtidos pela construção de curvas analíticas de ácido gálico dentro
193 da faixa de concentração de 0,195 a 25 µg.mL⁻¹. O teor de fenóis totais (FT) foi
194 determinado por interpolação da absorvância da amostra do extrato na reta analítica
195 do ácido gálico, sendo o FT expresso como miligramas de equivalente de ácido gálico
196 (EAG) por grama de amostra testada. Para o cálculo, foi empregada a Equação 1,
197 onde: FT é o teor de fenóis totais; F é a concentração de fenóis da amostra-teste
198 (µg.mL⁻¹); e, A é a concentração de fenóis totais no extrato (µg.mL⁻¹).

199

$$200 \quad FT = \frac{F}{A} \times 1000 \quad \text{[Equação 1]}$$

201

202

203

204 2.3 Determinação da atividade antioxidante total

205 A atividade antioxidante total (AAT) do EBSCR foi determinada pelo método de
206 captura do radical orgânico livre empregando o reagente 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
207 (DPPH), com adaptações na metodologia descrita por Ndayishimiye e Chun (2017).
208 Inicialmente, foram preparadas soluções etanólicas do extrato em estudo e do
209 butilhidroxitolueno (BHT) na faixa de concentração entre 1000 e 3000 µg.mL⁻¹.
210 Solução de DPPH dissolvido em etanol (4 µg.mL⁻¹) e etanol puro foram utilizados como
211 controle positivo e negativo, respectivamente. À 3 mL de cada uma das soluções em
212 estudo e ao etanol puro foram adicionados 2 mL da solução de DPPH. As soluções
213 foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 2 h, no escuro. Em seguida, a
214 leitura das absorvâncias foi efetuada a 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis
215 (EDUTECH, modelo EEQ-9023, Brasil). A porcentagem de sequestro de DPPH foi
216 calculada usando a Equação 2, onde, A₀ = absorbância do controle negativo e A_n =
217 absorbância da amostra na concentração n.

218

$$219 \quad \% \text{ sequestro} = \frac{A_0 - A_n}{A_0} \times 100 \quad [\text{Equação 2}]$$

220

221 Os dados dos valores dos percentuais de sequestro *versus* a concentração do
222 DPPH foram linearizados utilizando método dos mínimos quadrados (Excel[®]) e
223 empregando modelo exponencial. A partir da reta linearizada foi obtida a equação da
224 reta para cálculo das concentrações mínimas eficazes do extrato para reduzir 50% e
225 90% do DPPH (CE₅₀ e CE₉₀).

226

227 2.4 Preparo dos géis base e medicamentoso

228 Inicialmente, foram manipulados 300 g de gel base de carbômero 980 a 1% p/p
229 nos quais foram incorporadas três concentrações do extrato, conforme fórmulas
230 apresentadas na Tabela 1.

231

232

233

234

235

236 **Tabela 1.** Composição qualitativa e quantitativa do gel base e com diferentes
237 concentrações do extrato (1,25, 2,5 e 3,75% p/p).

Componentes	Quantidade (%p/p)				Função farmacotécnica
	Base	FG1	FG2	FG3	
Carbômero 980	1,0	1,0	1,0	1,0	Gelificante
Metilparabeno	0,15	0,15	0,15	0,15	Conservante
Propilparabeno	0,05	0,05	0,05	0,05	Conservante
Propilenoglicol	4,0	4,0	4,0	4,0	Cossolvente e umectante
EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	Sequestrante
Metabissulfito de sódio	0,1	0,1	0,1	0,1	Antioxidante
Água purificada	94,6	94,6	94,6	94,6	Veículo
AMP Ultra	qs pH 6,5 a 7,0				Alcalinizante
EBSCR	-	1,25	2,50	3,75	Composto bioativo

238

239 Para a manipulação do gel base, os conservantes foram solubilizados em
240 propilenoglicol ligeiramente aquecido e à esta solução, foi adicionada a água
241 purificada contendo EDTA e metabissulfito de sódio previamente dissolvidos. Em
242 seguida, o carbômero foi disperso na mistura, que foi deixada em repouso para
243 hidratação por 8 h, sob refrigeração. No dia seguinte, o pH da dispersão foi ajustado
244 para 6,5 a 7,0 com aminometilpropanol (AMP), até a formação de gel transparente,
245 límpido e sem grumos. O extrato foi incorporado diretamente no gel mediante
246 levigação com parte da base, em geral, com auxílio de pistilo. As formulações contendo
247 o EBSCR foram denominadas FG1 (1,25% p/p), FG2 (2,5% p/p) e FG3 (3,75% p/p).

248 Após definição da melhor concentração do extrato, foi preparada uma nova
249 partida de 1,5 Kg do gel base, empregando o mesmo procedimento descrito
250 anteriormente. Em 1 Kg do GB foi incorporado o EBSCR. O gel base e o gel
251 medicamentoso foram armazenados em potes de polietileno de alta densidade de 50
252 g, opacos e herméticos.

253

254 **2.5 Definição da melhor concentração do extrato no gel**

255 A escolha da melhor concentração do extrato foi determinada mediante
256 avaliação da atividade antimicrobiana nos géis FG1, FG2 e FG3, empregando método
257 de difusão em ágar, segundo protocolo CLSI (2019) com modificações. Foram
258 empregadas as linhagens padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25.922), *Staphylococcus*

259 *aureus* (ATCC 25.923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12.228) e *Candida*
260 *albicans* (ATCC 24.433). Para este experimento, os microrganismos foram
261 previamente cultivados em caldo BHI ($35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24 h e a concentração da
262 suspensão microbiana foi ajustada para 0,5 na escala McFarland, utilizando solução
263 salina estéril (0,9% de NaCl). Em seguida, meio MHA recentemente preparado foi
264 transferido para as placas e, com auxílio de *swab*, as linhagens foram semeadas sobre
265 o meio.

266 Amostras com massas padronizadas (175 mg) dos géis foram colocadas em
267 poços de 6 mm de diâmetro feitos nas placas com o auxílio da parte superior de
268 ponteiros estéreis. As placas foram incubadas ($35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24 - 48h. O diâmetro
269 das zonas de inibição foi medido em milímetros (mm). Discos contendo tetraciclina
270 (30 μg) e solução anfotericina B (20 μg) foram utilizados como controle positivo para
271 as bactérias e fungos, respectivamente e, para comparação entre as réplicas,
272 conforme o protocolo CLSI. Gel base com conservante e gel base sem conservante
273 foram utilizados como controle negativo e para avaliar a possibilidade de interferência
274 do conservante no ensaio, respectivamente.

275

276 **2.6 Avaliação de atributos de qualidade físico-química do gel**

277 As análises nos géis (GB e FG2) seguiram orientações descritas em compêndios
278 oficiais do Brasil, a saber: Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL,
279 2004), do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2008) e
280 da Farmacopeia Brasileira 6^a ed. (2019). Ensaio complementares foram realizados
281 em conformidade com a literatura científica. As análises no gel base foram realizadas
282 no tempo 0 enquanto em FG2, nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, nos produtos
283 armazenados em temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob refrigeração ($5 \pm 2^{\circ}\text{C}$). A
284 temperatura de 27°C foi a média determinada no período do estudo (outubro de 2020
285 a março de 2021) no município de Alegre (ES), Brasil.

286

287 **2.6.1 Análise visual e sensorial**

288 Um grama (1 g) dos produtos foi colocado em vidro relógio e analisados contra
289 fundo branco para verificação da aparência (brilho, presença de bolhas, ausência de
290 grumos), cor, uniformidade de cor (marmorização) e odor. Para análise sensorial, uma
291 colher de chá foi colocada no dorso da mão e espalhado, sendo avaliados os

292 parâmetros: facilidade de espalhamento, pegajosidade, cobertura, residual de
293 umidade e maciez.

294

295 2.6.2 Determinação do pH

296 O pH das formulações foi determinado por potenciometria, mediante inserção
297 do eletrodo diretamente nas amostras, empregando potenciômetro digital de bancada
298 (DIGIMED, modelo DM22, Brasil).

299

300 2.6.3 Análise do perfil de textura (TPA)

301 O perfil de textura foi avaliado empregando texturômetro (BROOKFIELD,
302 modelo CT3, USA), segundo método adaptado de Tai, Bianchini e Jachowicz (2014).
303 As análises foram realizadas no modo de compressão em dois ciclos, mediante a
304 medida da resistência à penetração e remoção de uma sonda tipo cilindro acrílico com
305 2,54 cm de diâmetro e sensibilidade de força de 10 g. A sonda foi colocada em contato
306 com as amostras e foi inserida a uma velocidade de 2 mm.s⁻¹, a uma profundidade
307 pré-definida de 8 mm.

308

309 2.6.4 Resistência ao estresse térmico e mecânico

310 Para o teste de estresse térmico, pesou-se 5 g de cada amostra que foram
311 transferidas para tubos Falcon e levados para banho-maria (FANEM, 100, Brasil). As
312 amostras foram submetidas à temperaturas entre 40° e 60° C, com rampas de
313 aquecimento de 5° C a cada 15 min. Para avaliação da resistência ao estresse
314 mecânico, amostras de 5 g colocadas em tubos Falcon foram centrifugadas
315 (centrífuga DAIKI, modelo 80-2b, China) nas velocidades de 1000, 2500 e 3500 rpm,
316 com duração de 15 min cada ciclo. Em cada ciclo de calor e centrifugação as amostras
317 foram avaliadas visualmente para pesquisa de alterações tais como alteração da cor,
318 formação de precipitado, pesquisa de material em flutuação e ocorrência de
319 fluidificação, principalmente.

320

321 **2.7 Doseamento do teor de FT nos géis e manutenção da atividade** 322 **antimicrobiana**

323 Para pesquisa do teor de FT nos géis FG2 foi utilizado método descrito para
324 doseamento de FT no extrato puro, com adaptações. A interferência do GB nas
325 leituras foi pesquisada preliminarmente mediante a obtenção de espectros de

326 varredura. Para o preparo das amostras, 500 mg dos géis foram diluídos em 10 mL
327 de água deionizada e a dispersão foi centrifugada (centrífuga DAIKI, modelo 80-2b,
328 China) para remoção de possíveis partículas suspensas. Em seguida, foram
329 realizadas diluições sucessivas da amostra em água deionizada, até a obtenção de
330 soluções com concentrações entre 115 e 0,800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As demais etapas foram
331 realizadas conforme procedimentos anteriormente relatados para a determinação de
332 FT no extrato. Para cada tempo de análise foi traçada uma reta analítica do ácido
333 gálico, sendo considerada adequadas para o trabalho aquelas com coeficiente de
334 correlação ($r \geq 0,99$).

335 Para pesquisa da manutenção da eficácia antimicrobiana nos géis FG2
336 armazenados nas duas condições, ao longo do tempo, foi empregada a mesma
337 metodologia descrita em 2.5 para definição da melhor concentração do EBSCR nas
338 formulações. Além das cepas anteriormente testadas, neste estudo foi incluída a cepa
339 ATCC 27.853 de *Pseudomonas aeruginosa*.

340

341 **2.8 Análise estatística**

342 Quando aplicável, análises estatísticas foram feitas em triplicata e foi calculada
343 a média e o desvio padrão e a comparação das médias foi realizada empregado teste
344 ANOVA, seguido do teste de Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando-se o
345 programa PAST® (v. 2,17).

346

347 **2.9 Avaliação da qualidade microbiológica do gel**

348 As amostras dos géis foram submetidas aos ensaios de controle de qualidade
349 microbiológico descritos na 6ª ed. da Farmacopeia Brasileira (2019), conforme
350 metodologia para análise de produtos não estéreis. Foram realizados os ensaios de
351 contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos totais e a pesquisa de
352 microrganismos patogênicos. A qualidade microbiológica das formulações foi
353 pesquisada nos tempos 0 e 90 dias. Todos os estudos foram feitos em triplicata para
354 melhor resolução dos dados.

355

356 **2.9.1 Contagem do número total de microrganismos mesófilos**

357 Inicialmente, 10 g de cada amostra do GB e FG2 em condições ambiente (CA)
358 e sob refrigeração (SR), foram homogeneizadas com 1 mL de polissorbato 80 (Tween®
359 80). Posteriormente, esta foi suspensa em 90 mL de caldo caseína soja (SCB)

360 formando uma suspensão de trabalho na proporção 1:10. A partir da suspensão inicial,
361 foram preparadas diluições decimais sucessivas, de 10^{-2} a 10^{-5} , em SCB. Para a
362 contagem do número total de bactérias aeróbicas, 0,1 mL de cada diluição foi
363 inoculado na superfície de placas contendo meio ágar caseína soja. As placas foram
364 incubadas ($32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$) por 5 dias. Para a contagem do número total de bolores e
365 leveduras, 0,1 mL de cada diluição foi inoculado na superfície de placas contendo ágar
366 batata. As placas foram incubadas ($22,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$) por 7 dias. Após o crescimento,
367 utilizando a média aritmética das placas foi calculado o número de unidades
368 formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g) (BRASIL, 2019).

369

370 2.9.2 Pesquisa de microrganismos patogênicos

371 Para a pesquisa de *Escherichia coli*, foi preparado o pré-inóculo bacteriano
372 mediante inoculação de 10 mL da suspensão inicial da amostra (1:10) em 90 mL de
373 SCB. O pré-inóculo foi incubado ($32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$) por 18 a 24 h. Em seguida, foi
374 transferido 1 mL do pré-inóculo para 100 mL de caldo MacConkey, com incubação (43
375 $\pm 1^\circ \text{C}$) por 24 a 48 h. Finalmente, foi realizada subcultura em placas de ágar
376 MacConkey incubadas ($32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$) durante 18 a 72 h. Após o crescimento, a
377 presença de colônias sugestivas de *E. coli* deve ser confirmada por testes de
378 identificação (KONEMAN et al., 2001).

379 Os pré-inóculos como preparados anteriormente também foram usados para
380 pesquisa de *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*. Para a pesquisa
381 de *Salmonella* spp., foi transferido 0,1 mL do pré-inóculo contendo a amostra
382 enriquecida em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), seguido de incubação
383 ($32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$) por 24 h. Posteriormente, foi realizada subcultura em placas de ágar
384 desoxicolato-lisina-xilose (XLD) e incubação na mesma temperatura por 18 a 48 h.
385 Após o crescimento, a presença de colônias sugestivas de *E. coli* deve ser confirmada
386 (KONEMAN et al., 2001).

387 Para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, foi transferido uma alça do pré-
388 inóculo para placas de ágar ceftrimida, seguida de incubação ($32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$) durante
389 18 a 72 h. A presença provável de colônias sugestivas de *P. aeruginosa* deve ser
390 confirmada por testes de identificação (KONEMAN et al., 2001).

391 Por fim, para pesquisa de *S. aureus*, foi semeado 1 alça do pré-inóculo
392 enriquecida em placas de Ágar sal de manitol. As placas foram incubadas ($32,5 \pm 2,5^\circ$
393 C) durante 18 - 72 h. O crescimento de colônias amarelas ou brancas, rodeadas por

394 zona amarela indicava presença provável de *S. aureus*, confirmadas por testes de
395 identificação (KONEMAN et al., 2001).

396

397 3 Resultados e Discussão

398

399 3.1 Caracterização química do EBSCR

400 Frutas vermelhas, entre as quais o romã, são caracterizadas como fontes ricas
401 em compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos, flavonóides e taninos,
402 principalmente, sendo a presença destes compostos bioativos, um importante
403 indicador da existência das atividades farmacológicas antioxidantes e antimicrobiana
404 (; GARDELI et al., 2019; GULLON et al., 2016). No presente trabalho, para pesquisar
405 o teor de fenóis totais (FT) no EBSCR foi realizado doseamento empregando método
406 colorimétrico baseado no reagente Folin-Ciocalteu. A curva analítica obtida para o
407 ácido gálico bem como a equação da reta são dadas na Figura 1. O método foi
408 desenvolvido de maneira adequada, com coeficiente de linearidade maior que 0,99,
409 assegurando boa correlação entre a concentração de ácido gálico e a absorvância
410 medida. A equação da reta obtida foi “ $y = 0,0413x + 0,00533$ ”. De acordo com os
411 resultados, o EBSCR apresentou teor de fenóis totais de $61,92 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG, valor em
412 conformidade com a literatura.

413

414

415

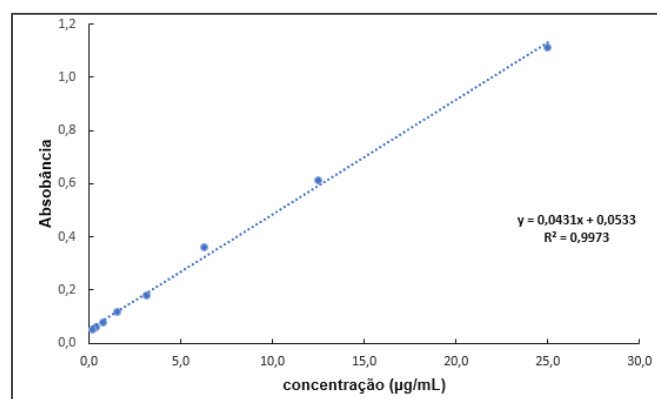
416

417

418

419

420



421 **Figura 1-** Reta analítica e equação da reta do ácido gálico obtida por
422 espectrofotometria a 725 nm, em metanol, pelo método do reagente Folin-Ciocalteu.

423

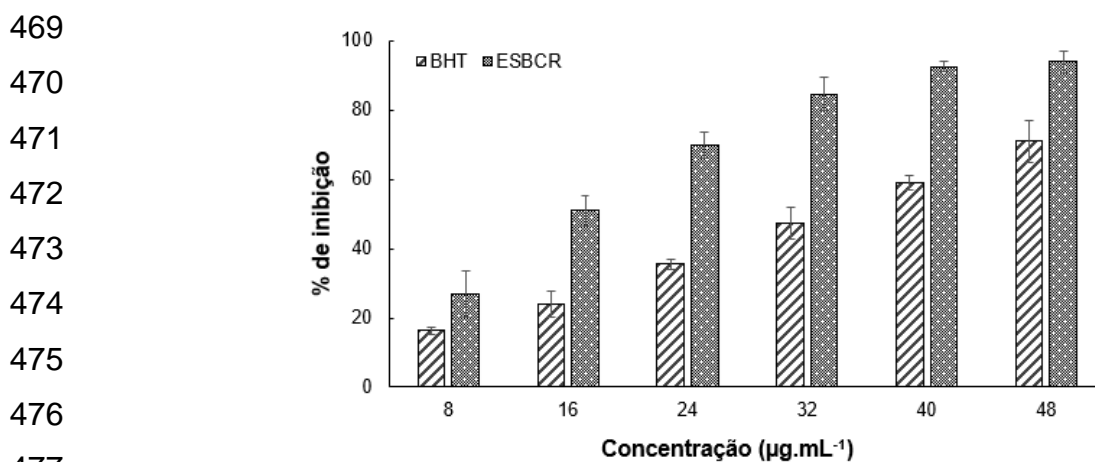
424 Padmaja e Prasad (2011) prepararam extratos das cascas de romã obtidos em
425 diferentes solventes, inclusive etanol, e procederam a quantificação de FT
426 empregando o mesmo método do presente estudo. Segundo os autores, o valor de
427 FT para o extrato etanólico foi $20,39 \text{ mg. g}^{-1}$ EAG. El-Said et al. (2014) obtiveram

428 teores de FT para extratos secos das cascas de romã obtidos por diferentes métodos
429 e solventes que variaram de 13,98 a 17,78 mg.g⁻¹ EAG. Para o extrato em metanol, o
430 valor foi de 14,23 a 16,34 mg.g⁻¹ EAG. Segundo resultados obtidos por Li *et al.* (2006),
431 os valores de FT para extratos da polpa e das cascas de romã, obtidos por uma
432 mistura de solventes (acetona, água, metanol e etanol), foram 24,4 mg.g⁻¹ EAG e
433 249,4 mg.g⁻¹ EAG, respectivamente. Hasnaoui *et al.* (2014), obtiveram valores de FT
434 para extratos das cascas de romã obtidos em etanol e acetona entre 205,07 e 261,70
435 mg.g⁻¹ EAG, respectivamente. Derakhshan e colaboradores (2018) encontraram
436 teores de FT para extratos etanólicos de cascas de romã que variaram entre 70 e 415
437 mg.g⁻¹ EAG conforme o tipo de cultivar de romã analisado. Gullon *et al.* (2016)
438 utilizaram o mesmo método do presente trabalho para quantificar o teor de fenóis
439 totais e obtiveram um valor de 19,3 mg.g⁻¹ EAG em amostras de extrato obtido a partir
440 da farinha de cascas de romã em sistema solvente metanol:água. Para Fazio *et al.*
441 (2018), apesar dos maiores valores de FT nas cascas de romã relatados para o
442 metanol, o uso deste solvente deve ser evitado, uma vez que pode deixar resíduos no
443 extrato e comprometer o seu emprego. Segundo Celiktas *et al.*, 2007 e Gözlekçi *et*
444 *al.* (2011), que analisaram o teor de FT em extratos de diferentes partes de romãs
445 obtidos de cultivares variados, a variabilidade nos resultados encontrados e relatados
446 se devem à heterogeneidade de compostos bioativos presentes nas amostras, cuja
447 qualidade e quantidade variam de acordo com os estágios de crescimento das
448 plantas, das condições de cultivo, das partes estudadas, das formas de extração e
449 dos tipos de solventes extratores empregados.

450 A eficácia antimicrobiana do extrato das cascas de romã sobre cepas de
451 bactérias e fungos é associada à presença de taninos hidrolisáveis extraídos,
452 principalmente, em solventes polares. Estes compostos bioativos, possuem a
453 capacidade de se complexarem com proteínas e enzimas dos microrganismos,
454 inativando-as, promovendo lise celular e a morte das bactérias e fungos
455 (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011; FLECK *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2002;
456 PRASHANTH; ASHA; AMIT, 2001). Gullon *et al.* (2016) correlacionaram os valores
457 das concentrações inibitórias mínimas do extrato obtido a partir da farinha de casca
458 de romã, sobre cepas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *S. aureus*, *P.*
459 *aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella* sp., compreendidas entre 20 e 50 mg.mL⁻¹, à
460 presença de concentração considerável de fenóis totais no extrato estudado (19,3
461 mg.g⁻¹.EAG). Resultados de Pagliarulo *et al.* (2016) sugeriram que extratos

462 hidroetanólicos (50:50 etanol:água), brutos e purificados, preparados a partir tanto do
 463 arilo quanto da casca de romãs, com FT de cerca de 21 mg.g⁻¹ EAG, tiveram efeito
 464 inibitório positivo sobre o crescimento bacteriano de *S. aureus* e *E. coli*.

465 Outro importante parâmetro a ser pesquisado no EBSCR, indicativo da sua
 466 funcionalidade para a finalidade pretendida, é sua capacidade antioxidante. O gráfico
 467 da % de inibição do DPPH em função da concentração do extrato e do BHT é dado
 468 na Figura 2.



478 **Figura 2-** Porcentagem de inibição do radical DPPH pelo BHT e o EBSCR.

479 A inibição do reagente DPPH é um método amplamente utilizado para
 480 investigar a atividade antioxidante de vários compostos bioativos. A técnica se baseia
 481 na mudança de coloração do meio, uma vez que o DPPH é um radical livre estável,
 482 de cor púrpura, que ao ser reduzido, se torna amarelo. O radical é sensível mesmo
 483 para a detecção de baixas concentrações de compostos antioxidantes presentes em
 484 diferentes extratos (HSEU et al., 2008). O método é simples, rápido e sensível, não
 485 requerendo reagentes caros ou instrumentação sofisticada, uma vez que o radical
 486 DPPH é estável temperatura ambiente (BRAND-WILLIAMS; CUVELICI; BERSSET,
 487 1995; SANCHEZ-MORENO et al., 1998).

488 A AAT para a maior concentração testada do extrato (40 µg.mL⁻¹) foi de 93,8%
 489 enquanto que para a solução de BHT (40 µg.mL⁻¹), o valor foi 70,96%. Quando
 490 comparados os valores da AAT do EBSCR e do BHT, é possível notar que, nas
 491 mesmas concentrações, o primeiro foi mais efetivo na inibição do DPPH que no
 492 antioxidante sintético. O aumento na concentração tanto do extrato quanto do BHT
 493 ocasionou aumento na atividade na inibição do radical DPPH. Os valores das
 494 concentrações mínimas eficazes (CE) do EBSCR para reduzir o DPPH em 50% e 90%
 495 foram 14,44 µg.mL⁻¹ e 39,82 µg.mL⁻¹, respectivamente. Concentrações maiores de

496 BHT foram necessárias para inibir 50 e 90% do reagente quando comparado com os
497 valores do EBSCR: para o BHT, os valores da CE_{50} e CE_{90} foram $30,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e
498 $117,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, é possível concluir que o extrato etanólico das cascas de
499 romã apresentou atividade inibitória da oxidação maior que aquela observada para o
500 antioxidante sintético BHT.

501 No estudo de Pal et al. (2017), a inibição de 50% do DPPH foi obtida quando
502 um extrato etanólico de cascas de romã foi utilizado na concentração de $16,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$
503 ¹, valor semelhante ao observado no presente trabalho. Os autores associaram a AAT
504 elevada ao alto conteúdo de compostos fenólicos presentes no extrato. Resultados
505 reportados por Chidambara e colaboradores (2004), mostraram que o extrato
506 metanólico de cascas de romã na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de inibir o
507 DPPH em 81%. De acordo com dados do presente trabalho, foram necessários cerca
508 de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para inibir o DPPH em, aproximadamente, 84%. Inúmeros trabalhos
509 relatam maior AAT para os diferentes extratos de romã quando comparados a outros
510 antioxidantes sintéticos pesquisados, tais como BHT, BHA e ácido ascórbico,
511 corroborando os nossos resultados encontrados (NEGI; JAYAPRAKASHA, 2003;
512 SHIBAN et al., 2012). Em outro estudo realizado por Tozetto et al. (2017) foi
513 pesquisada a atividade antioxidante do extrato etanólico de romã em emulsões, em
514 diferentes concentrações (0,1, 1 e 5% p/p). Os autores observaram que que o extrato
515 e as emulsões reagiram com o DPPH e a maior concentração do extrato apresentou
516 uma AAT total de aproximadamente 100%. Segundo os autores, o emprego do extrato
517 pode substituir antioxidantes sintéticos, sendo uma alternativa interessante para
518 formulações cosméticas.

519 Assim como o observado para a quantificação de FT, diversos autores
520 correlacionaram a grande variabilidade nos valores de AAT aos diferentes métodos
521 de extração, tipos de solventes e partes utilizadas do romã. Malviya, Arvind e
522 hettiarachchy (2014) observaram que extratos obtidos a partir de diferentes solventes
523 apresentaram grande variabilidade na porcentagem de inibição do DPPH. Para Liu et
524 al. (2006) e Elfalleh et al. (2012), a casca do romã apresenta maior conteúdo fenólico
525 total e atividade antioxidante quando comparada com outras partes da planta, como
526 sementes e folhas.

527 Comprovadas a presença de classes de metabólitos de interesse no extrato,
528 bem como o elevado teor de FT e alta AAT, que justificam o uso do EBSCR para a
529 finalidade pretendida, a melhor concentração para uso no gel foi determinada.

530

531 3.2 Definição da melhor concentração do EBSCR no gel

532 Como preconizado no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira 2^a ed.
533 (2012), a incorporação de inúmeras substâncias ativas em bases semissólidas como
534 o gel, pode provocar redução na viscosidade, desestabilizando as formulações. A
535 perda de consistência pode ser minimizada a partir do preparo de bases mais
536 concentradas, motivo pelo qual foi utilizado o carbômero a 1% p/p. A incorporação da
537 menor quantidade possível da substância farmacologicamente ativa de interesse
538 também provoca menor impacto sobre a consistência do produto, especialmente se
539 são hidrossolúveis. Entre os métodos disponíveis para avaliação da atividade
540 antimicrobiana se destaca o teste de difusão em ágar. Os resultados obtidos no teste
541 são dados na Tabela 2.

542 No presente trabalho, observou-se a formação de zonas de inibição para os
543 controles positivos condizentes com o protocolo CLSI (2019). Não ocorreu inibição do
544 crescimento para o gel base adicionado ou não de conservantes, indicando que não
545 houve interferência do gel de carbômero e do sistema conservante na atividade do
546 extrato. Foram observadas zonas de inibição para todas as formulações testadas
547 frente à cepas das bactérias e do fungo, evidenciando a existência de atividade
548 antimicrobiana para o gel contendo o EBSCR. A existência de zonas de inibição
549 também indica que o extrato foi adequadamente liberado no meio em concentração
550 apropriada para inibir o crescimento microbiano.

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563 **Tabela 2.** Diâmetro das zonas de inibição (mm \pm DP) observadas para as formulações
 564 contendo o extrato a 1,25% p/p (FG1), 2,5% p/p (FG2) e 3,75% p/p (FG3)

Cepas	Gel com EBSCR			Controles	
	FG1	FG2	FG3	GBSC	GBCC
<i>S. aureus</i> (ATCC 25.923)	25,33 (\pm 0,58) ^a	28,33 (\pm 2,08) ^{a,b}	29,97 (\pm 0,06) ^b	0	0
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12.228)	28,00 (\pm 1,73) ^a	29,00 (\pm 1,00) ^a	30,67 (\pm 0,58) ^a	0	0
<i>E. coli</i> (ATCC 25.922)	38,67 (\pm 0,58) ^b	36,33 (\pm 0,58) ^b	37,33 (\pm 0,58) ^b	0	0
<i>C. albicans</i> (ATCC 24.433)	17,33 (\pm 0,58) ^a	18,33 (\pm 0,58) ^{a,b}	19,67 (\pm 0,58) ^b	0	0

565 C+ = controle positivo; GBCC = gel base com conservante; GBSC = gel base sem conservante (SC).

566 Valores entre parênteses representam o desvio padrão (n = 3).

567 ^{a,b,c}Letras iguais mostram ausência de diferença estatística (p < 0,05) entre as colunas.

568

569 Não foi observada diferença significativa (p<0,05) entre os valores das zonas
 570 de inibição com o aumento da concentração do extrato para *S. epidermidis*, indicando
 571 que a variação na concentração do extrato não influenciou na atividade antimicrobiana
 572 para este microrganismo. Por outro lado, para *S. aureus* e *C. albicans*, houve diferença
 573 significativa entre as concentrações de 2,5% p/p e 3,75% p/p quando comparadas
 574 com a menor (1,25% p/p), sugerindo que o aumento da concentração melhorou a
 575 atividade sobre a inibição do crescimento destas cepas. Uma vez que não houve
 576 diferença significativa quando a maior concentração do ESCBR foi utilizada, pode-se
 577 concluir que a incorporação do extrato a 2,5% p/p é adequada. Estes resultados são
 578 condizentes com as CIMs definidas para o mesmo extrato em um trabalho anterior
 579 realizado por Costa et al. (2020).

580

581 3.3 Avaliação de atributos de qualidade físico-química do gel

582 Após manipulação do gel base e obtenção do gel medicamentoso FG2 por
 583 incorporação do EBSCR na concentração de 2,5% p/p, amostras foram armazenadas
 584 em temperatura ambiente e sob refrigeração, para análises nos dias 30, 60 e 90 dias.
 585 Como pode ser visto na Figura 3, o gel base (GB) obtido apresentou características

586 típicas dos géis de carbômero 980, se mostrando límpido, transparente, brilhante,
587 isento de grumos e turvação e com poucas bolhas de ar incorporadas. A viscosidade
588 aparente avaliada sensorialmente foi considerada alta. No entanto, o gel base foi de
589 fácil espalhamento nas mãos, isento de residual gorduroso e com toque úmido.

590 A incorporação do EBSCR não alterou o sensorial do produto, mas levou à
591 alteração do aspecto: o gel se tornou opaco e com coloração amarelo-intensa e
592 uniforme, característica do extrato. Chalke *et al.* (2016) avaliaram o aspecto visual de
593 géis de carbômero 940 em proporções variando de 1 a 2,5% p/p, contendo extrato de
594 romã a 5% p/p. Os autores observaram que após a adição do extrato foi observada
595 coloração amarelo-pálida. Fleck *et al.* (2016) prepararam gel de carbômero 980 a 1%
596 p/p contendo extrato hidroetanólico do pericarpo de romã a 2% p/p, que apresentou
597 aspecto homogêneo, opaco, com coloração marrom-caramelo e toque suave.

598 No presente trabalho, observou-se alteração da coloração do gel FG2 ao longo
599 do tempo, especialmente nas amostras armazenadas em condições ambientais, nas
600 quais a coloração passou de amarelo-intensa para marrom-caramelo. Alterações na
601 cor de diferentes formulações de uso tópico contendo extrato de romã a 2 e 7,5% p/p,
602 armazenadas sob diferentes condições e períodos foram observadas por Fleck *et al.*
603 (2016) e Gonçalves *et al.* (2021), respectivamente. A coloração característica do
604 ESBCR e dos géis contendo o extrato se devem a presença de antocianinas que
605 representam, juntamente com os taninos hidrolisáveis, o maior e mais importante
606 grupo de flavonóides presentes em derivados vegetais do romã (GARDELI *et al.*,
607 2019). Seis moléculas de antocianina foram identificadas em romãs, incluindo mono-
608 e di-glucosídeos de cianidina - pigmento de cor vermelha; delphinidina - pigmento de
609 cor roxa; e, pelargonidina - pigmento de cor laranja (Bar-Ya'akov *et al.*, 2019). De
610 acordo com Mallery *et al.* (2008), um dos fatores que catalisa a degradação das
611 antocianinas é a temperatura de armazenagem, o que justifica as alterações
612 observadas no presente estudo. Ao longo do tempo, a maior mudança de coloração
613 foi observada nas amostras mantidas sem refrigeração.

614

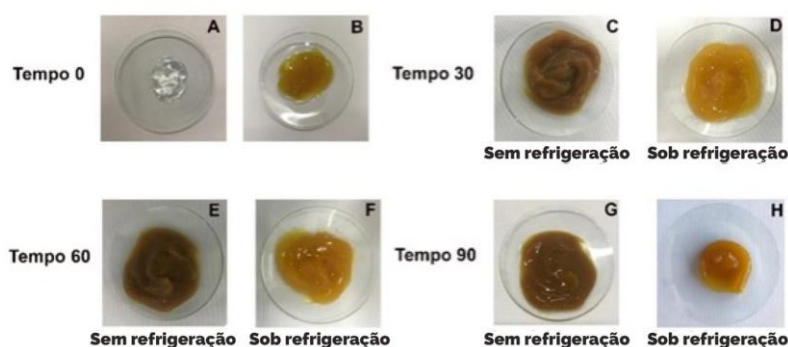
615

616

617

618

619



620 **Figura 3-** Fotografias do gel base e contendo o EBSCR a 2,5% p/p após o preparo
 621 (T0) (A) e (B); gel contendo o EBSCR a 2,5% p/p após 30 dias (C) e (D); gel contendo
 622 o EBSCR a 2,5% p/p após 60 dias (E) e (F); e, do gel contendo o EBSCR a 2,5% p/p
 623 após 90 dias (G) e (H).

624

625 A incorporação de substâncias ativas em bases semissólidas pode levar a uma
 626 variação na estabilidade física e química das mesmas, podendo causar, entre outros
 627 problemas, a modificação do pH, com separação de fases e fluidificação do produto,
 628 causando sua inutilização (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

629 A adição do extrato no gel base de carbômero 980 a 1% p/p reduziu o pH de
 630 6,99 ($\pm 0,02$) para 6,10 ($\pm 0,02$). Os valores do pH podem ser vistos na Tabela 3. A
 631 diminuição do pH no gel com extrato quando comparado ao gel base pode ser
 632 justificada pela natureza ácida do extrato, cujo pH de uma solução a 2,5% p/p em
 633 água foi 3,48 ($\pm 0,09$). Gonçalves et al. (2020) observaram que o pH de formulações
 634 contendo carbômero e extrato de romã a 7,5% p/v variou de 5,5 a 6,0. Vilas,
 635 Nishiganda e Shivappa (2019) preparam formulações de gel carbômero 940 (0,5 a 1%
 636 p/p) contendo extrato de romã a 0,5% p/p e obtiveram valores de pH que variou de
 637 6,30 a 6,80.

638

639 **Tabela 3.** Valores médios obtidos para o pH da formulação FG2 determinados nos
 640 tempos 0, 30, 60 e 90 dias, sob as diferentes condições de armazenagem

	T0	T1	T2	T3
CA	6,10 ($\pm 0,02$) ^a	5,59 ($\pm 0,21$) ^a	5,44 ($\pm 0,14$) ^b	5,48 ($\pm 0,02$) ^b
SR	-	5,87 ($\pm 0,36$) ^a	5,88 ($\pm 0,10$) ^a	5,85 ($\pm 0,06$) ^a

641 CA = condição ambiente ($27 \pm 2^\circ$ C); SR = sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ$ C).

642 Valores entre parênteses representam o desvio padrão (n = 3).

643 ^{a,b,c}Letras iguais mostram ausência de diferença estatística (p < 0,05) entre as colunas.

644 A redução nos valores de pH em gel base de carbômero 980 após a incorporação
645 extrato hidroetanólico do pericarpo de romã a 2% p/p também foi observada por Fleck
646 et al. (2016). Os autores obtiveram valores de pH que variaram entre 4,18 e 4,95 para
647 os géis acondicionados em diferentes tipos de embalagens e sob diferentes
648 condições, ao fim de 6 meses de estudo. Apesar dos valores de pH serem menores
649 que aquele relatado como o de maior estabilidade para os carbômeros, os autores
650 consideraram o gel estável, o que foi atribuído à presença de altas concentrações de
651 compostos fenólicos no extrato utilizado. Segundo os autores, os compostos fenólicos
652 interagem fisicamente com as cadeias polianiônicas do carbômero, estabilizando a
653 estrutura do gel e inibindo o total afrouxamento das cadeias, que mantêm sua
654 integridade física. Aslani, Zolfaghari e Davoodvandi (2016) obtiveram resultados
655 semelhantes ao elaborarem formulações de gel mucoadesivo para tratar estomatite
656 aftosa contendo extrato de flor de romã a 12%, empregando diferentes gelificantes,
657 entre eles, o carbômero 934 em concentrações entre 0,5 e 1% p/p. Segundo os
658 autores, o valor do pH do gel ao longo de 6 meses variou de 4,3 a 4,74 mas, o gel
659 manteve consistência apropriada.

660 No que diz respeito à variação do pH na formulação FG2 ao longo do tempo,
661 foi observada redução significativa ($p < 0,05$) dos valores para amostras armazenadas
662 em condição ambiente, nos dias 60 e 90. Sob refrigeração, o pH permaneceu acima
663 de 5,50 para todos os tempos, o que está de acordo com o pH de estabilidade para
664 géis de carbômero. Carbômeros formam géis aquosos aniônicos e incolores, que
665 apresentam estabilidade, brilho, transparência e viscosidade máxima em valores de
666 pH entre 5,5 e 7,0 (KIM et al., 2003; VARGES et al., 2019). Para Islam et al. (2004) o
667 comportamento reológico de bases de carbômero 980 a 0,5% p/p não sofreu
668 alterações significativas para variações do pH entre 5,0 e 8,0, sendo todas as bases
669 indicadas para uso dermatológico.

670 A análise do perfil de textura é útil na caracterização dos produtos semissólidos
671 por fornecer informações acerca da manutenção da integridade da estrutura dos géis.
672 Na prática, as informações podem ser relacionadas à consistência e à espalhabilidade
673 das formulações. A análise do perfil de textura (TPA) é feita mediante inserção e
674 retorno à superfície de uma sonda na amostra, sendo as informações obtidas nesta
675 trajetória empregadas para determinar parâmetros como força de dureza, deformação
676 na dureza, adesão, força de adesão, adesividade, coesividade, elasticidade e índice
677 de elasticidade. No ensaio, a sonda imita o dedo colocando pressão sob a superfície

678 do produto e espalhando-o sobre a pele (TAI, BIANCHINI, JACHOWICZ, 2014;
679 CALIXTO, CAMPOS, 2017; CALIXTO, INFANTE, CAMPOS, 2018). Os resultados
680 obtidos no ensaio TPA do GB e de FG2 são dados na Tabela 4.

681

682 **Tabela 4.** Parâmetros de textura das formulações GB e FG2 sob diferentes condições
683 de armazenagem, nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias

Parâmetros	GB	FG2		FG2				
		T0	T1		T2		T3	
		CA	CA	SR	CA	SR	CA	SR
Dureza	106,00	95,00	62,00	67,00	53,00	68,00	54,60	78,00
(Ciclo 1) (g)	(± 0,00)	(± 1,00) ^a	(± 1,24) ^b	(± 2,05) ^c	(±1,11) ^c	(±2,00) ^b	(±1,6) ^b	(±6,3) ^{a,b,c}
Elasticidade	4,79	7,30	7,15	7,21	8,465	7,66	6,90	6,64
(mm)	(± 0,08)	(± 0,08) ^a	(± 1,26) ^a	(± 0,24) ^a	(±0,56) ^a	(±0,59) ^a	(±0,44) ^a	(±0,44) ^a
Índice de	0,61	0,92	0,89	0,90	1,06	0,94	0,86	0,87
elasticidade	(± 0,04)	(± 0,14) ^a	(± 0,03) ^a	(± 0,06) ^a	(±0,08) ^a	(±0,09) ^a	(±0,06) ^a	(±0,03) ^a
Coesividade	1,019	0,95	0,93	0,95	1,39	1,029	0,82	0,85
	(±0,00)	(±0,11) ^a	(±0,03) ^a	(±0,01) ^a	(±0,02) ^a	(±0,07) ^a	(±0,01) ^b	(±0,01) ^b
Força de	68,00	49,00	35,00	38,00	29,00	42,00	32,00	40,00
adesão (g)	(±14,62)	(± 5,90) ^a	(± 2,05) ^b	(± 0,00) ^a	(±0,94) ^b	(±1,69) ^a	(±0,12) ^b	(±0,14) ^a
Adesividade	3,30	3,40	2,70	2,80	2,20	2,70	2,70	2,80
(mJ)	(± 0,00)	(± 0,64) ^a	(± 0,52) ^a	(± 0,30) ^a	(±0,28) ^a	(±0,30) ^a	(±0,14) ^a	(±0,3) ^a

684 CA = condição ambiente ($27 \pm 2^{\circ}$ C); SR = sob refrigeração ($5 \pm 2^{\circ}$ C).

685 Valores entre parênteses representam o desvio padrão (n = 3).

686 ^{a,b,c}Letras iguais mostram ausência de diferença estatística ($p < 0,05$) entre as colunas.

687

688 Na avaliação do perfil de textura, a dureza se correlaciona à resistência da
689 estrutura do gel à deformação, ou seja, à penetração da sonda. A força máxima
690 necessária para a sonda deformar uma amostra e penetrar na mesma representa a
691 sua firmeza, enquanto o trabalho total realizado para atingir este máximo, representa
692 a consistência do produto. A coesividade, por sua vez, mede a extensão a qual uma
693 amostra pode ser deformada antes de romper. Os parâmetros firmeza, consistência e
694 coesividade podem ser relacionadas à facilidade de aplicação e espalhamento dos
695 produtos. A capacidade de espalhamento denota a extensão da área na qual o gel se
696 espalha prontamente em sua aplicação. Por outro lado, a adesividade é a medida do

697 trabalho necessário para remover a sonda completamente do produto e se relaciona
698 ao trabalho necessário para superar as forças de atração existentes entre a amostra
699 e a superfície. A alta adesividade e o trabalho de adesão nas formulações se
700 relacionam à permanência do produto nas superfícies, sua remoção e à pegajosidade
701 das amostras (LAU; TANG; PAULSON, 2000; ERDEM, 2005; MAJITHIYA et al., 2006;
702 PANDIT; POL; KULKARNI, 2016; GILBERT et al., 2013).

703 A incorporação do EBSCR no GB promoveu redução de todos os parâmetros
704 de textura, sugerindo que houve afrouxamento das cadeias no gel, que apresentou
705 menor firmeza e consistência e, maior capacidade e facilidade de espalhamento, o
706 que é uma vantagem para a aplicação e remoção sobre áreas lesionadas. Pandit, Pol
707 e Kulkarni (2016), prepararam gel de xiloglucano que apresentou valores dos
708 parâmetros de dureza, coesividade e adesividade inferiores aos observados no
709 presente trabalhos (16,3 g, 0,81 e 0,4 mJ, respectivamente), mas que foi considerado
710 apropriado para o uso na veiculação do cloridrato de lidocaína de uso bucal.

711 Na avaliação dos parâmetros de textura da formulação FG2 ao longo do tempo,
712 não foram observadas variações significativas ($p < 0,05$) para os parâmetros
713 elasticidade, índice de elasticidade e adesividade das amostras armazenadas nas
714 duas condições, durante os 90 dias do estudo. Para a coesividade, não houve
715 variação significativa das medidas para as amostras guardadas em ambas as
716 condições, durante 60 dias. Para a força de adesão, não houve variação significativa
717 para as formulações armazenadas sob refrigeração e, finalmente, a dureza, as
718 alterações foram consideradas significativas ($p < 0,05$) para todas as condições de
719 armazenagem.

720 Pode-se notar que, apesar da incorporação do extrato promover a redução nos
721 parâmetros de textura do gel base e de ocorrerem alterações em FG2 ao longo do
722 tempo, sugerindo afrouxamento das cadeias do gel, todas as amostras permaneceram
723 íntegras, sem quebra e fluidificação do gel, o que foi confirmado nos ensaios de
724 estresse térmico e mecânico. Tais achados corroboram aqueles encontrados por
725 Fleck et al. (2013), que atribuíram a manutenção da estrutura do gel de carbômero
726 contendo extrato de romã à interações complexas entre os compostos bioativos do
727 mesmo e as cadeias do polímero aniônico. Métodos de análise que submetem as
728 amostras a condições aceleradas de variação de temperatura e gravidade são úteis
729 para prever incompatibilidades e a possibilidade de existência de fenômenos físicos

730 de sedimentação, separação de fases ou fluidificação (TADROS, 2004; TOZETTO et
731 al., 2017).

732 Para todos os produtos submetidos aos diferentes ciclos de temperatura
733 observou-se a ocorrência de redução na viscosidade dos géis a partir de 40° C. No
734 entanto, não houve alteração de cor, que permaneceu homogênea, nem a presença
735 de sedimento ou material em flutuação foi notada. Após o resfriamento ocorreu
736 aumento da consistência dos géis. Ao contrário, não ocorreram alterações nas
737 formulações FG2 armazenadas em condições do ambiente e sob refrigeração quando
738 submetidas aos diferentes ciclos de centrifugação, em nenhum dos tempos e
739 condições de armazenagem estudadas, não sendo verificada a existência de
740 fluidificação ou a presença de componentes no fundo dos tubos ou na superfície dos
741 géis. Fleck et al. (2016) observaram que não houve alterações em géis de carbômero
742 980 a 1% p/p contendo extrato hidroetanólico do pericarpo de romã a 2% p/p
743 submetidos a ciclos de centrifugação, de modo similar ao observado no presente
744 trabalho.

745

746 **3.4 Pesquisa do teor de fenóis totais e manutenção da atividade antimicrobiana**

747 Os valores encontrados na determinação do teor de fenóis totais no gel são
748 dados na Tabela 5. Para cada tempo avaliado foi determinada uma reta analítica com
749 vistas a assegurar a manutenção das condições padronizadas do ensaio, sendo
750 valores de $r \geq 0,99$ considerados adequados.

751

752 **Tabela 5.** Retenção de fenóis totais nos géis ao longo do tempo

		T0	T1	T2	T3
Teor (%)	CA	57,712	47,734	45,214	42,322
	SR	-	49,034	47,234	45,542
CC		0,9986	0,9963	0,9973	0,9986

753

CA = condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$); SR = sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ \text{C}$).

754

755 O método proposto para a determinação do teor de fenóis totais nos géis se
756 mostrou adequado, uma vez que não houve interferência na leitura do gel base puro.
757 Nurman et al. (2019) prepararam géis de carbômero 940 em diferentes concentrações
758 contendo nanopartículas moídas de café arábica com conteúdo fenólico de 1246,897
759 $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ e observaram redução do teor de FT nas preparações finais, com valores

760 que variaram de 540,86 a 672,10 $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$. O método de determinação foi o mesmo
 761 utilizado no presente trabalho e os autores notaram redução no teor de fenóis de cerca
 762 de 50% ao compararem os valores obtidos para o extrato puro e no gel após o preparo
 763 das formulações.

764 Para as formulações mantidas em condição ambiente e sob refrigeração
 765 durante 30 dias, a diminuição do teor de FT foi inferior a 10% sendo o menor valor
 766 obtido para o gel refrigerado. Para todas as demais condições, a redução no teor foi
 767 superior a 10%, sendo a maior redução observada para a formulação FG2
 768 armazenada durante 90 dias, em ambas as condições (entre 12 e 15,5%).

769 A manutenção da atividade antimicrobiana foi pesquisada nas amostras FG2
 770 armazenadas durante 30 dias, em temperatura ambiente e sob refrigeração, já que
 771 nestas condições a redução no teor de fenóis totais foi inferior a 10%. Os resultados
 772 foram comparados com aqueles obtidos no tempo 0 e podem ser vistos na Tabela 6.

773

774 **Tabela 6.** Diâmetro das zonas de inibição (mm \pm DP) encontrados para as
 775 formulações armazenadas ao longo do tempo

Cepas	Controles negativos		Gel com EBSCR		
	GBCC	GBSC	T0	T1	
				CA	SR
<i>S. aureus</i> (ATCC 25.923)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	28,33 ($\pm 2,08$) ^a	22,00 ($\pm 1,24$) ^b	23,00 ($\pm 0,47$) ^b
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12.228)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	29,00 ($\pm 1,00$) ^a	29,00 ($\pm 0,47$) ^a	30,00 ($\pm 0,00$) ^a
<i>E. coli</i> (ATCC 25.922)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	36,33 ($\pm 0,58$) ^a	20,00 ($\pm 0,47$) ^b	20,00 ($\pm 2,16$) ^b
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27.853)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	16,00 ($\pm 0,00$) ^a	24,00 ($\pm 0,47$) ^b	23,00 ($\pm 0,00$) ^b
<i>C. albicans</i> (ATCC 24.433)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	18,33 ($\pm 0,58$) ^a	27,00 ($\pm 0,81$) ^b	23,00 ($\pm 0,81$) ^c

776

GBSC = gel base cem conservante; GBSC = Gel base sem conservante.

777

CA = condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$); SR = sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ \text{C}$).

778

Valores entre parênteses representam o desvio padrão (n = 3).

779

^{a,b,c}Letras iguais mostram ausência de diferença estatística ($p < 0,05$) entre as colunas.

780

781 A adequação dos experimentos ao protocolo CSLI (2019) foi observada pela
782 existência de zona de inibição para os controles positivos e não foram observadas
783 zonas de inibição para os controles negativos. Para as formulações do gel
784 armazenadas sob ambas as condições, houve a formação de zonas de inibição,
785 demonstrando a manutenção da atividade antimicrobiana. A partir da análise
786 estatística dos dados é possível notar que ocorreram alterações significativas ($p < 0,05$)
787 nos valores dos diâmetros das zonas de inibição quando foram comparados os
788 resultados do dia 30 e do dia 0. Para as cepas de *S. aureus* e *E. coli* houve redução
789 nos valores, enquanto para *P. aeruginosa* e *C. albicans*, ocorreu aumento. Já para *S.*
790 *epidermidis* não ocorreu variação considerada significativa.

791 A retenção do teor de fenóis totais ao longo do tempo é condição fundamental
792 para o sucesso no uso do produto proposto para a finalidade pretendida, uma vez que
793 as atividades antimicrobiana e cicatrizante dos extratos de romã são relacionadas ao
794 conteúdo de compostos fenólicos presentes nos mesmos (GUO et al., 2008; MURTHY
795 et al., 2002; MURTHY et al., 2004; PUNEETH; CHANDRA, 2020). Reações de
796 oxidação e hidrólise são as principais causas de degradação em compostos bioativos
797 presentes nas cascas do romã, nomeadamente, em taninos hidrolisáveis como os
798 elagitaninos. A punicalagina, componente majoritário de extratos de romã, pode ser
799 hidrolisada em punicalina, com liberação de ácido hexahidroxidifênico (HHDP) que,
800 por sua vez, sofre hidrólise espontânea à ácido elágico sob certas condições. Pode
801 ocorrer também a formação de compostos galoidínicos e ácido gálico, também
802 precursor do ácido elágico. Tais reações podem causar alterações no teor de FT e
803 modificações em outros parâmetros como cor e pH, como observado no presente
804 trabalho (LANDETTTE, 2011; SUN et al., 2017; HE et al., 2019). A existência de
805 atividade antimicrobiana para FG2 recém preparado e nas amostras armazenadas por
806 30 dias pode ser justificada pela presença de compostos fenólicos totais. Ainda, a
807 manutenção da atividade antimicrobiana pode ser explicada também pela formação
808 de ácido elágico e ácido gálico nos géis levando à redução do pH nas amostras, uma
809 vez que há atividade antimicrobiana relatada também para estes compostos bioativos
810 (ROSAS-BURGOS et al., 2017; PAKARANANT et al., 2010; REDDY et al., 2007).

811 Para produtos manipulados, convencionou-se atribuir uma data de expiração
812 para o produto (*beyond-date use*), que forneça a data após a qual a preparação não
813 deve ser usada, sendo determinado a partir da data em que a mesma é manipulada
814 (ALLEN, 2011; KAWANO; HO, 2012; KIENLE, 2017). Segundo a Farmacopeia

815 Americana (2014), o prazo de expiração estabelecido para produtos semissólidos
 816 manipulados de uso tópico (pele ou mucosas), não estéreis e que contêm água na
 817 formulação, não deve ser superior a 30 dias. Em revisão recente da seção <795> da
 818 Farmacopeia Americana (2019), convencionou-se que a data de expiração para
 819 produtos manipulados tópicos que contêm água e sistemas conservantes pode se
 820 estender à 35 dias. A partir da análise conjuntas dos resultados, a condição e o tempo
 821 de armazenagem recomendados para manutenção do gel contendo extrato seco bruto
 822 das cascas de romã são a refrigeração e o período de 30 dias. Mallery et al. (2008)
 823 recomendaram a armazenagem de gel de carbômero contendo extrato de framboesa
 824 preta a 4^o C, uma vez que esta foi a temperatura considerada ideal para a retenção
 825 da atividade de antocianinas presentes no extrato.

826

827 **3.5 Controle de qualidade microbiológico**

828 Finalmente, a qualidade microbiológica dos géis foi pesquisada. A pesquisa da
 829 carga microbiana e da presença de microrganismos patogênicos em produtos não
 830 estéreis é uma das exigências em relação a critérios de aceitação e segurança dos
 831 mesmos, pois, além de comprometer a estabilidade, a eficácia terapêutica e as
 832 características físico-químicas do produto, como odor, cor, pH e teor de compostos
 833 bioativos, microrganismos apresentam risco a saúde do consumidor, especialmente,
 834 aqueles com potencial patogênico (MAHAGUNA et al., 2004; MALLERY et al., 2008).
 835 Portanto, produtos farmacêuticos de uso tópico não estéreis devem ser submetidos a
 836 testes capazes de avaliar a eficácia do sistema conservante selecionado em inibir a
 837 contaminação microbiana e a proliferação de microrganismos patogênicos (BRASIL,
 838 2019; USP, 2019). Os resultados das análises podem ser vistos na Tabela 7.

839

840 **Tabela 7.** Contagem de microrganismos viáveis em amostras do gel contendo extrato
 841 mantidos sob diferentes condições de armazenagem, nos tempos 0 e 90 dias

T0		T90			
		CA		SR	
UFC.g ⁻¹	<100	Bactérias	Fungos	Bactérias	Fungos
	< 100	<100	< 100	<100	< 100

842

CA = condição ambiente (27 ± 2^o C); SR = sob refrigeração (5 ± 2^o C).

843

844 Segundo recomendações da Farmacopeia Brasileira (2019), o limite máximo
845 permitido para bactérias aeróbias mesófilas é de 10^3 UFC.g⁻¹ e o limite máximo para
846 fungos é de 10^2 UFC.g⁻¹. De acordo com os valores encontrados no presente trabalho,
847 os produtos atenderam as especificações, uma vez que os números de unidades
848 formadoras de colônias foram inferiores ao preconizado. De forma semelhante, a
849 pesquisa de microrganismos patogênicos mostrou que não houve crescimento
850 daqueles pesquisados nas amostras mantidas sob ambas as condições de
851 armazenagem e durante todo o período de estudo.

852 Além da eficácia do sistema conservante selecionado em evitar a proliferação
853 de microrganismos sob todas as condições estudadas, tais achados indicam que o
854 produto foi preparado em atendimento às normas de boas práticas de fabricação e
855 que é seguro para o uso do ponto de vista da qualidade microbiológica. Mallery et al.
856 (2008), prepararam géis de carbômero 971P contendo extrato de framboesas pretas
857 e obtiveram géis livres de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e
858 *Pseudomonas aeruginosa*. A contagem de microrganismos aeróbios totais foi inferior
859 a 300 UFC.g⁻¹, exceto para leveduras. Os autores consideraram os valores em
860 conformidade com as boas práticas de fabricação. Estudos realizados por Fleck et al.
861 (2016) em géis de carbômero 940 a 1% p/p aos quais foi incorporado extrato de
862 cascas de romã a 2% p/p mostraram que não foi observado crescimento de bactérias
863 mesófilas e microrganismos patogênicos. No entanto, foi observado crescimento de
864 fungos em algumas diluições, que os autores atribuíram ao tipo de embalagem. Em
865 outro estudo, Dehdari et al. (2021), prepararam gel de carbômero 940 contendo
866 extrato aquoso de *Boswellia* (0,5% e 1%) e não encontraram a presença de *S. aureus*,
867 *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

868

869 **4 Conclusões**

870

871 Avaliar a viabilidade do emprego de extratos vegetais como coprodutos da
872 agroindústria para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos contribui para a
873 possibilidade de gerir adequadamente biorresíduos no meio ambiente. Portanto,
874 empregar extratos provenientes das cascas de romã em formulações farmacêuticas é
875 uma proposta de grande relevância. Para o EBSCR, os resultados obtidos na
876 caracterização química indicaram a presença de alto teor de fenóis totais e atividade
877 antioxidante, parâmetros sugestivos da existência de ação antimicrobiana e

878 antioxidante, necessárias para o uso do produto no tratamento de lesões. No que diz
879 respeito à concentração do extrato no gel, constatou-se, estatisticamente, que na
880 proporção de 2,5% p/p, o EBSCR se mostrou efetivo para inibir o crescimento dos
881 microrganismos testados. O emprego da menor concentração de derivados vegetais
882 em formulações farmacêuticas é preferido em função da menor interferência em
883 parâmetros de qualidade das formulações bem como nos custos das mesmas.
884 Verificou-se a existência de alterações em todos os parâmetros físico-químicos de
885 qualidade analisados para as amostras dos géis contendo o extrato quando
886 comparado ao gel base e das amostras do gel contendo extrato armazenados sob as
887 diferentes condições ao longo do estudo. Os ensaios de perfil de textura e de estresse
888 físico mostram que não ocorreu desestruturação e fluidificação das amostras, o que
889 pode ser justificado pela existência de interações complexas entre os constituintes do
890 EBSCR e o carbômero, como já evidenciado por outros autores. As maiores reduções
891 nos valores de pH e no teor de fenóis totais foram verificadas nos géis mantidos em
892 condição ambiente, por períodos superiores a 30 dias. Por este motivo, a condição de
893 refrigeração por 30 dias é recomendada para a armazenagem do produto. Tal período
894 está de acordo com o preconizado para a data de uso prevista para formulações
895 semissólidas contendo preparadas em pequena escala. A eficácia antimicrobiana do
896 gel foi mantida para as amostras armazenadas sob ambas as condições por 30 dias,
897 provavelmente, em função da retenção do teor de fenóis totais e a formação de
898 metabólitos que também possuem atividade antimicrobiana. Por fim, os requerimentos
899 de qualidade microbiológica para os géis foram atendidos. Neste contexto, pode-se
900 concluir que pode ser preparada uma formulação com qualidade, eficácia e segurança
901 a partir do extrato bruto seco proveniente das cascas de romã, sendo o mesmo
902 potencialmente útil para agregar valor à biorresíduos do fruto, contribuindo para as
903 práticas de manejo e gestão ambiental.

904

905 **Declaração de interesses:** os autores declaram que não há conflitos de interesse na
906 execução do presente trabalho.

907

908 **Financiamento:** o presente trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de
909 Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Edital nº 09/2019 (TO
910 050/2020).

911

912 **Agradecimentos:** os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e
913 Inovação do Estado do Espírito Santo (FAPES, Brasil); ao Conselho Nacional de
914 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil); e, à Coordenação de
915 Aperfeiçoamento de pessoa de Nível Superior (CAPES, Brasil) (modalidade de
916 financiamento - 01).

917

918 **Referências**

919

920 ABDEALSIEDE, M.M.S.; ALRASHEID, A.A.; OMAR, M.M. A.; ELBASHIR, A.E
921 Antimicrobial and antioxidant activity of pomegranate-peel extracts obtained by
922 sequential extraction method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and
923 Development**. v.8, n.2, p. 14-20. 2020. Doi: 10.22270/ajprd.v8i2.710

924 ABDOLLAHZADEH, S. H.; MASHOUF, R.; MORTAZAVI, H.; MOGHADDAM, M.;
925 ROOZBAHANI, N.; VAHEDI, M. Antibacterial and antifungal activities of Punica
926 granatum peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry**. v.8, n.1, p. 1-
927 6, 2011.

928 ALLEN, L.V. Basics of compounding: Implementing United States Pharmacopeia
929 Chapter pharmaceutical compounding – Nonsterile preparations, Part 1.

930 **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v.15, n.4, p.328-331,
931 2011.

932 AMAL, B.; VEENA, B.; JAYACHANDRAN, V. P.; SHILPA, J. Preparation and
933 characterisation of *Punica granatum* pericarp aqueous extract loaded chitosan-
934 collagen-starch membrane: role in wound healing process. **Journal of Materials
935 Science: Materials in Medicine**, v.26, n.5, p.181, 2015. Doi: 10.1007/s10856-015-
936 5515-2

937 ANTUNES, A. E. C.; MOTTA, E. M. P.; ANTUNES, A. J. Perfil de textura e
938 capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de
939 leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.183-189, 2003.

940 Doi:10.1590/S0101-20612003000400034

941 ASLANI, A.; ZOLFAGHARI, B.; DAVOODVANDI, F. Design, formulation and
942 evaluation of an oral gel from *Punica Granatum* flower extract for the treatment of
943 recurrent aphthous stomatitis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 3, p.
944 391-398, 25 set. 2016.DOI: 10.15171/apb.2016.051

945 AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ªEd., São Paulo: Artmed,
946 2005. 677 p.

947 BALOGLU, E.; KARAVANA, S. Y.; SENYIGIT, Z. A.; GUNERI, T. Rheological and
948 mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base.

949 **Pharmaceutical Development and Technology**, v.16, n.6, p.627-636,
950 2010. Doi:10.3109/10837450.2010.508074

951 BATISTA, S.V.; SILVA, T.M.; SALOMÃO, S.B.; BASTOS, K.A.; SOUZA, S.O.L.;
952 COTRIM, M.A.P.; ORÉFICE, R.L.; DE ANDRADE, S.F.; CARETA, F.P., SEVERI,
953 J.A.; RESENDE, J.A.; OLIVEIRA VILLANOVA, J.C. *In vitro* activity of pomegranate
954 peel extract alone and in electrospun poly(vinyl alcohol)/sodium alginate matrix.

955 **Biomedical and Biopharmaceutical Research**. v.17, n.1, p.1–19.

956 Doi:10.19277/BBR.17.2.239

957 BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G.F. Rheological,
958 adhesive and release characterization of semisolid Carbopol/ tetraglycol systems.

- 959 **International journal of pharmaceutics**, v.307, n.2, p.129–140, 2006.
960 Doi:10.1016/j.ijpharm.2005.09.034
- 961 BORGES, E.L. **Tratamento de feridas: Avaliação de um protocolo**. Orientador:
962 Daclé Vilma Carvalho.164f. Dissertação (Mestre em Enfermagem) - Universidade
963 Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2000.
- 964 BORGES, G.; CROZIER, A. HPLC–PDA–MS fingerprinting to assess the authenticity
965 of pomegranate beverages. **Food Chemistry**, v.135, n.3, p.1863-1867, 2012. Doi:
966 10.1016/j.foodchem.2012.05.108
- 967 BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELICI, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method
968 to evaluate antioxidant activity. **Lebenswite Wissenschaft und Technologie**, v. 28,
969 p. 25-30, 1995.
- 970 BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia**
971 **Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2020.
- 972 BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia**
973 **Brasileira**, volume 1. 2ª Ed. Brasília, 2012.
- 974 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade**
975 **de produtos cosméticos**. 2ª Ed. Brasília, 2008.
- 976 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade dos**
977 **cosméticos**. 1ªEd. Brasília: Anvisa, 2004.
- 978 CALIXTO, I.S.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Physical-mechanical characterization of
979 cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and
980 sensorial properties. **International Journal of Cosmetic Science**. v.39, n.5, p.527-
981 534,2017. Doi: 10.1111/ics.12406
- 982 CALIXTO, L. S.; INFANTE, V. H. P.; CAMPOS, P.M.B.G. Design and
983 characterization of topical formulations: correlations between instrumental and
984 sensorial measurements. **AAPS PharmSciTech**. v.19, n.4, p. 1512–1519, 2018.
- 985 ÇAM, M.; HIŞİL, Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate
986 peels. **Food Chemistry**, v.123, n.3, p 878–885, 2010. Doi: 10.1016 /
987 j.foodchem.2010.05.011
- 988 CELIKTAS, Y.O.; BEDIR, E.; SUKAN, Y.F. In vitro antioxidant activities of
989 *Rosemarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. **Food**
990 **Chemistry**. v.101, n.4, p.1474-1481, 2007. Doi: 10.1016 / j.foodchem.2006.03.055
- 991 CHALKE, T.; SHARMA, K.; NAGARE, S.K.; JIRGE, S.S. Formualtion and evaluation
992 of *Punica* topical gel for its content of gallic acid and anti-microbial study.
993 **International Journal of Drug Delivery Technology**, v. 6, n. 3, p. 75-78, 2016. Doi:
994 10.25258/ijddt.v6i3.8892
- 995 CHARALAMPIA, D.; KOUTELIDAKIS, A. From Pomegranate Processing By-
996 Products to Innovative value added Func-tional Ingredients and Bio-Based Products
997 with Several Applications in Food Sector. **BAOJ Biotechnology**, v.3, n1, p.1-7,
998 2017.
- 999 CHAVES, M. E.A.; PIANCASTELLI, A.C.C.; ARAUJO, A.R.; PINOTTI, M. Effects of
1000 low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **Anais Brasileiros de**
1001 **Dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 616-623, 2014. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20142519
- 1002 CHIDAMBARA, M. K.; REDDY, V. K.; VEIGAS, J. M.; MURTHY, U. D. study on
1003 wound healing activity of *Punica granatum* peel. **Journal of Medicinal Food**, v.7,
1004 n.2, p.256–259, 2004. Doi: 10.1089 / 1096620041224111
- 1005 **CLSI** (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Methods for Dilution
1006 Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved
1007 standard M100- 29ªEd. 2019.
- 1008 CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B., IGNÁCIO, R.F., LEONARDI, G.R.

- 1009 Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista**
1010 **Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p.73-78, 2005. Doi:
1011 10.1590/S1516-93322005000100008
- 1012 COSTA, A.J. S.; ALBURQUERQUE, P. I. A.; COSTA, F.L.; LIMA, N. N. M. F.;
1013 PESSOA, C.V. Desenvolvimento de formulação anti-inflamatória e cicatrizante a base
1014 de romã (*Punica granatum*), confrei (*Symphytum officinale*) e calêndula (*Calendula*
1015 *officinalis*). **Mostra Científica da Farmácia**, v.6, n.1, 2019.
- 1016 COSTA, N.N.; DE FARIA LOPES, L.; FERREIRA, D.F.; PRADO, E.M.L.; SEVERI,
1017 J.A.; RESENDE, J.A.; CARETA, F.P., FERREIRA, M.C.P.; CARREIRA, L.G.; DE
1018 SOUZA, S.O.L.; COTRIM, M.A.P.; BOEING, T.; ANDRADE, S.F.; ORÉFICE, R.L.;
1019 VILLANOVA, J.C.O. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on
1020 PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: *In vitro* analysis and
1021 physicochemical evaluation. **Materials Science Engineering C Materials for**
1022 **Biological Application**, v.109, n.1, p.110643-11702, 2020.
1023 Doi:10.1016/j.msec.2020.110643
- 1024 DAS, U.; BEHERA, S. S.; PRAMANIK, K. Ethno-herbal-médico in wound repair: an
1025 incisive review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 4, p. 579–590, 2017. Doi:
1026 10.1002/ptr.5786
- 1027 DEHDARI, S.; HAJIMEHDIPOOR, H.; ARA, L.; TANSAZ, M.; Formulation and quality
1028 assessment of *Boswellia* vaginal gel. **Research Journal of Pharmacognosy**. v.8,
1029 n.2, p.1–4. DOI:10.22127/rjp.2021.233569.1600
- 1030 DERAKHSHAN, Z.; FERRANTE, M.; TADI, M.; ANSARI, F.; HEYDARI, A.;
1031 HOSSEINI, M.S.; CONTI, G.O.; SADARABAD, E.K., Antioxidant activity and total
1032 phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds, **Food**
1033 **and Chemical Toxicology** v.114, n.1, p.108–111, 2018. Doi: 10.1016/
1034 j.fct.2018.02.023
- 1035 DOOSTKAM, A.; IRAVANI, K.; BASSIRI-JAHROMI, S. *Punica granatum L.*
1036 (Pomegranate): A Potential Anti-microbial Agent. **Anti-Infective Agents**, v.18, n.1,
1037 p.2-14, 2019. Doi: 10.2174/2211352517666190215113232
- 1038 DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, ELB; CEREDA, E.; VILEGAS, W.
1039 Chemical investigation and effects of the tea of passiflora alata on biochemical
1040 parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005.
1041 Doi: 10.1016/j.jep.2004.06.021
- 1042 EL BARNOSSI, A.; MOUSSAID, F.; IRAQI, H. A. Tangerine, banana and
1043 pomegranate peels valorisation for sustainable environment: a review.
1044 **Biotechnology Reports**, 2021, n. 29, p. e00574. Doi:10.1016/j.btre.2020.e00574
- 1045 ELFALLEH, W.; HANNACHI, H.; TLILI, N.; YAHIA, Y.; NASRI, N.; FERCHICH, A.
1046 Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and
1047 flower. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 32, p. 4724–4730, 2012. Doi:
1048 10.5897/JMPR11.995
- 1049 EL-SAID, M. M.; HAGGAG, H.F.; EL-DIN, H.M.F.; GAD, A.S.; FARAHAT, A.M.
1050 Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with
1051 pomegranate peel extracts. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 2, p. 207–
1052 212, 2014. Doi: 10.1016 / j.aogas.2014.11.007
- 1053 ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v.26, n.2,
1054 p.31-37, 2008. Doi: 10.1016 / j.mpsur.2007.11.005
- 1055 ERDEM, Y. K. Effect of ultrafiltration, fat reduction and salting on textural properties
1056 of white brined cheese. **Journal of Food Engineering**, v.71, n.4, p.366-372, 2005.
1057 Doi:10.1016 / j.jfoodeng.2004.10.040

- 1058 FARIA, M. T.; PEREIRA, S. M. DE F. Avaliação da Atividade Antioxidante e
1059 Características Físico-Químicas de Polpa de Romã (*Punica Granatum, L.*). **Revista**
1060 **Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 14, n. 2, p. 20-27, 2019.
1061 Doi:10.29184/1980-7813.rcfmc.223.vol.14.n2.2019
- 1062 FAZIO, A.; IACOPETTA, D.; LA TORRE, C.; CERAMELLA, J.; MUIÀ, N.;
1063 CATALANO, A.; SINICROPI, M. S. Finding solutions for agricultural wastes:
1064 antioxidant and antitumor properties of pomegranate Akko peel extracts and β -
1065 glucans recovery. **Food & Function**. v.9, n.1, p.6619-6632, 2018.
1066 Doi:10.1039/c8fo01394b
- 1067 FERNANDES, R. AP. **Fitossíntese de nanopartículas de prata a partir de extrato**
1068 **de cascas de romã e desenvolvimento de formulação para tratamento de**
1069 **feridas: avaliação antimicrobiana, citotóxica e potencial cicatrizante em um**
1070 **modelo in vivo**. Orientador: Debora de Barros Barbosa. 120f. Tese (Doutorado em
1071 ciência odontológica) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de
1072 Araçatuba, Araçatuba, 2017.
- 1073 FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of
1074 phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril
1075 and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 127, n.
1076 2, p. 807–821, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.156
- 1077 FLECK, A.; CABRAL, P. F.; VIEIRA, F. F.; PINHEIRO, D. A.; PEREIRA, C. R.;
1078 SANTOS, W. C.; MACHADO, T. B. *Punica granatum L.* hydrogel for wound care
1079 treatment: From case study to phytomedicine standardization. **Molecules**, v. 21, n. 8,
1080 p.1059, 2016. Doi: 10.3390/molecules21081059
- 1081 FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**.
1082 3ªEd. São Paulo: Edusp, 2003. 732p.
- 1083 GANESHKUMAR, M.; PONRASU, T.; KRITHIKA, R.; IYAPPAN, K.;
1084 GAYATHRI, V. S.; SUGUNA, L. topical application of acalyphya indica accelerates rat
1085 cutaneous wound healing by up-regulating the expression of type I and III collagen.
1086 **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 14–22, 2012. Doi:
1087 10.1016/j.jep.2012.04.005
- 1088 GERVASI, T.; PELLIZZERI, V.; CALABRESE, G.; DI BELLA G.; CICERO, N.;
1089 DUGO, G. Production of single cell protein (scp) from food and agricultural waste by
1090 using saccharomyces cerevisiae. **Natural Product Research**, v.32, n.6, p.648-653,
1091 2018. Doi:10.1080/14786419.2017.1332617
- 1092 GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.;
1093 KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with
1094 phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food**
1095 **Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4581–4589, out. 2000. Doi:10.1021/jf000404a
- 1096 GILBERT, L.; SAVARY, G.; GRISEL, M.; PICARD, C. Predicting sensory texture
1097 properties of cosmetic emulsions by physical measurements. **Chemometrics and**
1098 **Intelligent Laboratory Systems**. v.124, n.1, p. 21–31, 2013. Doi:
1099 10.1016/j.chemolab.2013.03.002.
- 1100 GONÇALVES, M. M.; ADONSKI, C.B.; FORTUNATO, A.T.; BORGES, B.P.;
1101 CARNEIRO, J. Development of eco-friendly formulations containing pomegranate
1102 (*Punica Granatum L.*) residue particles and extract. **Brazilian Journal of**
1103 **Development**, v. 7, n. 3, p. 22099–22109, 2021. Doi: 10.34117/bjdv7n3-088
- 1104 GÖZLEKÇI, S.; SARAÇOĞLU, O.; ONURSAL,; , ÖZGEN, M. Total phenolic
1105 distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars.
1106 **Pharmacognosy magazine**, v.7, n.26, p.161–164, 2011. Doi:4103/0973-1296.80681
- 1107 GULLON, B. et al. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of

- 1108 pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice
 1109 extraction. **Food Control**, v. 59, p. 94–98, 2016. Doi: 10.1016 /
 1110 j.foodcont.2015.05.025
- 1111 GÜNEŞ, S.; TIHMİNLİOĞLU, F. Hypericum perforatum incorporated chitosan films
 1112 as potential bioactive wound dressing material. **International Journal of Biological**
 1113 **Macromolecules**, v.102, p.933–943, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.080
- 1114 GUO, C.; WEI, J.; YANG, J.; XU, J.; PANG, W.; JIANG, Y. Pomegranate juice is
 1115 potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects.
 1116 **Nutrition research**. v. 28, n.2, p.72-77. Doi: 10.1016/j.nutres.2007.12.001
- 1117 HARDING, K.G.; MOORE, K.; PHILLIPS, T.J. Wound chronicity and fibroblast
 1118 senescence--implications for treatment. **International Wound Journal**, v.2, n.4,
 1119 p.364–368, 2005. DOI: 10.1111/j.1742-4801.2005.00149.x. PMID: 16618323.
- 1120 HASNAOUI, N.; WATHELET, B.; JIMÉNEZ-ARAUJO, A. Valorization of pomegranate
 1121 peel from 12 cultivars: dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional
 1122 properties. **Food Chemistry**, v.160, n.1, p.196-203, 2014. Doi:
 1123 10.1016/j.foodchem.2014.03.089
- 1124 HAYOUNI, E.A.; MILED, K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.;
 1125 IWASKI, H.; OKU, H.; MATSUI, T.; LIMAM, F.; HAMDİ, M. Phytomedicine
 1126 Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum L.* peels with enhanced
 1127 in vivo healing potential on dermal wounds. **European Journal of Integrative**
 1128 **Medicine**, v. 18, n. 11, p. 976–984, 2011. Doi: 10.1016/j.phymed.2011.02.011
- 1129 HSEU, Y.C.; CHANG, W. H.; CHEN, C. S.; LIAO, J. W.; HUANG, C. J.; LU, F. J.;
 1130 CHIA, Y. C.; HSU, H. K.; WU, J. J.; YANG, H. L. Antioxidant activities of *Toona*
 1131 *sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. **Food and Chemical**
 1132 **Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 105-114, 2008. Doi: 10.1016/j.fct.2007.07.003
- 1133 ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review
 1134 of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of**
 1135 **Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 397–405, 2012. Doi:10.1016/j.jep.2012.07.004
- 1136 JAISWAL, V.; DERMARDEROSIAN, A.; PORTER, J. R. Anthocyanins and
 1137 polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum L.*). **Food**
 1138 **Chemistry**. v.118, n.1, p. 11-16, 2010. Doi: 10.1016 / j.foodchem.2009.01.095
- 1139 JUSTINIANO, A. Feridas crónicas: fisiopatologia e tratamento. **Cadernos de Saúde**,
 1140 v. 3, n.1, p. 69-75, 2010. Doi:10.34632/cadernosdesaude.2010.3015
- 1141 KAWANO, H.O. Quality and safety in compounding non-sterile preparation.
 1142 **Pharmacy Connection**, p.29-32, 2012.
- 1143 KIENLE, P. C. Compounding nonsterile preparations: USP <795> and <800>.
 1144 **Pharmacy Today**, v. 23, n. 10, p. 56–72, 2017. Doi:
 1145 doi.org/10.1016/j.ptdy.2017.09.010
- 1146 KIM, J. Y.; SONG, J.Y.; LEE, E.J.; PARK, S.K. Rheological properties and
 1147 microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**.
 1148 V.281, p. 614-623, 2003. Doi: 10.1007/s00396-002-0808-7
- 1149 KO, K.; DADMOHAMMADI, Y.; ABBASPOURRAD, A. Nutritional and Bioactive
 1150 Components of Pomegranate Waste Used in Food and Cosmetic Applications: A
 1151 Review. **Foods**, v.10, n.3, p.657, 2021. Doi:10.3390/foods10030657
- 1152 LANDETE; J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review
 1153 about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v.44,
 1154 n.5 p.1150-1160. Doi:10.1016/j.foodres.2011.04.027
- 1155 LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin
 1156 mixed gels. **Food Research International**, v. 33, n.8, p. 665-671, 2000. Doi:
 1157 10.1016 / S0963-9969 (00) 00111-3

- 1158 LI, X.; MA, H.; HUANG, H.; LI, D.; YAO, S. Natural anthocyanins from
1159 phytoresources and their chemical researches. **Natural product research**. v.27,
1160 n.4–5, p.456–469, 2013. Doi: 10.1080/14786419.2012.706299
- 1161 LI, Y.; GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; XU, J.; CHENG, S. (2006). Evaluation of
1162 antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate
1163 pulp extract. **Food Chemistry**, v.96, n.2, p.254-260, 2006. Doi:
1164 10.1016/j.foodchem.2005.02.033
- 1165 LIU, G.; XIANG, X.; QINFENG, H.; YANXIANG, G. Supercritical CO₂ extraction
1166 optimization of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil using response surface
1167 methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.9, p. 1491–1495,
1168 2009. Doi l: 10.1016 / j.lwt.2009.04.011
- 1169 MACHADO, T. D. B.; LEAL, I.C.R.; AMARAL, A.C.F.;SANTOS, K.R.N.; SILVA, M.G.;
1170 KUSTER, R.M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. **Journal of the**
1171 **Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 5, p. 606-610, 2002. Doi: 10.1590/S0103-
1172 50532002000500010
- 1173 MACHADO, T.B. Preparations of pomegranate by-products are effective as
1174 dermatological healing herbal medicine. **Biomedical Journal of Scientific &**
1175 **Technical Research**, v.13, n.4, p.10092–10094, 2019. Doi:
1176 10.26717/bjstr.2019.13.002425
- 1177 MACHADO, T.B.; PINTO, A. V.; PINTO, M.C.F.R.; LEAL, I.C.R.; SILVA, M.G.;
1178 AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M.; NETTO-DOSSANTOS, K.R. In vitro activity of
1179 Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues,
1180 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of**
1181 **Antimicrobial Agents**. v.21, n.1, p.279–284, 2003. Doi:10.1016/S0924-
1182 8579(02)00349-7
- 1183 MAGANGANA, T.P.; MAKUNGA, N.P.; FAWOLE, O.A.; OPARA, U.L. Processing
1184 factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*punica*
1185 *granatum L.*) peel waste: A review. **Molecules**, v.25, n.20, p.1–34. 2020.
1186 DOI:10.3390/molecules25204690
- 1187 MAJITHIYA, R. J.; GHOSH, P. K.; UMRETHIA M. L.; MURTHY, R. S. R
1188 Thermoreversible-mucoadhesive gel for nasal delivery of sumatriptan, **AAPS**
1189 **PharmSciTech**, v.7, n.3, p.80– 86, 2006. Doi:10.1208 / pt070367
- 1190 MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de
1191 ultra eficiência. **Química Nova**. v.32, n.1, p.214-222, 2009. Doi:10.1590/S0100-
1192 40422009000100036
- 1193 MALVIYA, S.; ARVIND, J. A.; HETTIARACHCHY, N. Antioxidant and antibacterial
1194 potential of pomegranate peel extracts. **Journal of Food Science and Technology**,
1195 v. 51, n. 12, p. 4132–4137, 2014.DOI: 10.1007/s13197-013-0956-4
- 1196 MURTHY, K. N.; REDDY, V. K.; VEIGAS, J. M.; MURTHY, U. D. Study on wound
1197 activity of *Punica granatum* peel. **Journal of Medicinal Food**. v.7, n.2, p.256- 9.
1198 2004. Doi: 10.1089/1096620041224111
- 1199 MURTHY, K.N.C.; JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH R.P. Studies on the antioxidant
1200 activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vivo
1201 models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, n.1, p. 81-86.
1202 Doi:10.1021/jf010865b
- 1203 NAYAK, S.B.; RODRIGUES, V.; MAHARAJ, S.; BHOGADI, V.S. Wound healing
1204 activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of Medicinal Food**. v. 16, n. 9,
1205 p.857-861, 2013. Doi:10.1089/jmf.2012.0229.
- 1206 NDAYISHIMIYE, J.; CHUN, B. Optimization of carotenoids and antioxidant activity of
1207 oils obtained from a co-extraction of citrus (*Yuzu ichandrin*) by-products using

- 1208 supercritical carbon dioxide. **Biomass and Bioenergy**. v.106, n.1, p.1-7, 2017. Doi:
1209 10.1016/j.biombioe.2017.08.014.
- 1210 NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K. Antioxidant and antibacterial activities of Punica
1211 granatum peel extracts. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1473-1477, 2003.
- 1212 NEMA, N. et al. *In vivo* topical wound healing activity of *punica granatum* peel extract
1213 on rats. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v.1, n.2,
1214 p.195-200, 2013.
- 1215 NURMAN, S.; YULIA, R.; IRMAYANTI; NOOR, E.; SUNARTI, T.C. The optimization
1216 of gel preparations using the active compounds of arabica coffee ground
1217 nanoparticles. **Scientia Pharmaceutica**. V.87, n.4, p.32, 2019.
1218 Doi:10.3390/scipharm87040032
- 1219 OSTROSKY, E.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; NISHIKAWA, S.O; FREITAS, B.
1220 R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da
1221 Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de**
1222 **Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008. Doi: 10.1590/S0102-
1223 695X2008000200026
- 1224 PADMAJA, A.; PRASAD, N. B. L. Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Extract as
1225 a Source of Natural Antioxidant. **Journal of Food Science and Engineering**, v.1,
1226 n.1, p. 171-182, 2011.
- 1227 PAGLIARULO, C.; VITO, V.; PICARIELLO, G.; COLICCHIO, R.; PASTORE, G.;
1228 SALVATORE, P.; VOLPE, M.G. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum*
1229 L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of
1230 pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v.190,
1231 n.1, p.824-831, 2016. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.028
- 1232 PAL, J.; RAJU, C. V.; LAKSHMISHA, I.P.; PANDEY, G.; RAJ, R.; SINGH, R.R.
1233 Antioxidant activity of pomegranate peel extract and its effect on storage stability of
1234 cooked meat model system of Indian mackerel (*Rastrelliger kannaqurta*) stored at
1235 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 17, n. 1, p. 183-187, 2017.
- 1236 PANDIT, A. P.; POL, V. V.; KULKARNI, V. S. Xyloglucan based in situ gel of
1237 lidocaine hcl for the treatment of periodontosis. **Journal of Pharmaceutics**, v.1, n.1,
1238 p. 1-9, 2016. Doi:10.1155/2016/3054321
- 1239 PANICHAYUPAKARANANT, P. TEWTRAKUL, S.; YUENYONGSAWAD, S.
1240 Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised
1241 pomegranate rind extract. **Food Chemistry**, v.123, n.1, p.400-403, 2010.
1242 Doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.054.
- 1243 PATHAK, P. D.; MANDAVGANE, S. A.; KULKARNI, B. D. Valorization of
1244 Pomegranate Peels: A Biorefinery Approach. **Waste and Biomass Valorization**, v.8,
1245 n.4, p.1127–1137, 2016. Doi:10.1007/s12649-016-9668-0
- 1246 PATTANAYAK, S.; DUTTA, M.K; DEBNATH, P. K.; BANDYOPADHYAY, S.K. A
1247 study on ethno-medicinal use of some commonly available plants for wound healing
1248 and related activities in three southern districts of west bengal, india. **Exploratory**
1249 **Animal and Medical Research**, v.2, n.2, p. 97-110, 2012.
- 1250 PIAZZA, S.; FUMAGALLI, M.; KHALILPOUR, S.; MARTINELLI, G.; MAGNAVACCA,
1251 A.; DELL'AGLI, M.; SANGIOVANNI, E. Uma revisão dos benefícios potenciais de
1252 plantas produtoras de frutas vermelhas em doenças de pele. **Antioxidants**, v.9, n.6,
1253 p.542, 2020. Doi: 10.3390/antiox9060542
- 1254 POLERÁ, N.; BADOLATO, M.; PERRI, F.; CARULLO, G.; AIELLO, F. Quercetin and
1255 its natural sources in wound healing management. **Current Medicinal Chemistry**, v.
1256 26, n. 31, p. 5825-5848, 2019. DOI:10.2174/0929867325666180713150626
- 1257 PONRASU, T.; SUGUNA, L. Efficacy of *Annona squamosa* L in the synthesis of

- 1258 glycosaminoglycans and collagen during wound repair in streptozotocin induced
1259 diabetic rats. **BioMed Research International**, v.1, n.1, 1-10 2014, 2014.
1260 Doi:10.1155/2014/124352
- 1261 PRASHANT, D.; ASHA, M. K.; AMIT, A. Antibacterial activity of *Punica granatum*.
1262 **Fitoterapia**. v.72, p.171-173, 2001.
- 1263 PRICE, P. E.; FAGERVIK-MORTON, H.; MUDGE, E. J.; BEELE, H.; RUIZ, J. C.;
1264 NYSTROM, T. H.; LINDHOLM, C.; MAUME, S.; MELBY-OSTERGAARD, B.; PETER,
1265 Y.; ROMANELLI, M.; SEPPÄNEN, S.; SERENA, T. E.; SIBBALD, G.; SORIANO, J.
1266 V.; WHITE, W.; WOLLINA, U.; WOO, K. Y.; WYNDHAM-WHITE, C.; HARDING, K.
1267 G. Dressing-related pain in patients with chronic wounds: an international patient
1268 perspective. **International Wound Journal**, v. 5, n. 2, p. 159-171, 2008. Doi:
1269 10.1111/j.1742-481X.2008.00471.x
- 1270 PUNEETH, H. R.; SHARATH CHANDRA, S. P. A review on potential therapeutic
1271 properties of pomegranate (*Punica granatum L.*). **Plant Science Today**, v. 7, n. 1, p.
1272 9-16, 2020. Doi: 10.14719/PST.2020.7.1.619
- 1273 REDDY, M. K.; GUPTA, S. K.; JACOB, M. R.; KHAN, S. I.; FERREIRA, D. Antioxidant,
1274 antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and
1275 phenolic acids from *Punica granatum L.* **Planta medica**, v.73, n.5, p.461-467, 2007.
1276 Doi:doi.org/10.1055/s-2007-967167
- 1277 REZGHI, M.; HAJIMEHDIPOOR, H.; ZAKERIN, S.; FAHIMI, S. Preparation of a
1278 traditional poly herbal gel for abnormal vaginal discharge. **Research Journal of**
1279 **Pharmacognosy**. v.6, n.4, p. 27–35, 2019. DOI: 10.22127/rjp.2019.93506
- 1280 RODRIGUES, L.; OLIVEIRA, B.; CASTILHO, S.; FUTURO, D. Safety and efficiency
1281 of carboxymethylcellulose hydrogel 2% in leg ulcers. **Revista de Pesquisa: Cuidado**
1282 **é Fundamental**. v.5, n.1, p.690-695. Doi:10.9789/2175-5361.2013v5n4p690
- 1283 RODRIGUES, L.M; OLIVEIRA, B. G. R. B; CASTILHO, S. R Segurança e eficácia do
1284 hidrogel de carboximetilcelulose à 2% em úlceras de perna. **Revista de Pesquisa:**
1285 **Cuidado é Fundamental**, v. 5, p. 690-695, 2013.
- 1286 ROSAS-BURGOS, E. C.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; NOGUERA-ARTIAGA, L.;
1287 KAČÁNIOVÁ, M.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, F.; CÁRDENAS-LÓPEZ, J. L.;
1288 CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts
1289 as affected by cultivar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, n.3,
1290 p.802-810, 2017. Doi: 10.1002/jsfa.7799
- 1291 ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Handbook of pharmaceutical excipients**.
1292 5^aEd. London: Butler & Tanner. 2006.766p.
- 1293 RUSSO, M.; CACCIOLA, F.; ARENA, K.; MANGRAVITI, D.; GARA, L.; DUGO, P.;
1294 MONDELLO, L. Characterization of the polyphenolic fraction of pomegranate
1295 samples by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass
1296 spectrometry detection. **Natural Product Research**, v.34, n.1, p.39-45, 2020. Doi:
1297 10.1080/14786419.2018.1561690
- 1298 SAGHAZADEH, S.; RINOLDI, C.; SCHOT, M.; KASHAF, S. S.; SHARIFI, F.;
1299 JALILIAN, E.; NUUTILA, K.; GIATSIDIS, G.; MOSTAFALU, P.; DERAKHSHANDEH,
1300 H.; YUE, K.; SWIESZKOWSKI, W.; MEMIC, A.; TAMAYOL, A.; KHADEMHOSEINI,
1301 A. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. **Advanced**
1302 **Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 138–166, 2018. Doi: 10.1016/j.addr.2018.04.008
- 1303 SAMSURI, S.; LI, T.; RUSLAN, M.; AMRAN, N. Antioxidant recovery from
1304 pomegranate peel waste by integrating maceration and freeze concentration
1305 technology. **International Journal of Food Engineering**, v.16, n.10, 2020. Doi:
1306 10.1515/ijfe-2019-0232

- 1307 SANTOS, E. P.; RODRIGUES, F.S.; SANTOS, I.C.R.S.; SILVA, K.C.S.; COUTINHO,
1308 G.S.L.; FIRMO, W.D.C.A.; PINHEIRO, A.J.M.C.R. *Punica Granatum L.* (Romã) e
1309 atividade antimicrobiana contra o biofilme dental: uma revisão bibliográfica. **Ensaios**
1310 **e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.23, n.2, p.88, 2019. Doi:
1311 10.17921/1415-6938.2019v23n2p88-93
- 1312 SHABTAY, A.; EITAM, H.; TADMOR, Y.; ORLOV, A.; MEIR, A.; WEINBERG, P.;
1313 KEREM, Z. Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate
1314 industrial byproduct as a novel beef cattle feed. **Journal of Agricultural and Food**
1315 **Chemistry**. v.56, n.21, p.10063–10070. Doi:10.1021/jf8016095
- 1316 SHAH, D.K; SAGIRI, S.S; BEHERA,B; PAL, K; PRAMANIK, K. Development of olive
1317 oil based organogels using sorbitan monopalmitate and sorbitan monostearate: a
1318 comparative study. **Journal Applied Polymer Science**. v.129, n.1, p.793–805. Doi:
1319 10.1002/APP.38834. 2013.
- 1320 SHEDOEVA, A.; LEAVESLEY, D.; UPTON, Z.; FAN, C. Wound healing and the use
1321 of medicinal plants. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.
1322 2019, n.1, 2019. Doi: 10.1155/2019/2684108
- 1323 SHIBAN, M. S.; AL-OTAIBI, M. M.; AL-ZOREKY, N. S. Antioxidant activity of
1324 pomegranate (*Punuca granatum L.*) fruit peels. **Food and Nutrition Sciences**, v.3,
1325 n.7, p.991-996, 2012. DOI: 10.4236 / fns.2012.37131
- 1326 SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total
1327 phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu
1328 reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, n.1, p.152–178, 1999. Doi:
1329 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- 1330 STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids
1331 and flavonoids. **Archives of Veterinary Science**. v.30, n.18, p.3268-3295, 2007.
- 1332 SWARTZ, M. E. UPLC™: an introduction and review. **Journal of Liquid**
1333 **Chromatography & Related Technologies**, v.28, n.7, p.1253-1263, 2005.
1334 Doi:10.1081/JLC-200053046
- 1335 TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term
1336 physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108,
1337 n.1, p.227-258, 2004. Doi: 10.1016/j.cis.2003.10.025
- 1338 TAI, A., BIANCHINI, R. AND JACHOWICZ, J. Texture analysis of
1339 cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. **International Journal of**
1340 **Cosmetic Science**. v.36, n.4, p.291-304, 2014. Doi: 10.1111/ics.12125
- 1341 TOZETTO, J.T.; HOSHINO, T.B.; ANDRIGHETTIA, R.C.; RIBEIRO, B.L.;
1342 CAVALHEIRO, L.; FERRARINI, R.S. Extract of *Punica granatum L.*: An alternative
1343 to BHT as an antioxidant in semisolid emulsified systems. **Química Nova**, v.40, n.1,
1344 p.97-104, 2017. Doi:10.21577/0100-4042.20160160.
- 1345 **UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENCIONAL**. 42ªEd. Rockville: United
1346 States Pharmacopeial Convention; 2019. p. 5000
- 1347 VARGES, P.R.; VARGES, P.R.; COSTA, C.M.;FONSECA, B.S.; NACCACHE, M.F.;;
1348 SOUZA MENDES, P.R. Rheological characterization of carbômero dispersions in
1349 water and in water/glycerol solutions. **Fluids**, v. 4, n.3, p.1-20, 2019.
1350 Doi:10.3390/fluids4010003
- 1351 VIEIRA, N.R.; VIANNA, W.O.; ALMEIDA, J. F. M. Controle de qualidade
1352 microbiológica de produtos não estéreis. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n.
1353 1, p. 2889–2901, 2020. Doi: 10.34117/bjdv6n1-208
- 1354 ZAHIN, M.; AQIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant
1355 active fraction of *Punica granatum L.* peel extracts. **Mutation Research**. v.703, n. 2,
1356 p. 99–107, dez. 2010. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.001

- 1357 ZEKAVAT, O.; AMANAT, A.; KARAMI, M.; PAYDAR, S.; GRAMIZADEH, B.;
- 1358 ZAREIAN-JAHROMI, M. Wound healing studies using *Punica granatum* Peel.
- 1359 **Advances in Skin & Wound Care**, v. 29, n. 5, p. 217-225,2016. Doi:
- 1360 10.1097/01.ASW.0000481116.16998.55
- 1361
- 1362
- 1363
- 1364
- 1365
- 1366
- 1367
- 1368
- 1369
- 1370
- 1371
- 1372
- 1373