



**GUSTAVO HENRIQUE ANDRADE MACHADO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO E POTENCIAL  
CICATRIZANTE IN VIVO DE EXTRATOS DE CASCA DE  
JABUTICABA**

**LAVRAS-MG**

**2017**

**GUSTAVO HENRIQUE ANDRADE MACHADO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO E POTENCIAL  
CICATRIZANTE IN VIVO DE EXTRATOS DE CASCA  
DE JABUTICABA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, área de concentração  
em Química/Bioquímica para a  
obtenção do título de Mestre.

Dra. Angelita Duarte Corrêa  
Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Machado, Gustavo Henrique Andrade.

Atividade antibacteriana in vitro e potencial cicatrizante in vivo  
de extratos de casca de jaboticaba / Gustavo Henrique Andrade  
Machado. - 2017.

82 p. : il.

Orientador(a): Angelita Duarte Corrêa.

Coorientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Plinia jaboticaba. 2. Compostos Fenólicos. 3. HPLC. 4.  
Antimicrobiano. 5. Cicatrização. I. Corrêa, Angelita Duarte. II.  
Piccoli, Roberta Hilsdorf. III. Título.

**GUSTAVO HENRIQUE ANDRADE MACHADO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO E POTENCIAL  
CICATRIZANTE IN VIVO DE EXTRATOS DE CASCA  
DE JABUTICABA**

**IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND IN VIVO HEALING POTENTIAL  
OF EXTRACTS OF JABUTICABA PEEL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, área de concentração  
em Química/Bioquímica para a  
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 13 de março de 2017.

Dra. Sandra M. O. Morais Veiga      UNIFAL-MG

Dr. Chrystian Araújo Pereira      UFLA-MG

Dr. Disney Ribeiro Dias      UFLA-MG

Dra. Angelita Duarte Corrêa  
Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2017**

A pessoa mais importante da minha vida,  
minha mãe Zélia, que com seus ensinamentos e orientação,  
me despertou o interesse em buscar coisas melhores, com  
disciplina e força de vontade, mesmo não estando presente  
em vida!

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e paciência para seguir; por guiar meus passos e ser minha fortaleza. À minha família, em especial ao meu pai, Paulo e irmãos, João Paulo e Hugo, pelo amor, confiança e por acreditarem sempre no meu potencial.

À Laize, pelo apoio, incentivo, ajuda real nas horas mais difíceis, ajuda essa que veio em forma de paciência nos meus momentos de desespero, pelas vezes que pensei em desistir e ela me ajudou a suportar com garra e força e pela ajuda na redação e desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Angelita, agradeço pelos ensinamentos, dedicação e confiança, pela disponibilidade e atenção em me orientar nesta caminhada rumo a um sonho.

À minha coorientadora, Roberta, por me receber e permitir todo desenvolvimento do experimento, pelo fornecimento de todo material e a todos do laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos, a quem agradeço em especial à Michele pela amizade e apoio.

A todos do Biotério Central da Ufla pelo auxílio e disposição, a quem cito Professor Raimundo, Professor Fladimir, Fidélis e Willian, e a todos que me ajudaram no decorrer do experimento com os animais, principalmente a Andressa e Matheus pela ajuda com a cirurgia. Aos alunos de iniciação científica que foram de suma importância para que o trabalho fosse concluído em tempo hábil, André e Thais, pela constante ajuda e disponibilidade, estando presentes até aos finais de semana.

Às amigas Tamara e Pricila, pela constante dedicação e paciência, por pegarem no meu pé pelas vezes que não fiz algo conforme deveria ter feito, pela ajuda com técnicas e metodologias que eu desconhecia; a Ana Paula pela ajuda com a estatística, e a todos do laboratório de Bioquímica, vocês foram essenciais e muito importantes para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química pela oportunidade.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para esta realização.

**Muito obrigado!**

## RESUMO

Um dos maiores problemas de Saúde Pública enfrentados é o agravamento da resistência a antimicrobianos. A casca de jaboticaba é rica em compostos fenólicos (CF), que são substâncias que apresentam atividade antimicrobiana (AA). Neste estudo, avaliou-se a AA de extratos fenólicos, obtidos de diferentes formas, de farinha de casca de jaboticaba (FCJ). Quantificaram-se os CF por cromatografia líquida de alta eficiência nos extratos e estudou-se a ação do extrato na cicatrização de feridas em ratos. Os CF foram extraídos da FCJ utilizando-se quatro formas diferentes de extrações, resultando em quatro extratos: aquoso, metanólico, etanólico e acetônico. Para a avaliação bactericida *in vitro* foram utilizados quatro patógenos bacterianos (*Staphylococcus aureus* GL 5674, *Staphylococcus aureus* GL 8702, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117), empregando o método de concentração mínima bactericida (CMB) pela microdiluição em caldo e análise do crescimento de colônias, com as seguintes concentrações dos diferentes extratos (%): 5,00; 2,50; 1,25; 0,63, 0,32, 0,16, 0,08, determinando-se a CMB. Para o teste *in vivo* foram utilizados 24 ratos da linhagem *Wistar*, machos, com 60 dias de idade, pesando aproximadamente 140 g. As feridas foram feitas na região dorsocervical de cada animal. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com 6 ratos cada: o grupo I - controle positivo, tratado com Bactrovet®, contendo 0,580 mg de sulfadiazina de prata mL<sup>-1</sup>; grupo II - tratado com solução aquosa do extrato etanólico liofilizado da FCJ (EE) a 10%, contendo 0,300 mg de CF mL<sup>-1</sup>; grupo III - tratado com solução aquosa do EE a 5%, contendo 0,150 mg de CF mL<sup>-1</sup> e o grupo IV - tratado com solução aquosa do EE a 2,5%, contendo 0,075 mg de CF mL<sup>-1</sup>. Nas feridas foram instiladas diariamente no mesmo horário, 50 µL de Bactrovet® e 50 µL das soluções do EE de cada concentração. Em relação à AA, o extrato aquoso não inibiu o crescimento de nenhuma bactéria. Já os extratos etanólico, acetônico e metanólico inibiram o crescimento de todas as bactérias testadas nas concentrações de 1,25%, 2,50% e 5,00%, respectivamente. O extrato etanólico foi o que apresentou maior atividade bactericida, tanto para bactérias Gram positivas como para Gram negativas. Este potencial pode ser atribuído às substâncias presentes no extrato, como os CF, sobretudo, os taninos catequina, epicatequina e galato de epicatequina, que foram majoritários no extrato etanólico, podendo justificar sua maior ação bactericida. Observou-se que ocorreu diminuição da área das feridas, ao longo do tempo, para os quatro grupos, entretanto, a cicatrização ocorreu de forma mais lenta para o grupo controle e entre os grupos tratados com EE a cicatrização foi mais rápida na seguinte ordem: grupo tratado com EE 2,5% > 5% > 10%. Quanto à análise do processo de cicatrização do ponto de vista clínico e macroscópico, conclui-se que o uso do EE, principalmente, nas concentrações de 5% e 2,5% apresentaram influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, por promover reação inflamatória menos intensa e fechamento mais rápido das feridas, podendo ser explorado pela indústria farmacêutica.

**Palavras-chave:** *Plinia jaboticaba*. Compostos fenólicos. HPLC. Antimicrobiano. Cicatrização.

## ABSTRACT

One of the main problems faced in Public Health is the antimicrobial resistance aggravation. The jaboticaba skin is known by containing phenolic compounds (PC), which are substances that display antimicrobial activity (AA). In this study it was evaluated the AA from phenolic compounds, obtained different methods from the jaboticaba skin meal (JSM). The phenolic compounds were quantified by high performance liquid chromatography, and it was studied their action on upon mice wound healing process. The PC were extracted from JSM using four different extraction methods, resulting in four extracts: aqueous, methanolic, ethanolic and acetic. For antimicrobial activity in vitro, it was chosen four pathogenic bacterial strains (*Staphylococcus aureus* GL 5674, *Staphylococcus aureus* GL 8702, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19117), employing the minimum bactericidal concentration (MBC) by broth microdilution. Further, it was analyzed the growth of bacterial colonies in different extract concentration (%): 5.00; 2.50; 1.25; 0.63, 0.32, 0.16, 0.08, determining its MBC. For the in vivo test, it was used 24 male *Wistar* rats, with 60 days of age, weighing an average of 140 g. Wounds were made on the dorsocervical area of each animal. After this procedure, the rats were randomly arranged into four groups, with six rats each: group I - positive control group, treated with Bactrovet®, containing 0.580 mg of silver sulfadiazine mL<sup>-1</sup>; group II - treated with aqueous solution of the lyophilized JSM ethanolic extract at 10% containing 0.300 mg of PC mL<sup>-1</sup>; group III - treated with aqueous solution of EE at 5% containing 0.150 mg of PC mL<sup>-1</sup> and the group IV - treated with aqueous solution of EE at 2.5% containing 0.075 mg of PC mL<sup>-1</sup>. The wound site were daily instilled at the same hour with 50 µL of Bactrovet® or 50 µL of EE in different concentrations. Regarding the AA, the aqueous extract were not able to inhibit none of the bacterial strains. However, the ethanolic, acetic and methanolic extracts inhibited the bacterial growth of all tested strains at the concentration of 1.25%, 2.50% and 5.00%, respectively. The ethanolic extract had the best antimicrobial activity against Gram-positive and negative strains. This potential was attributed to the phytochemicals present in the extract, such as PC, in special catechin, epicatechin and epicatechin gallate, which were the main phenolic compounds found in ethanolic extract, justifying its antimicrobial action. It was observed a progressive reduction on the wound size, the data obtained showed that the group control had a slower recovery in comparison the group treated with the extracts. The extract effectiveness were in the following order, 2.5% > 5% > 10%. Regarding the morphological and microscopic aspect of the wound, it was concluded that the use of the EE, especially at 5% and 2.5%, had a positive relation with rats cutaneous wound healing, by promoting a less intense inflammatory reaction and a quicker wound closure, a potential that could be explored by pharmaceutical industries.

**Keywords:** *Plinia jaboticaba*. Phenolic compounds. HPLC. Antimicrobial. Healing.



## LISTA DE FIGURA

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 –  | Estrutura do cátion flavilium.....   | 17 |
| Figura 2 –  | Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para a ação de compostos naturais na célula bacteriana.....   | 19 |
| Figura 3 –  | Material e procedimento cirúrgico.....   | 42 |
| Figura 4 –  | Atividade bactericida dos diferentes extratos de farinha de casca de jabuticaba em quatro concentrações.....   | 47 |
| Figura 5 –  | Cromatograma de compostos fenólicos do extrato aquoso de farinha de casca de jabuticaba.....   | 51 |
| Figura 6 –  | Cromatograma de antocianinas do extrato aquoso de farinha de casca de jabuticaba.....  | 52 |
| Figura 7 –  | Cromatograma de compostos fenólicos do extrato metanólico de farinha de casca de jabuticaba.....   | 52 |
| Figura 8 –  | Cromatograma de antocianinas do extrato metanólico de farinha de casca de jabuticaba.....  | 53 |
| Figura 9 –  | Cromatograma de compostos fenólicos do extrato etanólico de farinha de casca de jabuticaba.....  | 53 |
| Figura 10 – | Cromatograma de antocianinas do extrato etanólico de farinha de casca de jabuticaba.....   | 54 |
| Figura 11 – | Cromatograma de compostos fenólicos do extrato acetônico de farinha de casca de jabuticaba.....  | 54 |
| Figura 12 – | Cromatograma de antocianinas do extrato acetônico de farinha de casca de jabuticaba.....   | 55 |
| Figura 13 – | Fotos das feridas nos dias 3, 7, 14 e 21 pós-operatório para o controle positivo e extratos etanólicos a 10%, 5% e 2,5%.....                                       | 59 |
| Figura 14 – | Área das feridas nos dias das medições para cada grupo de animais.....   | 61 |
| Figura 15 – | Exemplo do aspecto histológico das feridas no dia 21 pós-operatório dos grupos controle, extrato etanólico 10%, extrato etanólico 5% e extrato etanólico 2,5%..... | 65 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Principais classes de compostos com atividade antimicrobiana obtidas de plantas.....   | 20 |
| Tabela 2 – Rendimento em peso seco e pH dos extratos da FCJ.....  | 45 |
| Tabela 3 – Rendimento em peso seco dos extratos da FCJ.....   | 45 |
| Tabela 4 – Concentração mínima bactericida dos diferentes extratos de farinha de casca de jabuticaba para as várias bactérias.....                                | 48 |
| Tabela 5 – Teores de compostos fenólicos, em mg 100 g <sup>-1</sup> de extrato liofilizado, em diferentes extratos obtidos de farinha de casca de jabuticaba..... | 55 |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 12 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO .....   | 14 |
| 2.1 Resistência dos microrganismos .....  | 14 |
| 2.2 Compostos fenólicos e atividade bactericida .....                               | 17 |
| 2.3 Jabuticaba .....  | 22 |
| 2.4 Bactérias patogênicas .....   | 27 |
| 2.5 Feridas e cicatrização .....  | 33 |
| 2.5.1 Fatores que retardam a cicatrização .....                                     | 35 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 37 |
| 3.1 Colheita das jabuticabas e preparo da casca .....                               | 37 |
| 3.2 Obtenção dos extratos .....   | 37 |
| 3.3 Avaliação da atividade bactericida .....  | 39 |
| 3.3.1 Efeito inibitório dos extratos de FCJ sobre bactérias .....                   | 39 |
| 3.3.2 Determinação da CMB pela técnica de microgota .....                           | 40 |
| 3.4 Análise cromatográfica dos compostos fenólicos .....                            | 40 |
| 3.5 Ensaio com animais e procedimento cirúrgico .....                               | 42 |
| 3.6 Análise macroscópica e morfométrica das feridas .....                           | 43 |
| 3.7 Avaliação histológica das feridas .....   | 44 |
| 3.8 Planejamento experimental e análise estatística .....                           | 44 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 46 |
| 4.1 Rendimento de extração .....  | 46 |
| 4.2 Atividade bactericida .....   | 47 |
| 4.3 Determinação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos por HPLC ..... | 52 |
| 4.4 Ensaio com animais .....  | 58 |
| 5 CONCLUSÃO .....   | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 68 |
| APÊNDICE .....  | 79 |

## 1 INTRODUÇÃO

Na Saúde Pública, um dos maiores problemas é o agravamento da resistência a antimicrobianos existentes no mercado, principalmente em populações bacterianas de origem hospitalar. Registros mostram um aumento significativo na frequência do isolamento de bactérias, que a priori eram reconhecidamente sensíveis aos medicamentos rotineiramente usados na clínica, mas que se apresentam resistentes a quase todos os fármacos disponíveis no mercado, as denominadas bactérias multi-droga-resistentes.

O conhecimento sobre o potencial terapêutico dos vegetais tem despertado o interesse científico, buscando nesse conhecimento, novos caminhos para o controle e tratamento de diversas doenças. No Brasil, pesquisas desta natureza são de grande valia e importância, uma vez que o país é considerado um dos maiores reservatórios de biodiversidade do mundo e além disso, a grande extensão territorial abriga diversos tipos de ecossistemas, cada um com suas particularidades, fato que o torna verdadeira fonte quase que inesgotável de moléculas a serem descobertas, com potencial para serem utilizadas tanto isoladamente, como em sinergismo com outras moléculas.

Diversos fármacos obtidos de plantas são usados como anti-inflamatórios e cicatrizantes. Porém, apesar do uso cada vez mais frequente, o mesmo é baseado apenas em conhecimentos populares, faltando o suporte de evidências experimentais que comprovem o potencial terapêutico, mecanismo de ação, toxicidade e os possíveis efeitos colaterais.

Durante séculos tem-se buscado nas plantas medicinais alternativas para o tratamento de diversas doenças dermatológicas, principalmente naquelas que apresentam processos cicatriciais de difícil resolução, o que pode ser agravado, em grande parte, pela colonização de bactérias presentes neste ambiente.

Entre as substâncias naturais, os compostos fenólicos, como o eugenol, têm mostrado potencial com significativa capacidade antimicrobiana, podendo ser usados como extratos de diversas plantas para a assepsia de feridas. A casca da jaboticaba, geralmente descartada, apresenta teores elevados de compostos fenólicos, valores estes que já foram mencionados em alguns grupos de pesquisa. Assim, a utilização de extratos fenólicos deste resíduo poderia ser uma possibilidade viável com aplicação em soluções, cremes ou géis, para se utilizar em feridas de pele e mucosa, onde pode haver uma variedade de microrganismos resistentes. Além disso, a utilização deste resíduo contribuirá para melhor aproveitamento do fruto, promovendo a sua valorização econômica.

Estudos de extração de compostos fenólicos já foram realizados e se encontram várias formas de extraí-los de acordo com o tipo principal de fenólico que se busca, alguns deles denominados de extrato metanólico, etanólico, acetônico e aquoso. Portanto, a extração de compostos fenólicos de casca da jabuticaba, utilizando diferentes solventes extratores, levará a obtenção de tipos e quantidades diferentes de fenólicos, podendo apresentar respostas variadas de sua ação.

Assim, como já mencionado, extratos que apresentem ação antimicrobiana poderão também mostrar ação antisséptica no tratamento de feridas. Como a ferida é uma lesão física corporal caracterizada pela ruptura da continuidade normal das estruturas do corpo, a sua cicatrização consiste na reconstrução do local, a fim de restaurar a sua integridade e a função normal. É um processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido lesado. Formas de tratamento como aplicação local de diferentes produtos químicos têm sido pesquisadas, a fim de verificar sua contribuição para a melhora na cicatrização.

Portanto, neste estudo objetivou-se avaliar a atividade bactericida de extratos fenólicos, obtidos de formas diferentes, de farinha de casca de jabuticaba (FCJ), quantificar e identificar por cromatografia líquida de alta eficiência os compostos fenólicos presentes nos diferentes extratos e analisar a ação do extrato etanólico liofilizado (que obteve a melhor atividade bactericida), na cicatrização de feridas em ratos *Wistar*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Resistência dos microrganismos

Estudar o potencial terapêutico dos vegetais tem despertado o interesse científico, devido a possibilidade de se empregar novos medicamentos de controle e tratamento de diversas doenças. No Brasil, há uma grande diversidade de plantas, que está relacionada às boas condições climáticas, edáficas (fatores inerentes ao solo) e potencial hídrico. Estes fatores contribuem para a síntese de inúmeros metabólitos secundários com potencial atividade biológica (ZUANAZZI et al., 2010).

De acordo com Organização Mundial da Saúde, as plantas medicinais são a melhor fonte para se obter uma variedade de medicamentos, e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. A seleção de plantas, a partir de informações da medicina tradicional ou popular, pode conduzir a descoberta de moléculas promissoras, como é o caso dos metabólitos secundários (SANTOS et al., 2007).

Essas moléculas aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas (FUMAGALI et al., 2008).

Apesar de muitas indústrias farmacêuticas terem produzido novos antibióticos e modificado alguns medicamentos já existentes, a resistência a essas moléculas pelos microrganismos vem aumentando. Tal fato tem causado preocupação, pois cresce o número de pacientes em hospitais que tem a imunidade suprimida com concomitante surgimento de linhagens de bactérias e fungos que apresentam novos perfis de resistência a antibióticos e antifúngicos. Conseqüentemente, novas infecções poderão ocorrer em hospitais e/ou residências resultando em elevada morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2007).

Um estudo multicêntrico norte-americano mostrou que ocorrem aproximadamente 1,7 milhões de casos anuais de infecções relacionadas à assistência à saúde, os quais estão associados a 99.000 óbitos por ano no país. Outro estudo europeu concluiu que estas infecções afetam um em cada 10 pacientes internados e causam aproximadamente 5.000 mortes anuais no continente. No Brasil, os dados ainda são pouco documentados, devido à consolidação reduzida das informações por diversos hospitais, dificultando o conhecimento da

extensão do problema no país. O Ministério da Saúde avaliou a magnitude das infecções hospitalares em 99 hospitais terciários localizados nas capitais brasileiras e vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS), identificando uma taxa de 13% de infecções entre pacientes hospitalizados (SOUZA et al., 2015).

A resistência bacteriana é um fato natural, pois existem bactérias naturalmente resistentes a certas classes de antimicrobianos; um exemplo clássico, os *Enterococcus* são naturalmente resistentes a qualquer cefalosporina. E isso é inevitável, pois ao se utilizar antimicrobianos, principalmente de forma descontrolada, aparecerão bactérias que se tornarão resistentes a eles, porém, a utilização correta dos antimicrobianos, pode causar um menor índice de resistência bacteriana (TORTORA et al., 2012).

Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos que são: a alteração da permeabilidade, a alteração do local de ação, a bomba de efluxo e o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico.

a) Alteração da permeabilidade

A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida ou bacteriostático. (BRUNTON, et al., 2012). Nas bactérias Gram negativas, a membrana interna é constituída por fosfolipídeos e a membrana externa por lipídeos. A sua constituição confere uma lenta penetração do fármaco e a passagem pela membrana externa é realizada através das porinas, que formam canais hidrofílicos. A penetração na bactéria depende das características intrínsecas das moléculas de antibiótico. Desta forma os compostos hidrofílicos penetram através das porinas (DECLOUR, 2009). Neste tipo de resistência, a modificação da permeabilidade do antibiótico pode ser explicada devido às alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas, sendo que qualquer diminuição na função ou quantidade de porinas levará à resistência da bactéria ao antibiótico, baixando o nível do mesmo presente no interior da bactéria (DECLOUR, 2009).

b) Alteração do local de ação

Este tipo de resistência caracteriza-se pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação, isto pode ocorrer por alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA (RICE,

BONOMO, 2005). A alteração da estrutura do peptidoglicano consiste na inibição das enzimas que participam na construção do mesmo (DZIDIC, SUSKOVIC, KOS, 2008).

c) Bomba de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, ou seja, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular, antes mesmo que eles desempenhem seus mecanismos de ação, como exemplo para este tipo de resistência, cita-se *P. aeruginosa* (DZIDIC, SUSKOVIC E KOS, 2008).

d) Mecanismo enzimático

O mecanismo enzimático de resistência ocorre devido a inativação do fármaco, que é resultante da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Existem três grandes estratégias: hidrólise (desenvolvida pelas hidrolases); transferência de um grupo (desenvolvida pelas transferases) ou processo redox (desenvolvida também através de mecanismos enzimáticos, onde pode ocorrer a inativação do antibiótico por um processo redox, em que ocorre oxidação ou redução induzida pela bactéria patogênica (DZIDIC, SUSKOVIC, E KOS, 2008).

A corrida na busca por novos agentes antimicrobianos, para aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos, faz-se cada vez mais necessária, devido ao surgimento de microrganismos resistentes aos antibióticos em uso clínico e aos microrganismos oportunistas que levam a infecções fatais. Desta forma, compostos provenientes de extratos de plantas podem contribuir para o desenvolvimento de antibióticos mais eficazes e menos tóxicos, na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (SILVA et al., 2011).

Tendo por base a grande diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas brasileiros, a importância reconhecida de algumas no tratamento de doenças, e tendo relatos do agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, fica notória a necessidade da busca de novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas frente a esses microrganismos (SANTOS et al., 2010).

Sendo assim, a crescente investigação do potencial terapêutico de plantas medicinais, nos quais alguns de seus compostos, como flavonoides, alcaloides, triterpenos,



sesquiterpenos, taninos e saponinas, apresentam propriedade antimicrobiana, têm sido objetos de interesse para o tratamento de vários tipos de infecções humanas (SANTOS et al., 2010).

Estudos mostram que as pesquisas na área de produtos naturais vêm crescendo de forma significativa e, cada vez mais, há descobertas de substâncias bioativas em diversas plantas, as quais por meio de muitos estudos se tornam medicamentos ao longo dos anos, tanto amenizando como prevenindo doenças (CRAGG et al., 2013; NEWMAN et al., 2012).

## **2.2 Compostos fenólicos e atividade bactericida**

Os compostos fenólicos são uma classe de fitoquímicos extremamente ampla e complexa, que possuem pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila. São produtos do metabolismo secundário de plantas e participam do mecanismo de defesa da planta, protegendo-a contra ataques de bactérias, fungos e outros, além de ser responsáveis por propriedades como a cor, sabor e odor de diversos vegetais (SIMÕES et al., 2010).

Os compostos fenólicos são substâncias que não podem ser sintetizadas por animais e humanos, sendo consumidos na dieta. As substâncias com núcleo fenólico apresentam ação especial como antioxidantes por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas do oxigênio, além de reduzirem e quelarem íons férricos que catalisam a peroxidação lipídica, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo. Os produtos intermediários, formados por meio da ação dos antioxidantes, podem ser considerados estáveis devido à ressonância do anel aromático destas substâncias (ANDRADE et al., 2007).

São descritos como fenóis, ácidos fenólicos e derivados, ligninas, taninos e flavonoides e estão presentes nos alimentos de origem vegetal, como folhas, cereais, leguminosas, cacau, cidra e frutas em geral e bebidas como chás, café e vinho tinto (SIMÕES et al., 2010).

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água e classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: condensados e hidrolisáveis. Os primeiros formados pela polimerização de unidades de flavonoides e os taninos hidrolisáveis formados por polímeros heterogêneos que contêm ácidos fenólicos, como ácido gálico. Estes compostos possuem a propriedade de precipitar proteínas e conferem adstringência aos frutos de determinadas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

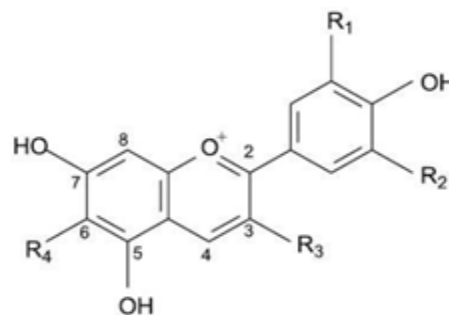
Os taninos condensados estão presentes em diversos produtos de origem vegetal, o que confere às frutas, hortaliças e condimentos boa propriedade terapêutica. Em certos vegetais,

os taninos têm uma ação negativa no valor nutritivo, devido à redução da digestibilidade de proteínas, inibição da ação de enzimas digestivas e a interferência na absorção do ferro. Por outro lado, uma série de efeitos benéficos à saúde estão relacionados ao consumo de taninos, tais como: forte ação antioxidante, ação preventiva contra o câncer, atividade antimicrobiana e ação cardioprotetora (GU et al., 2008).

Os flavonoides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e em grande número ocorrem conjugados com açúcares. Estes compostos atuam na proteção das plantas contra danos produzidos por agentes oxidantes como os raios ultravioletas, poluição ambiental, entre outros fatores (VOLP et al., 2008). Esta proteção está associada à ação antioxidante destes compostos, que por sua vez, depende da estrutura química do flavonoide, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (MAMEDE et al., 2004).

As antocianinas (Figura 1) são flavonoides pigmentados glicosilados que atraem animais com a finalidade de polinização. A propriedade que mais tem se ressaltado nas antocianinas é a sua ação antioxidante (REYNERTSON et al., 2008). A deficiência natural de elétrons das antocianinas faz esses compostos serem particularmente reativos, apresentando também uma grande sensibilidade à mudanças de pH e temperatura (VOLP et al., 2008).

Figura 1 – Estrutura do cátion flavilium.



R1 e R2: H, OH ou OCH<sub>3</sub>; R3: H ou glicosídeo; R4: OH ou glicosídeo.

Fonte: GUIMARÃES et al. (2012).

Para avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana de um vegetal se faz necessário obter o máximo de extração dos compostos bioativos, os quais apresentam polaridade diferenciada. Desta forma, a solubilidade em um determinado solvente é característica peculiar do fitoquímico, o que explica a inexistência de um procedimento de extração universal (MELO et al., 2008). Os solventes mais utilizados para a extração destes

compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK et al., 2004). Os solventes polares extraem melhor os compostos fenólicos, como exemplo, o metanol confere elevada eficiência na extração de compostos fenólicos (TERCI, 2004). A água é comumente utilizada, pois apresenta maior abundância e facilidade de obtenção e manipulação, além de proporcionar uma extração eficiente devido a sua polaridade, apesar de que a utilização da água pode acarretar extração de outros componentes indesejáveis, diferentes dos compostos fenólicos (ANDREO et al., 2006).

Para a determinação de compostos fenólicos individualmente, em diferentes matrizes, são empregadas técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) e eletroforese capilar (EC). A cromatografia acoplada a diferentes sistemas de detecção como a espectrofotometria, a fluorimetria e a espectrometria de massas, as quais fornecem vantagens na confirmação de identidade dos compostos, tem se tornado imprescindível na elucidação dos mecanismos de interação entre os compostos fenólicos e desses com outras moléculas, como ácidos orgânicos, álcoois e aldeídos (FACCO, 2006).

Grande ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante e antimicrobiana, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de combate as espécies reativas e as enfermidades causadas por estes, evidenciando a necessidade de pesquisas para descoberta de novas fontes desses compostos.

Estudos sobre a capacidade antimicrobiana dos extratos fenólicos visam o combate ao crescimento de microrganismos de interesse alimentar e de saúde pública, empregando tanto compostos fenólicos purificados, quanto os naturalmente presentes em alimentos, vegetais e ervas (VAQUERO et al., 2007).

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos envolve reações com a membrana celular, modificando seu metabolismo, podendo levar a inativação de enzimas essenciais à célula e/ou complexando-se com os substratos dessas enzimas ou também complexando com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (LOGUERCIO et al., 2005). A estrutura e composição química dos compostos fenólicos afetam seu modo de ação e atividade bactericida, principalmente no que se refere à posição e ao número de grupamentos hidroxila no anel fenólico.

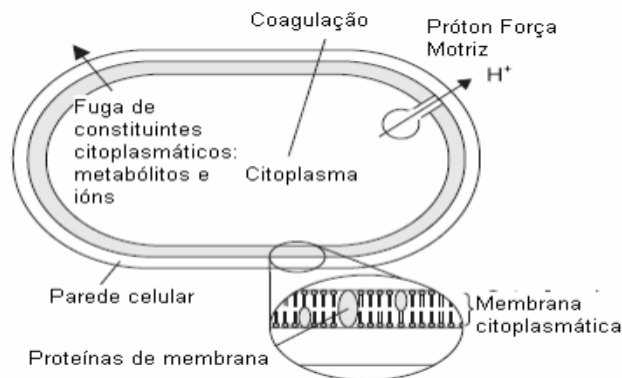
Moreira et al. (2005) reforçam que os compostos fenólicos presentes nos vegetais se ligam à bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e extravasando os constituintes intracelulares ou danificando o sistema enzimático da célula; e segundo Souza et al. (2010), mesmo com pequenas mudanças ocorridas na estrutura da membrana citoplasmática, eles podem afetar o metabolismo, incluindo a síntese de macromoléculas destes microrganismos.

Os mecanismos de ação de compostos naturais são, geralmente, a desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula (Figura 2), dessa forma, nem todos os mecanismos agirão sobre alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

Assim, têm-se enfatizado a busca por compostos naturais viáveis, com efeitos biológicos no sentido de beneficiar a indústria alimentícia e farmacêutica.

Na Tabela 1, estão apresentadas as principais classes de compostos obtidas de plantas com atividade antimicrobiana.

Figura 2 – Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para a ação de compostos naturais na célula bacteriana.



Fonte: SILVA (2010).

Tabela 1 – Principais classes de compostos com atividade antimicrobiana obtidas de plantas.

| Classe                   | Subclasse        | Exemplos                     | Mecanismo  |
|--------------------------|------------------|------------------------------|--|
| Fenólicos                | Fenóis simples   | Catecol                      | Impedir entrada de substrato   |
|                          |                  | Epicatequina                 | Desintegração da membrana  |
|                          | Fenólicos ácidos | Ácido cinâmico               | Ligação à proteínas específicas  |
|                          | Quinonas         | Hipericina                   | Ligação com adesinas, inativa enzimas, complexação com parede celular  |
|                          | Flavonoides      | Crisina                      | Ligação com adesinas   |
|                          | Flavonas         | Abissinona                   | Complexos com parede celular<br>Inativa enzima e inibe HIV transcriptase reversa   |
|                          | Taninos          | Elagitanina                  | Privação de substrato, perturbação de membrana, ligação com adesinas, inativa enzimas, ligação com proteínas, complexos com íons metálicos |
|                          | Cumarinas        | Warfarina                    | Interação com DNA eucarioto (atividade antiviral)  |
| Terpenoides              | -                | Capsaicina                   | Desintegração de membrana  |
| Alcaloides               | -                | Berberina<br>Piperina        | Interage com a parede celular e/ou DNA   |
| Lectinas e polipeptídeos | -                | Aglutinina manose específica | Forma pontes dissulfeto e interfere com a replicação viral   |

Fonte: BURT (2004), com adaptações.

Alguns compostos do extrato de folha de pitanga têm sido mencionados apresentando eficiente ação inibitória para o vírus Epstein-Barr e também para alguns fungos, além de atividade antimicrobiana sobre bactérias (SILVA, 2010).

Auricchio et al. (2007) constataram a presença de flavonoides e taninos em estudo fitoquímico sobre a amostra de *Eugenia uniflora*. Eles avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos de *E. uniflora* para *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes*, e observaram ação antibacteriana variada para as amostras colhidas em diferentes períodos do dia e em épocas diferentes do ano.

Bertucci et al. (2009), em estudos para três espécies do gênero *Eugenia*, observaram ação inibitória sobre linhagens de *Staphilococcus aureus*, *Mycobacterium*, *Candida* e *Aspergillus*.

Volpato (2005), ao avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações hexânica e diclorometano de *Calendula officinalis* do Brasil, utilizando a metodologia da cavidade em placa, observou resultados positivos desta atividade em bactérias Gram

positiva, e de acordo com Parente et al. (2009) o extrato etanólico e as frações diclorometano e hexânica da *Calendula* por diluição em placa, apresentaram atividade antibacteriana semelhantes, reiterando a atividade antibacteriana da *Calendula*.

Em experimentos mais recentes pelo método de microdiluição em caldo, em que se trabalhou com o extrato etanólico do fruto de *Morinda citrifolia* L., foi observada a inibição contra *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas diminuta*, *Enterobacter cloacae*, *S. aureus*, no qual foi demonstrada a atividade contra todas as cepas, nas concentrações entre 100 mg mL<sup>-1</sup> e 50 mg mL<sup>-1</sup> (NATHEER et al., 2012).

Oliveira (2016), testando os mesmos extratos do presente trabalho, porém com concentrações e técnicas diferentes, de FCJ, encontrou resultados significativos com relação a atividade bactericida da mesma.

O efeito da atividade bactericida dos extratos foi analisado através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e halo de inibição de cada extrato. Para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 a CMI para todos os extratos foi de 250 µg mL<sup>-1</sup> com halo de inibição médio de 6,3 mm, representando 30% de inibição em relação ao cloranfenicol. A maior inibição de crescimento foi observada para as bactérias Gram-positivas *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Sendo que o extrato acetônico mostrou inibição de crescimento da bactéria *S. aureus* apenas na concentração de 250 µg mL<sup>-1</sup>. O extrato aquoso e o metanólico apresentaram inibição de crescimento até a concentração de 62,5 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto que o etanólico até a concentração de 31,25 µg mL<sup>-1</sup>. Já para a bactéria *L. monocytogenes*, o extrato acetônico apresentou inibição de crescimento até a concentração de 125 µg mL<sup>-1</sup>, o aquoso e etanólico até a concentração de 62,5 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto que o metanólico até a concentração de 31,25 µg mL<sup>-1</sup>, demonstrando o grande potencial destes extratos como bactericidas, devendo serem explorados tanto pela indústria alimentícia quanto pela indústria farmacêutica (OLIVEIRA, 2016).

### 2.3 Jabuticaba

A fruta jabuticaba, pertencente à família *Myrtaceae*, é nativa do Brasil, sendo encontrada em extensa faixa territorial do país que vai desde o Pará até o Rio Grande do Sul. Com maior ocorrência e produtividade nos estados da região sudeste, é, geralmente, cultivada como planta de fundo de quintal, em pomares domésticos (SASSO, 2009).

De modo geral, as jabuticabeiras são árvores de tamanho médio (de 3 a 15 m de altura) de grande rusticidade e longevidade, apresentando muitos galhos formados no caule, pouco

acima do solo. As folhas são opostas e lanceoladas. As flores brancas e os frutos se formam diretamente no tronco. Estes últimos são classificados como baga, de forma redonda ou arredondada e, quando maduros, sua casca é de cor roxa-escura ou preta. A polpa do fruto é branca, pouco ácida, muito doce e saborosa. O número de sementes pode variar de um a quatro (SASSO, 2009).

São conhecidas nove espécies, sendo que uma está extinta, cinco são encontradas apenas em alguns sítios de pesquisa e somente três apresentam dispersão natural ou em cultivos no Brasil, produzindo frutos apropriados tanto para a indústria quanto para o consumo *in natura*.

Em relação à classificação taxonômica do fruto existem algumas controvérsias. Pio Corrêa (1984), no dicionário das plantas úteis no Brasil, diz que a espécie *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg. recebe os nomes populares jaboticaba comum, jaboticaba verdadeira, jaboticaba sabará ou jaboticaba São Paulo. Sobral (1985) propôs uma alteração na nomenclatura do gênero *Myrciaria* (BERG, 1857) para o gênero *Plinia*, porém, o gênero *Myrciaria* é ainda largamente empregado no meio científico, portanto, eles são considerados sinônimos (DANNER et al., 2006). Mattos (1983) relata as jaboticabeiras como sendo do gênero *Plinia*, e cita como as mais conhecidas *Plinia trunciflora* Berg, conhecida como jaboticaba de cabinho; *Plinia cauliflora* (DC) Berg, conhecida como jaboticaba paulista ou jaboticaba-açu e *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg, conhecida como jaboticaba-sabará, sendo esta a espécie mais conhecida e comercializada no Brasil.

Apesar do crescente aumento de sua comercialização, de ser conhecida há muito tempo e ter frutos de qualidade, a espécie ainda apresenta dificuldades em despertar o interesse do fruticultor, que a considera inadequada ao cultivo, devido à demora no início de sua produção, que varia de oito a quinze anos após o plantio da muda originada de sementes (CITADIN et al., 2010; DANNER et al., 2006). Além disso, é altamente perecível, apresentando um período curto de utilização, devido ao seu alto teor de água e açúcares. Depois de colhida, a fruta tem vida útil de até três dias, o que prejudica bastante a sua comercialização (ASCHERI et al., 2006; SATO et al., 2009).

A fruta é frequentemente usada na produção de doces, geleias, sucos e bebidas alcoólicas (conhecida popularmente como vinho de jaboticaba), com aumento do consumo no Brasil e no exterior (ABE et al., 2012; FORTES et al., 2011). Também é utilizada para vários fins medicinais. Sua casca é adstringente, sendo útil contra diarreia e irritações de pele, possuindo também indicações na medicina popular contra asma e outras doenças. A fruta é

rica em compostos fenólicos, principalmente as antocianinas, que são pigmentos responsáveis por uma variedade de cores atrativas e brilhantes de frutas, flores e folhas que variam do vermelho vivo ao violeta e azul e são apontadas como grandes benfeitoras das artérias. Sua maior concentração está na casca e a sugestão é mantê-la no preparo de derivados (HERBÁRIO, 2015).

Visando agregar valor ao fruto com o aproveitamento da sua casca, que geralmente é descartada, vários pesquisadores realizaram estudos de caracterização dos seus constituintes químicos e aplicações em diversas áreas, que serão descritos a seguir.

Lima et al. (2008) determinaram a composição centesimal do fruto e suas frações de duas variedades de jabuticaba e encontraram, para o genótipo Sabará, os seguintes teores, em matéria seca (MS), para a casca, polpa, semente e fruto inteiro, respectivamente; de proteína bruta, 1,16; 0,47; 1,17 e 0,92; extrato etéreo, 0,57; 0,06; 0,58 e 0,42; cinzas, 4,39; 2,71; 2,68 e 3,82, fibra solúvel, 6,80; 1,93; 1,40 e 2,23; fibra insolúvel, 26,43; 3,30; 26,93 e 16,63 e extrato não nitrogenado, 60,64; 90,32; 67,64 e 75,97. Alezandro et al. (2013) analisando também a composição centesimal para fruto inteiro da jabuticaba Sabará, encontraram teores muito semelhantes, se diferindo nas fibras e cinzas que foram menores que os registrados por Lima et al. (2008).

Em relação aos minerais, os níveis no fruto inteiro liofilizado, citado por Lima et al. (2008) e Alezandro et al. (2013) foram respectivamente, para ferro 5,22 e 2,7 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, potássio 930,00 e 1.000 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, magnésio 116,67 e 100 mg 100 g<sup>-1</sup> MS e manganês 1,04 e 2,7 mg 10 g<sup>-1</sup> MS. Para polpa e semente liofilizadas têm-se os seguintes teores registrados por Lima et al. (2008): ferro 1,68 mg 100 g<sup>-1</sup> MS e não detectado, potássio 1.496,67 e 1.026,67 mg 100 g<sup>-1</sup> MS; magnésio 90,00 e 73,33 mg 100 g<sup>-1</sup> MS e manganês 1,71 e 1,24 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, respectivamente. Esses minerais, tanto o fruto inteiro como nas frações polpa e sementes liofilizadas, podem ser considerados fonte alternativa dos principais minerais.

A composição centesimal da farinha de casca de jabuticaba (FCJ), genótipo Sabará, com várias formas de desidratação da casca, varia entre os seguintes teores de proteína 1,16 a 6,39 g 100 g<sup>-1</sup> MS; cinzas 3,01 a 5,46 g 100 g<sup>-1</sup> MS; extrato etéreo 0,57 a 1,72 g 100 g<sup>-1</sup> MS; fibra solúvel 5,0 a 8,43 g 100 g<sup>-1</sup> MS e fibra insolúvel 20,00 a 27,51 g 100 g<sup>-1</sup> MS (ALVES et al., 2014a; LAGE et al., 2014; LEITE et al., 2011; LENQUISTE et al., 2012, LIMA et al., 2008). Essa variação ocorre provavelmente, devido ao tipo de solo, condições climáticas e também as diferentes épocas de colheita.



Registros mostram que os compostos fenólicos e vitamina C, também são mais elevados nas cascas deste fruto. Lima et al. (2008) encontraram 11,99 g 100 g<sup>-1</sup> MS de compostos fenólicos na FCJ, genótipo Sabará, níveis quase 25 vezes mais elevados que na polpa. Lima et al. (2011) também registraram teores significativos de vitamina C para o fruto inteiro, casca, polpa e semente, respectivamente, 265,68 mg 100 g<sup>-1</sup> MS; 298,23 mg 100 g<sup>-1</sup> MS; 167,54 mg 100 g<sup>-1</sup> MS; 212,40 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, e mais uma vez a fração casca apresentou os níveis mais elevados.

Alves et al. (2014a) desidrataram as cascas de jaboticaba, *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg genótipo Sabará, por quatro formas: liofilização e em três temperaturas: 30 °C, 45 °C e 60°C, no intuito de se obter a farinha desse material por um processo mais barato, uma vez que a liofilização é um processo de secagem relativamente caro. As cascas liofilizadas apresentaram os teores mais elevados para todos os compostos bioativos estudados, seguidas pelas secas a 45 °C, que foi a temperatura indicada como uma alternativa de secagem das cascas de jaboticaba viável economicamente, por ainda manter níveis elevados dos constituintes químicos presentes.

Concomitante a este trabalho, Alves et al. (2014b) testaram a estabilidade da farinha de casca de jaboticaba por um período de 12 meses de armazenamento, com o propósito de estender o uso de sua casca durante todo o ano, uma vez que a produção de jaboticaba é sazonal. O fruto foi colhido e separado da casca. A casca foi seca a temperatura de 45 °C, em seguida, foram moídas, fechadas hermeticamente em frascos, armazenadas e protegidas da luz à temperatura ambiente durante 0, 3, 6, 9 e 12 meses. Em cada tempo de armazenamento foram realizadas análises microbiológicas, de composição centesimal, vitamina C, compostos fenólicos, antocianinas, sólidos solúveis, atividade de água, cor e pH da farinha. Verificaram-se aumento significativo nos seguintes parâmetros durante os 12 meses de armazenamento da farinha: umidade, 34%; atividade de água, 31,23%; coordenadas de cor (a, 12,37% e b, 24%); e pH, 7,35%. Por outro lado, constataram-se decréscimo no seu teor de compostos fenólicos, 9,91%; antocianinas, 29% e vitamina C, 20%. Não se observou diferença significativa nos teores de lipídios, proteínas, cinzas, fibras e sólidos solúveis, assim como não se detectou a presença de microrganismos em qualquer período de armazenamento da farinha. A casca de jaboticaba não mostrou mudanças significativas em parâmetros nutricionais, e mostrou uma pequena redução em sua capacidade antioxidante, quando armazenados durante um período de 12 meses. Portanto, os autores concluíram que é possível armazenar a casca por 12 meses, possibilitando o seu uso durante o ano todo.

Entre os fenólicos da FCJ, genótipo Sabará, foram identificadas as antocianinas cianidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-glicosídeo (Lima et al., 2011). Alves et al. (2014a) realizaram análise de cromatografia líquida de alta eficiência no extrato acetônico de FCJ, mesmo genótipo, e identificaram os seguintes compostos fenólicos, em mg 100 g<sup>-1</sup> de extrato seco: ácido gálico (52,00), galocatequina (27,20), catequina (50,46), epicatequina (145,47), ácido elágico (35,44), e ácido salicílico (133,44), sendo a galocatequina, catequina e epicatequina monômeros de taninos.

Lage et al. (2014) realizaram a cromatografia líquida de alta eficiência do extrato metanólico da FCJ, genótipo Sabará e identificaram ácidos fenólicos e flavonoides, apresentando a seguinte ordem quantitativa decrescente: epicatequina, ácido salicílico, ácido elágico, ácido gálico, galocatequina. Os mesmos autores identificaram também as antocianinas cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo.

Os elevados teores de compostos fenólicos na casca de jabuticaba são responsáveis pelo potencial antioxidante da jabuticaba e suas frações (ALVES et al., 2014a), contribuindo para um melhor aproveitamento do fruto, seja na indústria alimentícia, cosmética, ou farmacêutica promovendo a sua valorização econômica.

Lage et al. (2014) estudaram o efeito da FCJ sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepático de ratas, alimentando os animais com rações contendo 0,5%; 1,5% e 3,0% desta farinha. A dieta com 3,0% de FCJ aumentou em 20,23% o teor de HDL e diminuiu significativamente a esteatose macrovesicular no fígado desses animais. As dietas contendo 1,5% e 3,0% de FCJ reduziram em cerca de 50% a peroxidação lipídica no fígado. A FCJ foi eficiente na proteção contra dislipidemias por aumentar o nível sérico de HDL-colesterol, apresentar boa atividade antioxidante e demonstrar efeito hepatoprotetor.

Alves et al. (2014c) avaliaram a eficiência do extrato tânico (acetônico) de FCJ no controle de *Spodoptera frugiperda*. Na concentração de 2.000 mg L<sup>-1</sup>, o extrato mostrou efeito nocivo sobre a *S. frugiperda*, aumentando a taxa de mortalidade na fase larval, os períodos de duração das fases larval e pupal e diminuindo a quantidade de fêmeas. Sendo, portanto eficiente na proteção de diversas culturas agrícolas atacadas por este inseto.

Reynertson et al. (2008) investigaram o conteúdo de fenólicos totais presentes na jabuticaba e registraram teor de 31,6 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) g<sup>-1</sup> de fruta seca. Santos et al. (2011) extraíram compostos bioativos importantes da casca de jabuticaba utilizando extração assistida por alta pressão de dióxido de carbono, utilizaram delineamento estatístico para otimizar as variáveis de extração: pressão de extração (65 a 135 bar),

temperatura (40 °C a 80 °C) e a razão da mistura volume de líquido-sólido/CO<sub>2</sub> pressurizado. Estas análises foram realizadas para prever os valores ótimos para as variáveis de extração, a fim de se obter a condição que melhor resultasse em um extrato com alta concentração de antocianina e compostos fenólicos que foram de  $2,2 \pm 0,3$  mg cianidina-3-glicosídeo/g de casca desidratada e  $13 \pm 1$  mg de ácido gálico g<sup>-1</sup> de casca desidratada, respectivamente, as quais foram conseguidas à 117 bar de pressão de extração, 80 °C para temperatura de extração e 20% de razão da mistura volume de líquido-sólido/CO<sub>2</sub> pressurizado.

Diante do descrito pode-se observar que a jabuticaba é um fruto, cuja casca, apresenta constituintes que exercem importantes atividades metabólicas e portanto, tem atraído a atenção para seu melhor aproveitamento.

## **2.4 Bactérias patogênicas**

As bactérias estão presentes na pele, mucosas e no trato intestinal de homens e animais. Algumas bactérias são benéficas para seu hospedeiro, proporcionando proteção contra patógenos e doenças, entretanto, existem bactérias danosas aos seres humanos, que podem causar sérios problemas para a saúde pública. Elas possuem um curto tempo de geração, assim, são capazes de responder rapidamente as mudanças do ambiente e a introdução de antibióticos. Portanto, muitas vezes tornam-se resistentes, devido à fácil adaptação desses microrganismos (GURGEL; CARVALHO, 2008).

A resistência das bactérias patogênicas vem se tornando cada vez mais grave, devido às dificuldades para descobrir e lançar novos antimicrobianos no mercado. Assim, esse problema tem contribuído para estudos de novos compostos sintéticos e/ou naturais originados de plantas (PUPO; GALLO, 2007).

Elas podem formar estruturas complexas chamadas biofilmes. Estes são comunidades de microrganismos envoltos por matriz de polissacarídeos extracelulares. (OLIVEIRA et al., 2010). Bactérias em biofilmes são mais protegidas e mais resistentes às defesas do organismo, antissépticos e antibióticos, tanto tópicos como sistêmicos (SIBBALD et al., 2003).

Fazli et al. (2011) afirmam que a microbiota de feridas crônicas é multiespécies, envolvendo tanto bactérias aeróbicas quanto anaeróbicas. Estas bactérias se originam a partir do ambiente, também das circundantes da pele e de fontes endógenas tais como superfícies mucosas. Há um reconhecimento crescente de que as bactérias em feridas crônicas crescem nos biofilmes, e que a presença destes prolonga a inflamação da ferida e promove

cronicidade. Bactérias em biofilmes são tolerantes ao tratamento com antimicrobianos, e assim, são difíceis de erradicar.

A classificação relacionada à presença de microrganismos, segundo Sibbald et al. (2003), é a seguinte:

1. Contaminação: presença de bactérias não replicantes no tecido.
2. Colonização: presença de bactérias replicantes no tecido, mas com patogenicidade e número insuficiente para inibir o processo de cicatrização normal.
3. Colonização crítica: presença de bactérias replicantes no tecido, com maior carga microbiana (bioburden) e patogenicidade capazes de inibir o processo de cicatrização (competem por nutrientes e oxigênio e aumentam os níveis inflamatórios), além da liberação de toxinas pelas bactérias.
4. Infecção: quando há penetração e proliferação de bactérias de modo profundo nos tecidos ao redor da úlcera.

Comumente, as feridas são contaminadas por bactérias provenientes da pele. Entre as espécies mais frequentemente encontradas, citam-se: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter sp.*, *Streptococcus hemolíticos do grupo A, B, C e G*, *Eschericia coli* e *Klebsiella sp.*, diferentes espécies de anaeróbios e raramente, fungos, como *Candida sp.* (BOWLER, 2003; BOWLER et al., 2001).

Entre as bactérias patogênicas, as principais presentes nas feridas são *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus* (GONÇALVES et al., 2005).

De acordo com Parente et al. (2009), *S. aureus*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus luteu*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Serratia marcescens* são bactérias que acometem feridas cutâneas.

Segundo Pelissari et al. (2010), *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, e cepas de campo *P. aeruginosa*, *Shigella sonnei* e *Serratia marcescens* foram testadas por estarem constantemente presentes em feridas cutâneas acometidas por multibactérias.

Kempfer et al. (2010) relataram que os microrganismos mais frequentemente envolvidos em feridas, principalmente as hospitalares são o *S. aureus*, *S. coagulase-negativos*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, *Enterobacter sp.* e *Proteus sp.* Em estudo realizado com 70 pacientes diabéticos, portadores de lesões nos membros inferiores, internados no Hospital

Escola da Faculdade Federal de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, as bactérias mais encontradas foram *P. mirabilis* e *S. aureus*. Além disso, foram isoladas, em média, duas bactérias por paciente, demonstrando a característica polimicrobiana destas culturas. Muitos dos agentes encontrados na pele normalmente podem aparecer também em culturas de pacientes com feridas infectadas.

De acordo com Kirketerp-Møller et al. (2008), as bactérias que mais acometem feridas crônicas são as seguintes, em ordem decrescente de proporção: *S. aureus* (em 93,5%), *Enterococcus faecalis* (71,7%), *P. aeruginosa* (52,2%), estafilococos coagulase- negativo (45,7%), espécies *Proteus* (41,3%), e as bactérias anaeróbicas (39,1%). A presença de bactérias em feridas é um problema que está crescendo em ritmo acelerado com o crescente surgimento de multi-resistência, principalmente, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. No entanto, uma contribuição significativa para a falta de sucesso para o tratamento com antibióticos pode ser a capacidade das bactérias de colonizar, estabelecer e proliferar na forma de biofilme na ferida, o que é particularmente pronunciado em infecções crônicas.

Diversos fármacos obtidos de plantas medicinais são usados como anti-inflamatórios e cicatrizantes. Paradoxalmente, apesar do uso cada vez mais frequente, seu uso é baseado apenas em conhecimentos populares, faltando o suporte de evidências experimentais que comprovem o potencial terapêutico, mecanismo de ação, toxicidade e os possíveis efeitos colaterais (BATISTA et al., 2012).

Durante séculos tem-se buscado nas plantas medicinais alternativas para o tratamento de diversas doenças dermatológicas (RASKIN et al., 2002), principalmente naquelas que apresentam processos cicatriciais de difícil resolução (HSU, 2005). Os resultados de pesquisas da atuação farmacológica das plantas medicinais na cicatrização envolvendo animais e humanos, na sua maioria, não especificam sobre quais das fases desse processo a atividade foi evidenciada (KRISHNAN, 2006).

Pesquisas na busca por antimicrobianos naturais permitirão ampliar as possibilidades de utilização destes no combate às bactérias resistentes, frente aos medicamentos já existentes. Além de proporcionar matéria-prima para pesquisas de compostos bioativos, a utilização de resíduos agroindustriais ajuda a minimizar os riscos de danos ambientais.

A seguir serão descritas características das bactérias que foram estudadas neste trabalho.

a) *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são cocos Gram e catalase positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares. O *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e atualmente é um dos microorganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae*, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Esse gênero possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Geralmente, esse gênero faz parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é a *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos (SANTOS et al., 2007).

*Staphylococcus* são importantes patógenos humanos, causando um amplo espectro de doenças sistêmicas potencialmente fatais; infecções cutâneas, de tecidos moles, ossos e das vias urinárias; e infecções oportunistas (MURRAY et al., 2006). A espécie mais comumente associada à doença humana é o *S. aureus*, que vive tanto de forma aeróbia como pode ser anaeróbio facultativo, tendo seu nome em virtude da formação de colônias douradas em consequência dos pigmentos carotenoides que formam durante o crescimento (TORTORA et al., 2012). Esta espécie faz parte da microbiota natural, principalmente da pele, podendo tornar-se patogênico em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. Os traumas que comprometem a integridade da barreira cutânea constituem-se a principal causa de mudança de comportamento deste microrganismo sendo o agente principal presente em infecções cutâneas (MIMICA; MENDES, 2007).

As infecções mais comuns envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos, algumas infecções são agudas, piogênicas e podem disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais, são também encontrados frequentemente. Portadores nasais e pacientes colonizados por *S. aureus* têm sido descritos como fator de risco para o desenvolvimento de infecções, e

11% a 43% dos pacientes colonizados adquirem infecção. O aspecto do processo infeccioso depende dos fatores de virulência do patógeno e de mecanismos de defesa do hospedeiro (GELATTI et al., 2009).

Como é uma bactéria fundamental para estudos envolvendo feridas e a pele, no presente trabalho foram testadas duas cepas diferentes de *S. aureus*, sendo uma cepa mais resistente e a outra menos resistente.

b) *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* pertence à família *Listeriaceae*, abrange duas espécies patogênicas para humanos e mamíferos: a *Listeria monocytogenes* e a *L. ivanovii* (GASANOV et al., 2005). Crescem numa ampla faixa de temperatura (1 °C a 45 °C), com ótimo entre 30 °C e 37 °C e são classificadas como psicrotróficas, em função da capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (JAY, 2005).

Trata-se de um bacilo Gram positivo conhecido por causar natimorte e doença neurológica em animais bem antes de ser reconhecido como causador de doença em humanos. Excretado nas fezes de animais, é amplamente distribuído no solo e na água. O nome *Listeria monocytogenes* é derivado da proliferação dos monócitos (um tipo de leucócito) encontrados em alguns animais infectados pelo bacilo. A doença listeriose mudou de uma doença de importância muito limitada para uma causa de grande preocupação para as autoridades de saúde, passando a ser a quarta causa mais comum de meningite bacteriana (TORTORA et al., 2012).

A espécie *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram positiva na forma de bastonete, anaeróbica facultativa e não formadora de esporo (SCHMID et al., 2005). *L. monocytogenes* é notável por sua habilidade em crescer sob temperatura de refrigeração, ao contrário da maioria dos outros patógenos entéricos (PAL et al., 2008). Isto mostra que o resfriamento a 4 °C não impede o crescimento do microrganismo em níveis perigosos, não sendo destruído simplesmente por métodos convencionais (RHOADES et al., 2009).

A contaminação por *L. monocytogenes* resulta em listeriose, considerada grande problema de saúde pública, pois pode causar aborto, septicemias e meningites (HARVEY et al., 2008). A doença aparece em duas formas básicas: em adultos infectados e como uma infecção em fetos e recém-nascidos. Nos adultos humanos, ela normalmente é uma doença branda, em geral sem sintomas, porém a bactéria pode algumas vezes invadir o sistema nervoso central (SNC), causando a meningite. Isso é muito provável de acontecer com

peessoas cujo sistema imune esteja comprometido. A taxa de mortalidade para as infecções do SNC pode chegar a 50%. Algumas vezes, a *L. monocytogenes* invade a corrente sanguínea e causa uma ampla variedade de condições clínicas, especialmente sepse. Pessoas que se recuperam ou aparentemente saudáveis em geral liberam indefinidamente o patógeno nas fezes. Um fator importante de sua virulência é que, quando a *L. monocytogenes* é ingerida pelas células fagocíticas, ela não é destruída, podendo até proliferar dentro das células, principalmente no fígado. Ela também tem a capacidade incomum de se mover diretamente de um fagócito para outro adjacente (TORTORA et al., 2012).

A *L. monocytogenes* é especialmente perigosa quando infecta uma mulher grávida. A mulher geralmente sofre sintomas leves, parecidos com os de um resfriado, porém o feto pode ser infectado via placenta, em geral resultando em aborto ou bebê natimorto. Em alguns casos, a doença não é manifestada até algumas semanas depois do nascimento, em geral como meningite, o que pode resultar em dano significativo ao cérebro ou morte. A taxa de mortalidade infantil associada com esse tipo de infecção é de cerca de 60% (TORTORA et al., 2012).

c) *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas* pertencente à família das *Pseudomonadaceae* e constituem-se de bastonetes Gram negativos aeróbios, não fermentadores de glicose, muito comuns no solo e em outros ambientes naturais. Muitas espécies de *Pseudomonas* excretam pigmentos extracelulares solúveis em água que difundem no seu próprio meio. Uma das espécies, *P. aeruginosa*, produz uma pigmentação solúvel, azul-esverdeada, a piocianina que sob certas condições, particularmente em hospedeiros enfraquecidos, este organismo pode infectar o trato urinário, queimaduras e feridas, e causar infecções sanguíneas (septicemia), abscessos e meningite (TORTORA et al., 2012).

Em hospitais e em outros locais em que agentes farmacêuticos são preparados, a habilidade das *Pseudomonas* de se desenvolverem com quantidades mínimas de fontes incomuns de carbono, como resíduos de sabão, ou adesivos de revestimento de tampas encontrados em uma solução, tem sido um problema inesperado. As *Pseudomonas* são até capazes de crescer em alguns antissépticos, como compostos quaternários de amônio. Sua resistência à maioria dos antibióticos também tem sido uma fonte de preocupação (VERONESI et al., 2010); essa resistência está provavelmente relacionada às características das proteínas transmembranares presentes na parede celular, que controlam a entrada de



pequenos metabólitos, como açúcares, aminoácidos e íons através da parede celular. O genoma das *Pseudomonas* é grande e também codifica diversos sistemas de bombeamento de efluxo que são muito eficientes, ejetando os antibióticos da célula antes deles fazerem efeito. São responsáveis por uma em cada dez infecções nosocomiais, especialmente infecções em pacientes nas unidades de queimados (KONG et al., 2005).

A espécie *P. aeruginosa* é um patógeno dominante em pacientes com fibrose cística, uma doença pulmonar obstrutiva crônica, frequente em pacientes de unidade de terapia intensiva, estando a presença deste organismo associada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade (McGOWAN, 2006).

## 2.5 Feridas e cicatrização

Ferida é uma lesão física corporal caracterizada pela ruptura da continuidade normal das estruturas do corpo (HUSSEIN et al., 2011). A cicatrização desta consiste na reconstrução do local, a fim de restaurar a sua integridade e a função normal (TACON et al., 2011). É um processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido lesado, porém, o tratamento de feridas busca o fechamento rápido da lesão de forma a restabelecer a integridade do tecido lesionado e impedir agravamentos, como a colonização por bactérias. Diante disso, é muito importante a compreensão do processo biológico da cicatrização de feridas e regeneração tecidual (MENDONÇA et al., 2009). A aplicação local de diferentes produtos químicos, devido ao aumento da resistência bacteriana, tem sido pesquisada, a fim de verificar sua contribuição para a melhora na cicatrização de forma eficaz e mais rápida (GÜNTER et al., 2012; TARAMESHLOO et al., 2012).

Existem várias opções e produtos para tratamento de feridas, como nitrato de prata, marfenide, vinagre, iodo, sulfadiazina de prata, entre outros, que permitem o controle microbiológico das feridas, porém alguns destes não têm capacidade de hidratação suficiente para a superfície da ferida. Um produto amplamente utilizado é o flammacine (sulfadiazina de prata), o qual é simples de manipular e tem uma favorável relação de custo e eficácia. A desvantagem é a dolorosa troca diária de curativos e a secagem das áreas da ferida (GÜNTER et al., 2012).

Tarameshloo et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo de analisar e comparar a eficácia da aplicação tópica de creme *Aloe Vera*, no processo de cicatrização de

incisões suturadas em ratos Wistar utilizando um método histológico. Com o referido estudo os autores puderam constatar que a *Aloe vera* pode se infiltrar no tecido da pele e agir sobre a ferida para acelerar o processo de cicatrização, se manifestando com o aumento na atividade de fatores biológicos envolvidos no processo de reparação, tais como células e enzimas, bem como uma melhoria no fornecimento de sangue e o conteúdo de colágeno. Este trabalho corrobora com de outros pesquisadores de que *Aloe vera* tem um impacto benéfico sobre a proliferação de fibroblastos, aumentando o número de fibras colágenas, na estimulação e formação de tecido epidérmico e fechamento da ferida, podendo dessa forma auxiliar no fechamento rápido em feridas abertas. Os resultados também confirmaram o aumento da atividade dos macrófagos e estimulação da proliferação de fibroblastos.

Ainda neste trabalho, Tarameshloo et al. (2012), não observaram diferença na aceleração da cicatrização de feridas entre o tratamento controle e o tratamento de lesões com sulfadiazina de prata (SP). Além disso, a combinação de *Aloe vera* com SP tem sido sugerida para melhorar a cicatrização de feridas. Hosseinimehr et al. (2010) compararam os efeitos terapêuticos de *Aloe vera* creme (*A. vera* gel em pó a 0,5%) e SP em feridas de queimaduras em ratos com um aumento significativo na reepitelização quando o creme de *Aloe vera* foi aplicado. Apesar dos efeitos antissépticos de SP em feridas, é confirmado o efeito citotóxico de SP em fibroblastos e queratinócitos. Uma possível explicação para este incidente é debilidade da SP em distinguir entre as células saudáveis envolvidas no processo de cicatrização e microrganismos (POON et al., 2004).

A pele é tida como a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos e por isso está sujeita a constantes agressões, tornando sua capacidade de reparação muito importante para a sobrevivência (NOGUEIRA et al., 2005). Após haver o rompimento tecidual, inicia-se o processo de reparo, que consiste em uma sequência de eventos moleculares objetivando a restauração do tecido lesado (MENDONÇA et al., 2009).

A cicatrização é o processo pelo qual o tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, seja a lesão traumática ou necrótica (PANOBIANCO et al., 2012). Dessa forma, o processo de cicatrização tem como finalidade restabelecer a homeostasia tecidual (CAVALCANTE et al., 2012). O conhecimento a respeito de tal processo, para que se possa intervir no mesmo de forma a auxiliar e acelerar a cicatrização, além de promover homeostasia do organismo e o bem-estar do paciente, é de suma importância.

Após a lesão, um conjunto de eventos bioquímicos se estabelece para reparar o dano e promover a cicatrização (PAGANELA et al., 2009). Os eventos que desencadeiam a

cicatrização são intercedidos e mantidos por mediadores bioquímicos, descritos em fases diferentes, que correspondem aos principais episódios observados em determinado período de tempo (LIMA et al., 2012).

O processo de reparação tecidual é dividido em fases, de limites próximos, mas sobrepostas no tempo, as quais são: hemostasia; fase inflamatória; formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares); e remodelação (ROCHA JUNIOR et al., 2006).

### **2.5.1 Fatores que retardam a cicatrização**

Os fatores locais que retardam a cicatrização estão relacionados principalmente ao movimento e à presença de resíduos dentro da ferida, por exemplo: tecido necrosado, corpos estranhos, contaminação bacteriana e hipóxia tecidual. Estes fatores podem atuar como barreira física para o desenvolvimento ordenado de tecido de granulação e deposição de colágeno, ou podem exagerar a inflamação, afetando a resposta inflamatória (AFONSO et al., 2014).

Ferida em área com alta mobilidade é propensa à inflamação crônica devido à perturbação repetitiva dos novos capilares, depósitos de colágeno e fragilidade do novo epitélio. Inversamente, a completa imobilização da área ferida pode levar a um arranjo desorganizado do novo colágeno dentro da ferida, que diminui a força de tensão resultante (OLIVEIRA; DIAS, 2012). A presença de corpos estranhos no interior da ferida é fonte de infecção e irritação mantendo a inflamação e causando resistência às tentativas de controlar a infecção (GUIA DE FERIDAS, 2011).

Antes de iniciar um tratamento, a presença de corpos estranhos deve ser descartada em uma ferida. Se a presença de um corpo estranho for confirmada no interior da ferida, limpeza e lavagem são necessárias para garantir assepsia e umidade no leito da mesma (HENDRICKSON et al., 2005).

Entre os fatores locais que retardam a cicatrização de uma ferida, a infecção é a causa mais importante deste retardamento. Para tal, deve-se considerar que toda ferida está colonizada, já que as bactérias existentes na pele podem colonizar a lesão, mas isso não significa que esteja infectada (SARANDY, 2007).

Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, é necessário favorecer condições locais com a utilização de terapia tópica adequada para otimizar o processo fisiológico (COELHO et al., 2010).

Neste trabalho, o extrato fenólico de casca de jabuticaba foi utilizado visando auxiliar o processo de cicatrização em feridas de ratos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises físicas e químicas do presente trabalho foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), a avaliação da atividade bactericida foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA, o ensaio com animais no Biotério Central/UFLA, e a análise histológica foi realizada no Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária/UFLA.

#### 3.1 Colheita das jaboticabas e preparo da casca

Foram colhidos, manualmente, pela manhã, 21,4 kg de frutos de jaboticaba, *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg, genótipo Sabará, na fazenda São José do Ismeril, no município de Coqueiral, MG, Brasil, em uma região que fica próximo à Lavras.

Os frutos sadios foram selecionados e lavados em água corrente e em seguida, sanitizados com solução de hipoclorito de sódio ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), por imersão durante 10 minutos, espremidos em peneiras, obtendo-se 5,15 kg de cascas, as quais foram separadas e colocadas em cestas de material metálico de malha fina, levadas para estufa de secagem com circulação de ar, à temperatura de  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e secas até peso constante. Após a desidratação, as cascas de jaboticaba foram moídas em moinho de facas por 3 minutos, obtendo-se 1,07 kg de farinha, em seguida, a farinha de casca de jaboticaba (FCJ) foi passada em peneiras, de 35, 60, 80 e 100 meshes, para determinar a sua granulometria. A maioria das partículas da farinha foram retidas nas peneiras de 60 e 80 meshes, que de acordo com Zanotto e Bellaver (1996), é classificada como farinha com partículas finas. A FCJ foi acondicionada em frascos hermeticamente fechados, protegidos da luz, à temperatura ambiente até a sua utilização.

Na FCJ se determinou o teor de umidade, em triplicata, segundo método da AOAC (2005).

#### 3.2 Obtenção dos extratos

##### a) Extrato aquoso

Um grama de FCJ foi misturado com 20 mL de água destilada sob agitação horizontal por 15 minutos. Após esse período, filtrou-se e o resíduo recolhido foi submetido à reextração

nas mesmas condições. Após três extrações sucessivas, o resíduo foi descartado, reunindo-se os filtrados, que foram a seguir liofilizados.

#### **b) Extrato metanólico**

Um grama da FCJ foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL e foram acrescentados 50 mL de metanol 50% (v v<sup>-1</sup>). A seguir, foi tampado com rolha apropriada para refluxo e colocado em uma chapa aquecedora a 80 °C. Após 15 minutos de fervura, o extrato foi filtrado e recolhido em um becker de 250 mL. O resíduo foi novamente colocado no erlenmeyer e este processo se repetiu por mais duas vezes (AOAC, 2005). Após a terceira filtração, reuniram-se os filtrados, que foram levados ao evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e posteriormente, liofilizados.

#### **c) Extrato etanólico**

Para a preparação do extrato etanólico, 1 g de FCJ foi misturado com 15 mL de etanol acidificado, nas proporções de 85% de etanol para 15% de ácido HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup>, homogeneizados por 2 minutos em politron e macerados por 12 horas, a 4 °C, ao abrigo da luz (LIMA et al., 2011). A solução foi filtrada em papel Whatman n<sup>o</sup> 1 e funil de Buchner sob pressão e o resíduo lavado com o mesmo solvente, até se obter um volume de 100 mL. Em seguida, este extrato foi levado ao evaporador rotatório para eliminação dos solventes e posteriormente, liofilizado.

#### **d) Extrato acetônico**

Para a obtenção do extrato acetônico, 1g da FCJ foi misturado com 10 mL de solução de acetona: água (7: 3 v v<sup>-1</sup>) e mantida à temperatura ambiente por 2 horas, com três agitações intercaladas. Após esse período, a solução foi filtrada. O resíduo recolhido foi submetido à reextração nas mesmas condições (AGOSTINI-COSTA et al., 2003). Após três extrações sucessivas, o resíduo foi descartado, reuniram-se os filtrados, que foi levado ao evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e liofilizado.

Os compostos fenólicos, em todos os extratos, foram quantificados e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### 3.3 Avaliação da atividade bactericida

Para a avaliação bactericida *in vitro* dos extratos de FCJ foram utilizados quatro patógenos bacterianos de espécies Gram positivas e Gram negativas, mediante o uso do método de concentração mínima bactericida (CMB) pela microdiluição em caldo e posterior análise do crescimento de colônias, com incubação em placas contendo ágar triptona de soja (TSA), como descrito no CLSI (2003) com modificações.

A CMB foi determinada em microplacas utilizadas para a microdiluição em caldo. De cada poço onde foram feitas as diluições, foram transferidas alíquotas de 10 µL para placas contendo TSA. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em %. A CMB foi definida como a menor concentração de cada extrato que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas, sem a presença do agente antibacteriano.

As bactérias *Staphylococcus aureus* GL 5674, *Staphylococcus aureus* GL 8702, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 foram utilizadas para avaliação da atividade bactericida, sendo a *S. aureus* e *L. monocytogenes* bactérias Gram positivas e *P. aeruginosa* Gram negativa.

#### 3.3.1 Efeito inibitório dos extratos de FCJ sobre bactérias

As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL). Os inóculos foram reativados inoculando-se alíquotas de 100 µL da cultura estoque em tubos contendo 10 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubadas a 37 °C por 24 horas. As suspensões das culturas foram padronizadas em 10<sup>8</sup> UFC (Unidades formadoras de colônias) mL<sup>-1</sup>.

Para ativação das culturas, as cepas foram repicadas em caldo-infusão TSB e ficaram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a ativação, cada cepa bacteriana foi repicada em placa contendo TSA e para *L. monocytogenes* foi também adicionado a esta placa caldo extrato de levedura triptona de soja (0,6%), sendo as placas armazenadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após esse período, as colônias foram transferidas e diluídas, com auxílio de alça bacteriológica, adicionando-se solução fisiológica (0,85%), para um tubo de vidro com a mesma solução fisiológica até se obter uma diluição padrão utilizando como comparação a escala McFarland de 0,5 (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) e posteriormente, foram realizados os

plaqueamentos em meios específicos para cada espécie, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo.

A CMB dos extratos foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o descrito no CLSI (2003) com modificações. Os extratos foram solubilizados em caldo TSB, adicionados de Tween 80 (0,5%) e para *L. monocytogenes* foi também adicionado à placa caldo extrato de levedura triptona de soja (0,6%).

A solução dos extratos a ser adicionada as placas foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de extrato em 1 mL de água destilada, seguida de agitação por 15 minutos em agitador horizontal, com posterior centrifugação durante 10 minutos a 3.000 x g, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e a partir desta solução (10%) foram diluídas 1:2 nas placas sequencialmente, com as seguintes concentrações, em %: 5,00; 2,50; 1,25; 0,63, 0,32, 0,16 e 0,08.

Alíquotas de 150 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculados 10 µL das culturas padronizadas. As microplacas foram vedadas e incubadas a 37 °C por 24 horas.

### **3.3.2 Determinação da CMB pela técnica de microgota**

Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e para *L. monocytogenes* foi adicionado a esta placa caldo extrato de levedura triptona de soja (0,6%), empregando-se a técnica de microgota para a determinação da concentração mínima bactericida e incubadas a 37 °C por 24 horas. A CMB dos componentes foi aquela que, após incubação, não ocorreu crescimento bacteriano em placa. O experimento foi realizado em triplicata para cada extrato, para todas as bactérias e foi feito o controle negativo contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e extratos, sem a inoculação das bactérias.

### **3.4 Análise cromatográfica dos compostos fenólicos**

A análise cromatográfica foi realizada utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20AT, um detector UV-visível modelo SPD-M20A, forno modelo CTO-20AC, interface modelo CBM-20A e injetor automático com autoamostrador modelo SIL-20A. As separações foram realizadas utilizando-se uma coluna Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm x 4,6 mm) conectada a uma pré-coluna Shim-pack Column Holder (10 mm x 4,6 mm).



Os extratos foram diluídos em água (1:16 m/v), e os padrões filtrados em uma membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>) e diretamente injetados no sistema cromatográfico. Os compostos fenólicos nos extratos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões (ALVES et al. 2014c). A quantificação foi realizada por meio da construção de curvas analíticas obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,99.

#### **a) Identificação de flavonoides, taninos e ácidos fenólicos**

A fase móvel foi composta pelas soluções de ácido acético em água 2% (A) e metanol/água/ácido acético (70/28/2 v/v/v) (B). As análises foram realizadas com tempo total de 65 minutos, temperatura de 40 °C, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de 280 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  em sistema do tipo gradiente (100% do solvente A de 0,01 a 5,0 minutos; 70% do solvente A de 5,0 a 25,0 minutos; 60% do solvente A de 25,0 a 43,0 minutos; 55% do solvente A de 43,0 a 50,0 minutos e 0% do solvente A por 10 minutos) até o final da corrida. O solvente A foi aumentado para 100%, buscando manter o equilíbrio da coluna (ALVES et al. 2014c).

Os padrões utilizados foram:

-Ácidos fenólicos: ácido ferúlico, ácido salicílico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido gálico, ácidos para e orto-cumárico.

-Taninos: epicatequina, catequina, galato de epicatequina,

-Flavonoides: resveratrol e quercetina.

#### **b) Identificação das antocianinas**

A fase móvel foi composta pelas soluções de acetonitrila (A) e água/ácido acético (80/20 v/v) (B). As análises foram realizadas com tempo total de 30 minutos, temperatura de 40 °C, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de 545 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  em sistema do tipo gradiente variando de 0 a 30% (PRATA, 2005).

Os padrões utilizados foram: cloreto de malvidina, cloreto de cianidina, cloreto de delphinidina.

### 3.5 Ensaio com animais e procedimento cirúrgico

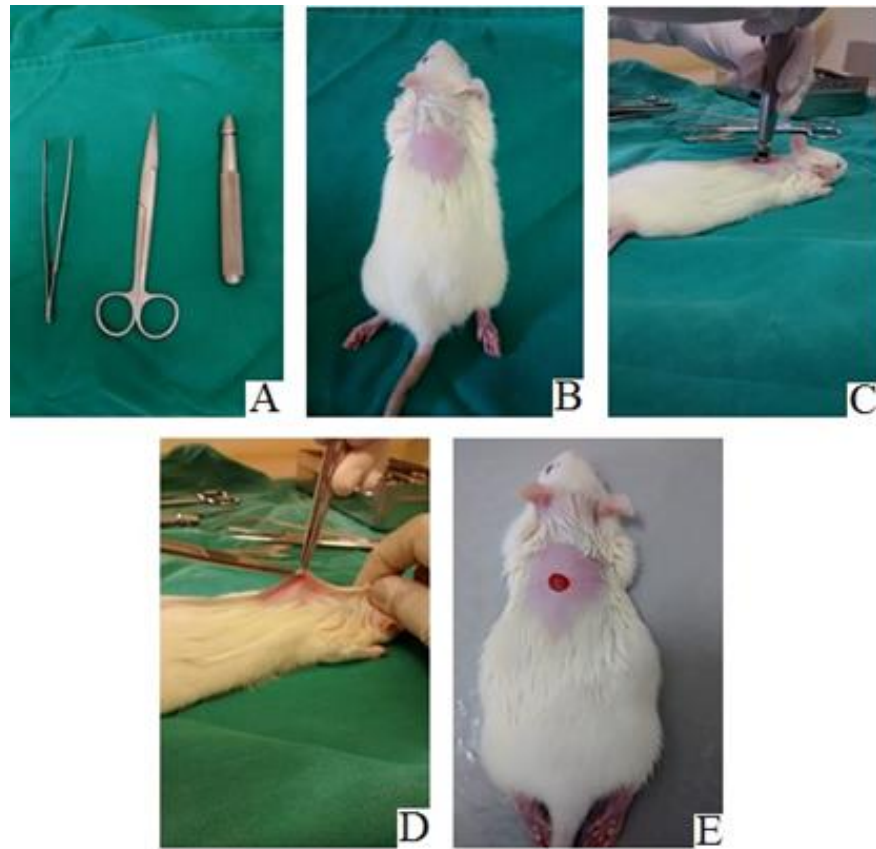
Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem *Wistar*, machos, com 60 dias de idade, pesando aproximadamente 140 g, provenientes do Biotério Central da UFLA. Os animais foram adaptados no Biotério de Cirurgia Experimental da Universidade, por um período de sete dias e acondicionados em gaiolas de propilpropileno e fotoperíodo claro/escuro de 12 horas, em condições de temperatura e umidade ambientais, alimentados com ração comercial (Labina Purina®) e água *ad libitum* (SIMÃO, et al., 2015).

A solução do extrato etanólico, liofilizado, utilizada no tratamento das feridas foi preparada como descrito no subitem 3.3.1 (10%, 5% e 2,5%), e após o preparo destas soluções, determinou-se o teor de compostos fenólicos totais para comparação da quantidade que estava sendo instilada nos animais, tanto do grupo controle, que utilizou sulfadiazina de prata, quanto nas diferentes concentrações do extrato etanólico, e para a medição do teor de compostos fenólicos no extrato etanólico nas três concentrações, utilizou-se o método de Folin-Denis, por colorimetria, tendo a catequina como padrão (AOAC, 2005).

Os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em quatro grupos, com 6 ratos cada, com feridas cutâneas: o grupo I – controle positivo, tratado com Bactrovet® (contendo 0,580 mg de sulfadiazina de prata mL<sup>-1</sup>); grupo II - tratado com solução aquosa do extrato etanólico liofilizado da FCJ (EE) a 10%, contendo 0,300 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup>; grupo III - tratado com solução aquosa do EE a 5%, contendo 0,150 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup> e o grupo IV - tratado com solução aquosa do EE a 2,5%, contendo 0,075 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup>.

Para a realização das feridas cutâneas (Figura 3), utilizou-se um *punch* metálico circular de 1 cm de diâmetro na região dorsocervical de cada animal, sendo identificados na cauda com caneta dermatográfica. Os animais foram anestesiados, utilizando-se da técnica dissociativa, com cloridrato de xilazina (10 mg kg<sup>-1</sup>) e cloridrato de cetamina (50 mg kg<sup>-1</sup>), administrados por via intramuscular. Após anestesia, foram feitas tricotomia e antissepsia do local cirúrgico com soluções degermantes e alcoólicas de clorexidina a 2%, sequencialmente. Logo após a cirurgia e diariamente no mesmo horário, 50 µL de Bactrovet® e 50 µL da solução do EE nas diferentes concentrações foram instilados nas feridas dos animais durante 21 dias, em cada grupo de animais.

Figura 3 – Material e procedimento cirúrgico.



A - Material cirúrgico: pinça, tesoura e *punch*, B- tricotomia, C- demarcação da área da ferida, D- corte cirúrgico, E- ferida.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Lavras com o protocolo de nº 32/16 e realizada de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990), conforme a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

### 3.6 Análise macroscópica e morfométrica das feridas

Todos os animais foram examinados diariamente quanto ao aspecto geral, observando-se a presença ou ausência de hemorragia, exsudato e crosta. Para a análise morfométrica, as feridas foram fotografadas e medidas em seu diâmetro maior e menor, empregando-se paquímetro, no dia 1 (dia que foram feitas as feridas cutâneas) e nos dias 3, 7, e 14 pós-operatório. Para calcular a área das feridas, se utilizou a equação  $A = \pi \cdot R \cdot r$ , em que “A” representa a área (cm<sup>2</sup>); “R”, o raio maior (cm) e “r”, o raio menor (cm) (PRATA et al., 1988). O grau de contração foi calculado pela equação: % de contração =  $(W_o - W_i) / W_o \times$

100, em que  $W_o$  = área inicial da ferida e  $W_i$  = área da ferida no dia em que foi feita a medição (RAMSEY et al., 1995).

### **3.7 Avaliação histológica das feridas**

Decorridos 21 dias, realizou-se a eutanásia dos ratos. Os animais foram sacrificados com sobredose de anestesia com cloridrato de xilazina ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e cloridrato de cetamina ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) via intraperitoneal. As feridas foram colhidas de maneira a incluir parte da pele adjacente às bordas da ferida e de todo o tecido cicatricial em sua profundidade. Todas as feridas foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7) por período mínimo de 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histológicos de rotina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo modelo “820” Spence, obtendo-se seções de  $6 \mu\text{m}$  de espessura. As lâminas histológicas foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes posteriormente submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para análise histológica.

A leitura das lâminas histológicas foi realizada em microscópio óptico, visando observar o processo inflamatório e cicatricial. Para a evolução da cicatrização foram considerados os seguintes achados histológicos: células polimorfonucleares, células mononucleares, proliferação vascular, proliferação fibroblástica, reepitelização e colagenização (GARROS et al., 2006).

### **3.8 Planejamento experimental e análise estatística**

Os compostos fenólicos foram analisados utilizando-se de um delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial de  $11 \times 4$  (compostos fenólicos x extratos), com 3 repetições. Os dados resultantes do experimento foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para dados balanceados (SISVAR), segundo Ferreira (2011) e quando significativo, foi utilizado teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparação das médias.

No ensaio com os animais foi utilizado o esquema  $4 \times 4$  (tratamentos x dias de medida das feridas), com 6 repetições. Os dados resultantes dos experimentos foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para dados

balanceados (SISVAR), segundo Ferreira (2011) e quando significativo, foi utilizado a análise de regressão para comparação das médias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Rendimento de extração

O teor de umidade da farinha de casca de jabuticaba foi de  $22,84 \pm 0,22 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ . O rendimento, em peso seco, das extrações aquosa, metanólica, etanólica e acetônica estão apresentados na tabela 2, logo abaixo.

Tabela 2 – Rendimento em peso seco e pH dos extratos da FCJ.

| <b>Extratos</b>   | <b>Rendimento (peso seco - %)</b> |
|-------------------|-----------------------------------|
| <b>Aquoso</b>     | $68,84 \pm 4,55$                  |
| <b>Metanólico</b> | $66,68 \pm 3,01$                  |
| <b>Etanólico</b>  | $50,03 \pm 1,74$                  |
| <b>Acetônico</b>  | $52,40 \pm 4,76$                  |

Observou-se que o extrato aquoso e o metanólico foram os que apresentaram maior rendimento de extração, em peso, e os extratos acetônico e etanólico, os de menor rendimento. Sendo que o etanólico foi o de menor rendimento, em peso seco, em detrimento aos demais extratos.

Oliveira (2016) utilizando-se das mesmas técnicas de extração e mesmos solventes do presente trabalho obteve rendimento de extrações de FCJ, em peso seco, similares aos rendimentos do presente trabalho, uma vez que houve também maior rendimento de extração para os extratos, aquoso e metanólico e menores para os extratos, acetônico e etanólico. Conforme pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento em peso seco dos extratos da FCJ.

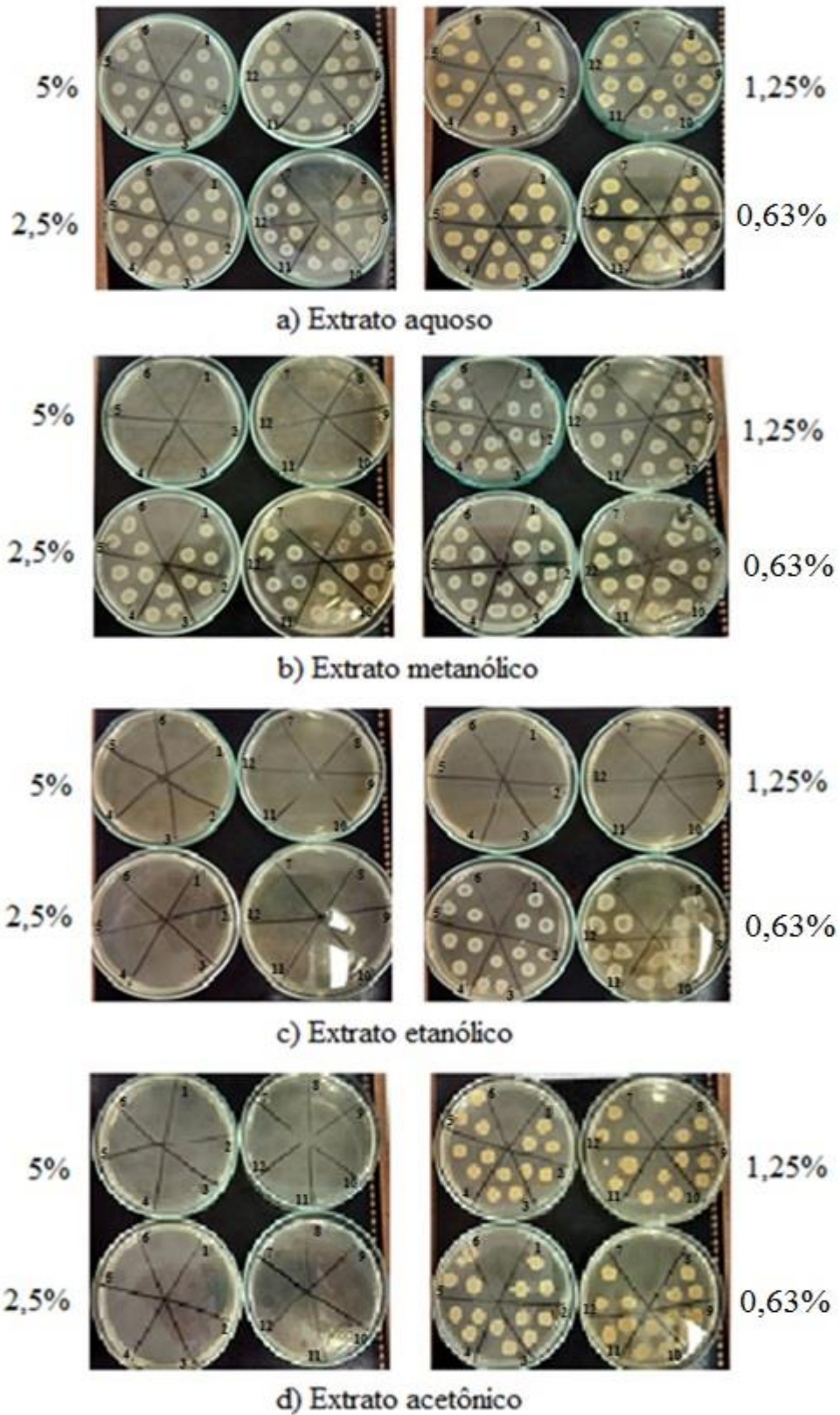
| <b>Extratos</b>   | <b>Rendimento (peso seco - %)</b> |
|-------------------|-----------------------------------|
| <b>Aquoso</b>     | $71,06 \pm 2,01$                  |
| <b>Metanólico</b> | $53,76 \pm 4,60$                  |
| <b>Etanólico</b>  | $43,16 \pm 1,24$                  |
| <b>Acetônico</b>  | $47,99 \pm 2,34$                  |

## 4.2 Atividade bactericida

O efeito da atividade bactericida dos extratos foi analisado utilizando-se da determinação da concentração mínima bactericida (CMB), pelo método da microdiluição em caldo e posterior análise do crescimento de colônias.

Na Figura 4 está ilustrada a atividade bactericida dos diferentes extratos de farinha de casca de jabuticaba em quatro concentrações e do controle negativo, que ocorreu para todas as bactérias testadas e na Tabela 4 estão apresentados os resultados de crescimento bacteriano nas diversas concentrações de extratos da FCJ para as diferentes bactérias. Observou-se que o extrato aquoso não inibiu o crescimento das bactérias testadas. Os extratos etanólico e acetônico inibiram o crescimento de todas as bactérias até a concentração de 1,25% e 2,50%, respectivamente. Já o extrato metanólico inibiu o crescimento de todas as bactérias apenas na concentração de 5,00%. No controle negativo, não houve crescimento bacteriano, indicando a ausência de contaminação.

Figura 4 – Atividade bactericida dos diferentes extratos de farinha de casca de jabuticaba em quatro concentrações.



Numeração de cada placa de 1 a 5 e 8 a 12 – Extratos; 6 e 7 - controle negativo



Tabela 4 – Concentração mínima bactericida em várias concentrações de diferentes extratos de farinha de casca de jabuticaba para as bactérias estudadas.

| Bactérias                                | Concentração dos extratos (%) |      |      |      |      |      |      |
|--|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|  | 5,00                          | 2,50 | 1,25 | 0,63 | 0,32 | 0,16 | 0,08 |
| <b>Extrato aquoso</b>                    |                               |      |      |      |      |      |      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 5674     | NI <sup>a</sup>               | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 8702     | NI                            | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | NI                            | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117 | NI                            | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <b>Extrato metanólico</b>                |                               |      |      |      |      |      |      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 5674     | I <sup>b</sup>                | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 8702     | I                             | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I                             | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117 | I                             | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <b>Extrato etanólico</b>                 |                               |      |      |      |      |      |      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 5674     | I                             | I    | I    | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 8702     | I                             | I    | I    | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I                             | I    | I    | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117 | I                             | I    | I    | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <b>Extrato acetônico</b>                 |                               |      |      |      |      |      |      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 5674     | I                             | I    | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GL 8702     | I                             | I    | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I                             | I    | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117 | I                             | I    | NI   | NI   | NI   | NI   | NI   |

<sup>a</sup>NI= não inibiu crescimento bacteriano.

<sup>b</sup>I= inibiu crescimento bacteriano.

O extrato etanólico de FCJ, na concentração de 1,25%, apresentou ação bactericida semelhante aos resultados de antimicrobianos naturais largamente estudados, como por exemplo o eugenol. Alguns autores relataram que a aplicação de óleo de cravo (sendo o eugenol o componente majoritário, podendo representar nas folhas aproximadamente 95% do óleo extraído e no cravo propriamente de 70% a 85%) na concentração de 1% e 2% reduziu a contagem de *Listeria monocytogenes* em salsicha alemã (MAZZAFERA, 2003; SCHERER et al., 2009).

Não existe, na literatura, um critério único para avaliação da eficiência da ação antimicrobiana de extratos vegetais, dessa forma, o modo de ação de compostos fenólicos em bactérias patogênicas ainda não está bem estabelecido. Acredita-se que fenóis hidrofóbicos, como timol e carvacrol também possam agir por alterações na permeabilidade da membrana celular. No entanto, investigações mais aprofundadas são necessárias para esclarecer os mecanismos de ação desses compostos (SOUZA et al., 2016).

Engels et al. (2009) e Mirghani et al. (2009) relataram o potencial antimicrobiano da amêndoa da manga, associando este potencial ao teor de taninos hidrolisáveis, os quais

possuem capacidade de interação com proteínas, inibindo a atividade enzimática. Dessa forma, é possível que a ação antimicrobiana dos extratos provenientes do resíduo agroindustrial da manga seja, em parte, atribuída ao seu alto teor de compostos fenólicos, o que pode também ser constatado na FCJ devido a sua riqueza em compostos fenólicos.

A diferença na atividade antimicrobiana de cada planta ou extrato pode ser atribuída às diferenças na composição dos óleos e compostos fenólicos extraídos. A atividade antibacteriana de dois extratos etanólicos obtidos da casca e amêndoa da manga variedade ‘Tommy Atkins’, demonstraram relevante atividade antimicrobiana frente às cepas das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (ARBOS et al., 2013; SCHERER et al., 2009).

Os taninos e os flavonoides apresentam habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias, configurando os prováveis mecanismos de ação antimicrobiana (MENDES et al., 2011). Outra teoria de ação antibacteriana dos taninos fundamenta-se na complexação destes com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Notadamente, microrganismos Gram negativos mostram-se mais resistentes à ação de antimicrobianos em relação aos Gram positivos, uma vez que sua parede celular se encontra protegida por uma camada rica em polissacarídeos o que dificulta a ação das substâncias antimicrobianas presentes nos extratos (GOULD, 2009). Devido à maior suscetibilidade de microrganismos Gram positivos, acredita-se que o mecanismo da ação antimicrobiana do extrato, provavelmente, decorra da interação do mesmo com o peptidoglicano presente na parede celular bacteriana, e que caracteriza uma barreira mais frágil do que a parede celular das bactérias Gram negativas (RABÊLO et al., 2014).

Como observado neste trabalho, os extratos apresentaram inibição de crescimento tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas, mostrando o grande potencial da FCJ como bactericida.

Ainda segundo Ostrosky et al. (2008), as variações referentes à determinação da CMB de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Entre eles, podem ser citadas a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da colheita, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados destes antimicrobianos de produtos naturais.

Deste modo, as diferenças observadas na atividade bactericida desses extratos sobre as diferentes cepas testadas podem estar relacionadas às expressivas variações na composição química dos extratos. Porém, a ação antimicrobiana apresentada pelos extratos não depende unicamente da composição química, mas também das propriedades lipofílicas, da solubilidade em água, da potência dos grupos funcionais e da mistura de compostos com diferentes propriedades bioquímicas (GUTIERREZ et al., 2008), o que se buscou no presente estudo, fazendo a extração destes compostos fenólicos da FCJ de quatro formas diferentes.

Segundo Guedes et al. (2009), em seu estudo sobre atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L., o extrato aquoso forneceu maior concentração de sólidos em relação ao extrato etanólico 70%, o que foi atribuído parcialmente à pouca seletividade da água, que pode ter sido a responsável pela extração de substâncias indesejáveis como sais inorgânicos e impurezas orgânicas. Por essas razões, a água é raramente empregada para a extração de constituintes ativos a partir de fontes vegetais. O extrato etanólico à 70%, permitiu a obtenção de um extrato com maior concentração de polifenóis totais e flavonoides totais. No presente trabalho houve maior ação bactericida dos demais extratos em relação ao aquoso (cujo rendimento de extração em peso, foi maior, provavelmente devido a maior extração de sais inorgânicos e outras substâncias), indicando, possivelmente, que um ou mais compostos fenólicos presentes em maiores concentrações, podem levar a maior ação bactericida.

Observou-se no presente trabalho, que o extrato etanólico foi o que apresentou maior potencial de inibição bacteriana (Tabela 4) e os maiores teores de compostos fenólicos (Tabela 5), seguido pelo extrato acetônico que apresentou atividade bactericida moderada, porém, o menor teor de compostos fenólicos. O extrato metanólico apresentou menor ação bactericida comparado ao acetônico e a segunda maior concentração de compostos fenólicos, já o extrato aquoso apresentou maior teor de compostos fenólicos frente ao extrato acetônico, porém, sem ação bactericida.

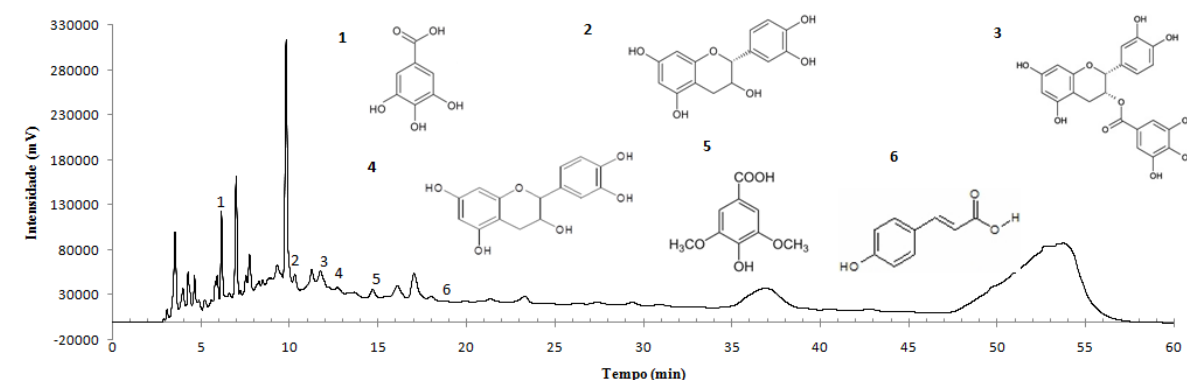
Todavia, baseado na composição de fenólicos, observou-se que os extratos etanólico e o acetônico, com maior atividade antimicrobiana, apresentaram teor mais elevado de epicatequina (Tabela 5), podendo ser esta uma das explicações desse potencial antimicrobiano. Além disso, foi possível constatar que o extrato etanólico foi o que apresentou a maior variedade e teor mais elevado de compostos fenólicos, nos quais os taninos catequina e galato de epicatequina foram os majoritários, sendo bem superiores aos demais extratos, podendo ser outra explicação de sua maior ação bactericida.

Melo (2011), ao analisar os cromatogramas de extratos etanólico e aquoso, notou também que em todos os resíduos derivados de uva, houve picos proeminentes do flavonoide epicatequina, sugerindo que este composto participa de forma determinante na expressão da atividade, tanto na ação antimicrobiana como antioxidante destas amostras, o que corrobora com a resposta antimicrobiana no presente trabalho e a forma como os extratos agiram sobre as bactérias testadas, uma vez que, segundo Burt (2004), a epicatequina pode atuar na desintegração da membrana plasmática (Tabela 1).

### 4.3 Determinação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos por HPLC

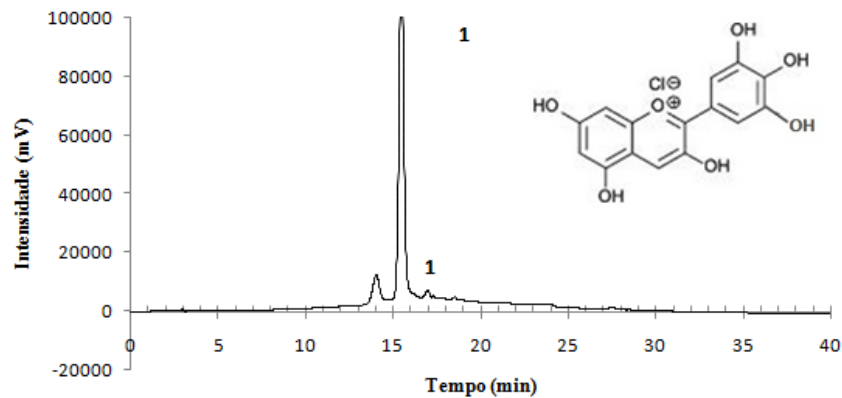
Muitos pesquisadores atribuem a ação antimicrobiana de extratos de origem vegetal aos compostos fenólicos (AL-HABIB et al., 2010; CABRAL et al., 2009; KUMAR et al., 2011; MARTINS, 2011). Por isso, determinaram-se os compostos fenólicos nos extratos aquoso, metanólico, etanólico e acetônico, obtidos da FCJ por HPLC, cujos resultados estão apresentados nas Figuras 5 a 12 (perfil cromatográfico) e Tabela 5 (teor de compostos fenólicos).

Figura 5 – Cromatograma de compostos fenólicos do extrato aquoso de farinha de casca de jabuticaba.



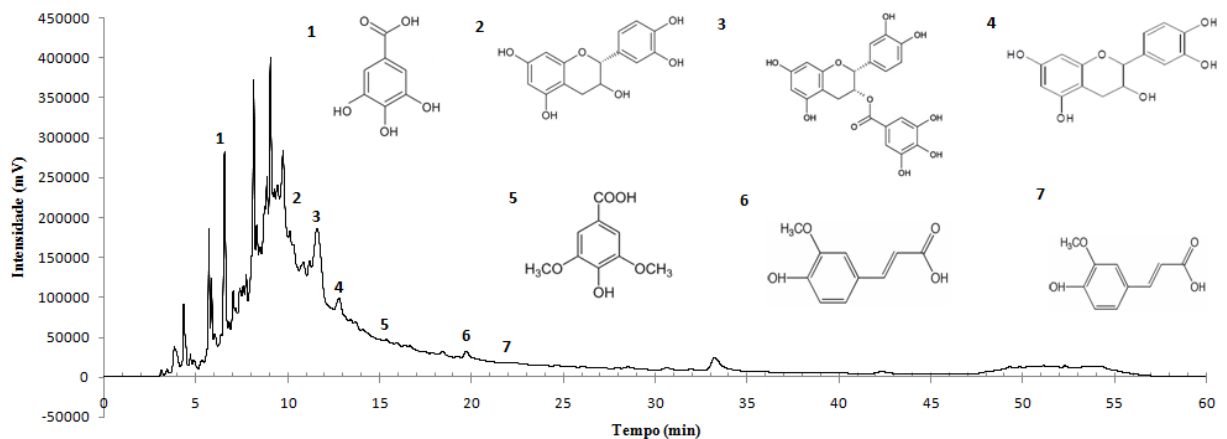
Identificação dos picos: 1 - ácido gálico (tempo = 6,541); 2 - catequina (tempo = 10,419); 3 - galato de epicatequina (tempo = 12,154); 4 - epicatequina (tempo = 13,750); 5 - ácido siríngico (tempo = 15,034); 6 - ácido p-cumárico (tempo = 16,048).

Figura 6 – Cromatograma de antocianinas do extrato aquoso de farinha de casca de jabuticaba.



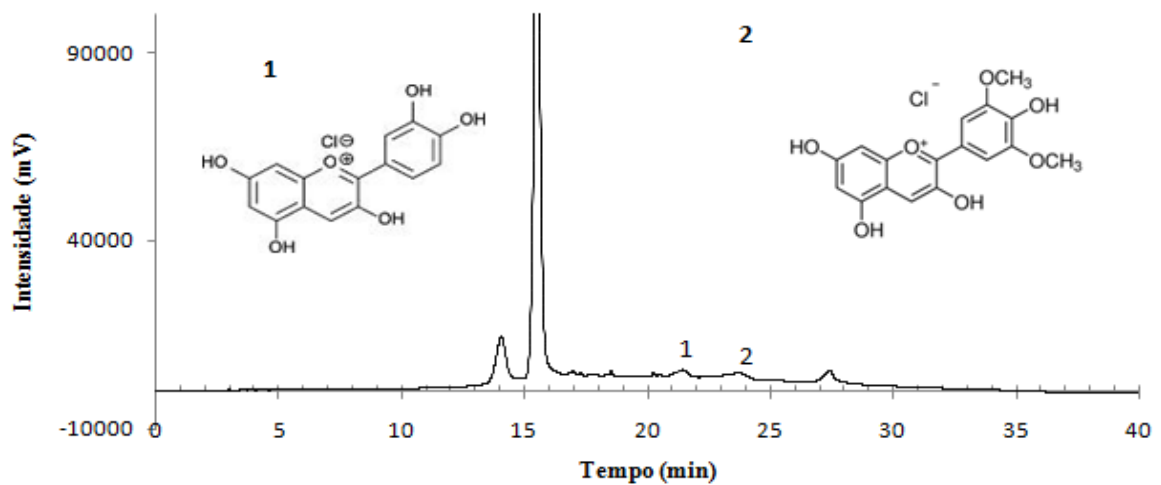
Identificação do pico: 1 – cloreto de delphinidina (tempo = 17,345).

Figura 7 – Cromatograma de compostos fenólicos do extrato metanólico de farinha de casca de jabuticaba.



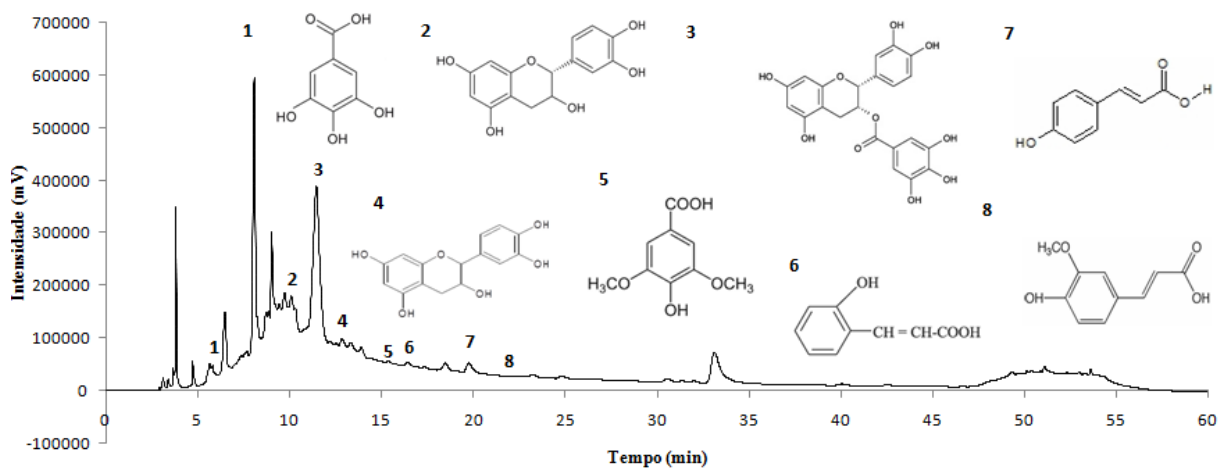
Identificação dos picos: 1 - ácido gálico (tempo = 6,541); 2 - catequina (tempo = 10,419); 3 - galato de epicatequina (tempo = 12,154); 4 - epicatequina (tempo = 13,750); 5 - ácido sirínico (tempo = 15,034); 6 - ácido p-cumárico (tempo = 19,889); 7 - ácido ferúlico (tempo = 22,609).

Figura 8 – Cromatograma de antocianinas do extrato metanólico de farinha de casca de jabuticaba.



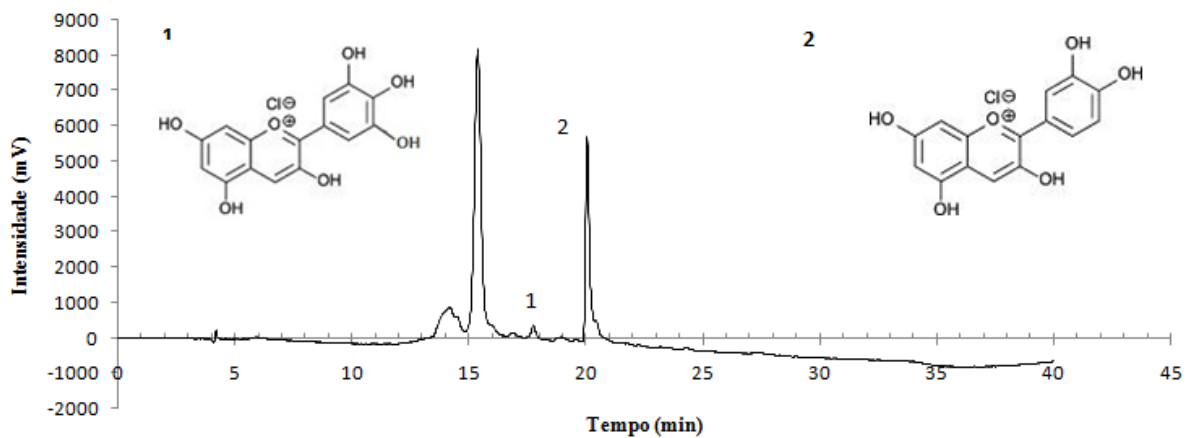
Identificação dos picos: 1 – cloreto de cianidina (tempo = 21,318); 2 – cloreto de malvidina (tempo = 24,344).

Figura 9 – Cromatograma de compostos fenólicos do extrato etanólico de farinha de casca de jabuticaba.



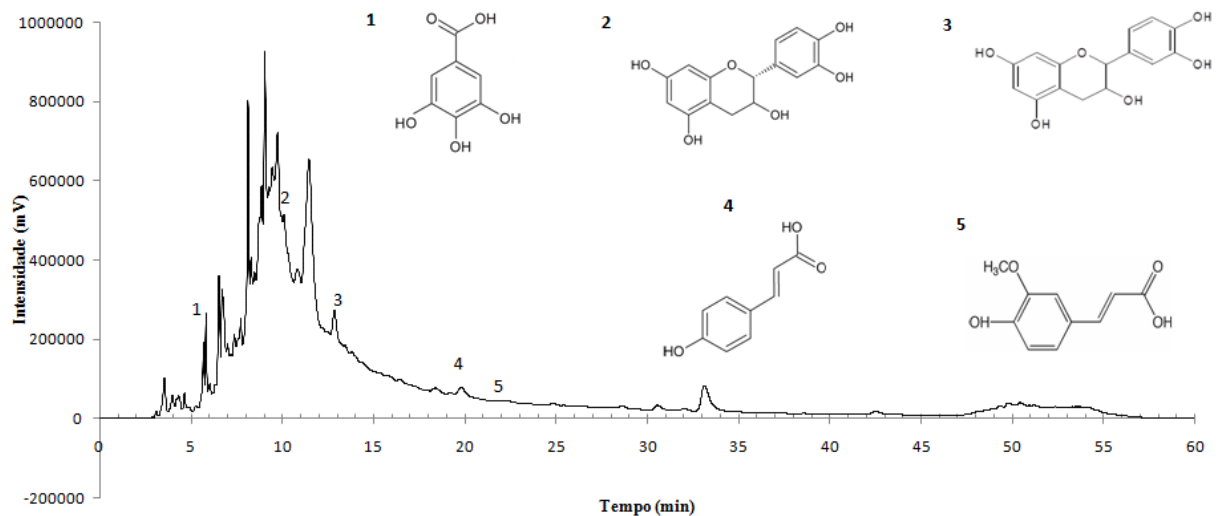
Identificação dos picos: 1 - ácido gálico (tempo = 6,541); 2 - catequina (tempo = 10,419); 3 - galato de epicatequina (tempo = 12,154); 4 - epicatequina (tempo = 13,750); 5 - ácido siríngico (tempo = 15,034); 6 - ácido o-cumárico (tempo = 16,048); 7 - ácido p-cumárico (tempo = 19,889); 8 - ácido ferúlico (tempo = 22,609).

Figura 10 – Cromatograma de antocianinas do extrato etanólico de farinha de casca de jabuticaba.



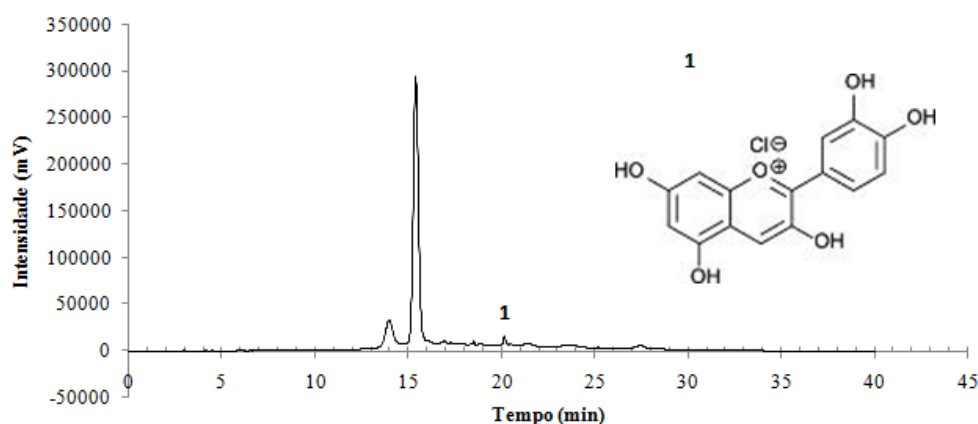
Identificação dos picos: 1 – cloreto de delphinidina (tempo = 17,345); 2 – cloreto de cianidina (tempo = 21,318).

Figura 11 – Cromatograma de compostos fenólicos do extrato acetônico de farinha de casca de jabuticaba.



Identificação dos picos: 1 – ácido gálico (tempo = 6,541); 2 - catequina (tempo = 10,419); 3 - epicatequina (tempo = 13,750); 4 - ácido p-cumárico (tempo = 19, 889); 5 - ácido ferúlico (tempo = 22, 609).

Figura 12 – Cromatograma de antocianinas do extrato acetônico de farinha de casca de jabuticaba.



Identificação do pico: 1- cloreto de cianidina (tempo = 21,318).

Tabela 5 – Teores de compostos fenólicos, em mg 100 g<sup>-1</sup> de extrato liofilizado, em diferentes extratos obtidos de farinha de casca de jabuticaba.

| Compostos fenólicos     | Extrato aquoso | Extrato metanólico | Extrato etanólico | Extrato acetônico |
|-------------------------|----------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Ácido ferúlico          | 0,00±0,00 bD   | 0,89±0,19 aE       | 0,83±0,02aD       | 0,82 ±0,06aE      |
| Ácido gálico            | 1,89±0,07bcD   | 1,83±0,00cDE       | 2,30±0,07bD       | 2,72±0,21aD       |
| Ácido o-cumárico        | 0,00±0,00 bD   | 0,00±0,00 bE       | 1,52±0,04aD       | 0,00±0,00bE       |
| Ácido p-cumárico        | 0,67±0,04 cD   | 4,74±0,62 bD       | 8,33±0,33aD       | 1,23±0,07cDE      |
| Ácido siríngico         | 1,92±0,09 aD   | 1,58±0,08 bE       | 0,80±0,06cD       | 0,00±0,00dE       |
| Cloreto de cianidina    | 0,00±0,00 dD   | 60,09±2,3 aA       | 29,14±1,82bC      | 9,77±0,09cC       |
| Cloreto de delphinidina | 45,20±2,77 aA  | 0,00±0,00 cE       | 35,89±0,81 bD     | 0,00±0,00cE       |
| Cloreto de malvidina    | 0,00±0,00bD    | 39,52±1,74aB       | 0,00±0,00 bE      | 0,00±0,00bE       |
| Catequina               | 10,54±0,06dC   | 58,33±1,66bA       | 117,5±8,83 aA     | 42,01±1,62cA      |
| Epicatequina            | 8,24±0,23 bC   | 10,98±0,94bC       | 33,38±3,94aC      | 35,87±0,55aB      |
| Galato de epicatequina  | 28,57±0,07bB   | 1,09±0,20 cE       | 84,50±5,44aB      | 0,00±0,00cE       |
| Total                   | 97,00          | 180,26             | 314,3             | 92,42             |
| CV(%)                   | 10,52          | 6,77               | 13,82             | 6,44              |

Dados são média de três repetições ± desvio padrão. Letra minúscula na linha compara entre os extratos fenólicos, letra maiúscula na coluna compara entre os compostos fenólicos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O extrato etanólico apresentou os níveis mais elevados de compostos fenólicos totais (Figuras 9 e 10, Tabela 5) seguido pelo metanólico (Figuras 7 e 8, Tabela 5), aquoso (Figuras 5 e 6, Tabela 5) e acetônico (Figuras 11 e 12, Tabela 5). Observou-se que a composição de compostos fenólicos foi diferente para os extratos. Não detectou-se no extrato etanólico, o cloreto de malvidina, enquanto no metanólico, não se detectaram o ácido o-cumárico e cloreto de delphinidina. Já para o extrato aquoso, não foram detectados o ácido ferúlico, ácido o-cumárico, cloreto de cianidina, cloreto de malvidina; e para o extrato acetônico, ácido o-



cumárico, ácido siríngico, cloreto de delphinidina, cloreto de malvidina e galato de epicatequina não foram detectados. O ácido o-cumárico foi registrado apenas no extrato etanólico e cloreto de malvidina apenas no extrato metanólico.

O extrato acetônico apresentou níveis mais elevados de ácido ferúlico (que não diferiu significativamente do extrato etanólico e metanólico) e epicatequina. O extrato aquoso apresentou os níveis mais elevados de cloreto de delphinidina; o etanólico de catequina, epicatequina (que não foi significativamente diferente do extrato acetônico) e galato de epicatequina e o metanólico, de cloreto de cianidina e cloreto de malvidina. Portanto, o extrato etanólico acarretou maior extração dos compostos fenólicos, com níveis de alguns fenólicos muito superiores ao dos demais extratos, apesar do rendimento em peso seco ser o menor, como mencionado anteriormente.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com o de Melo (2011), que em seu estudo sobre composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais, observou que o extrato etanólico foi, para todos os resíduos testados, o mais eficaz na extração de compostos fenólicos comparado ao extrato aquoso. Segundo Lafka, Sinanoglou e Lazos (2007), a mistura etanol:água (1:1), entre os solventes testados (metanol, etanol, acetona, isopropanol e acetato de etila), também apresentou os maiores teores de compostos fenólicos para o bagaço de uva.

A diferença entre o teor de compostos fenólicos registrados para cada extrato está relacionada a diversos fatores como a polaridade diferenciada de cada solvente que é um dos fatores bastante importante, mas também se tem a influência da temperatura e tempo de extração, e ainda, se com agitação ou não. Inúmeros são os compostos fenólicos com diferentes níveis de complexidade em sua estrutura, o que leva a uma variação de sensibilidade deles às condições de extração; assim, o rendimento e a composição dos extratos dependem também das condições utilizadas na extração (KABIR et al., 2015).

Existem vários estudos em busca de um método único que obtenha um melhor rendimento de compostos fenólicos, porém, isto não tem sido fácil de se conseguir, devido à grande quantidade destes compostos fenólicos e as várias técnicas empregadas. Deng et al. (2014) observaram que a solução de acetona 70% e metanol extraiu mais compostos fenólicos das folhas de mirtilo do que o etanol a 95%. Já Tomsone et al. (2012) verificaram que a extração de compostos fenólicos de rábano (*Armoracia rusticana*) foi maior com etanol a 95% seguido por acetona 100%. Zhao e Hall (2008) avaliaram extratos de uvas passa, obtidos com diferentes solventes e verificaram que compostos fenólicos foram melhor extraídos com etanol,

ao contrário de Rusak et al. (2008) que obtiveram os maiores teores desses compostos em extratos aquosos de chá verde.

Lage et al. (2014) identificaram no extrato metanólico de FCJ, genótipo Sabará, em ordem crescente de concentração os seguintes compostos: epicatequina, ácido salicílico, ácido elágico, ácido gálico e galocatequina. Já Alves et al. (2014a) identificaram no extrato acetônico da FCJ do mesmo genótipo e mesma condições de extração do presente trabalho, os seguintes compostos fenólicos, em mg 100 g<sup>-1</sup> de extrato liofilizado: galocatequina (27,20), ácido elágico (35,44), catequina (50,46), ácido gálico (52,00), ácido salicílico (133,44) e epicatequina (145,47). Entretanto, Alves et al. (2014a) e Lage et al. (2014) não utilizaram os padrões cloretos de delphinidina, de cianidina e malvidina. Os teores de fenólicos deste trabalho são diferentes dos registrados por estes autores, sendo esta diferença provavelmente, devido à época de colheita e condições ambientais, além dos padrões utilizados na identificação.

Portanto, observou-se que o tipo e a concentração dos compostos fenólicos dependem do tipo de material, condições ambientais, pós-colheita, processamento e métodos de extração (GURJAR et al., 2012; MOULEHI et al., 2012), tornando assim, difícil encontrar um método único para extração desses compostos.

#### **4.4 Ensaio com animais**

O procedimento cirúrgico para se fazer as feridas nos animais e o tratamento pós-operatório transcorreram sem complicações. Todos os animais recuperaram-se bem da anestesia, demonstrando bom estado geral e atividades física e comportamental normais para a espécie. O extrato etanólico foi o selecionado para o tratamento das feridas por ter apresentado maior ação bactericida in vitro que os demais extratos.

Todos os animais foram submetidos a avaliações macroscópicas diárias e não apresentaram sinais que evidenciassem infecção secundária durante o experimento, não houve colonização bacteriana e também não houve sangramento, a não ser no dia da lesão. Não se observou exsudato purulento em nenhuma das feridas, mas constatou-se exsudação serosa nos animais do grupo controle positivo até o dia 10, e no grupo tratado com extrato etanólico 5% até o dia 5.

As feridas foram feitas com todos os processos e requisitos normais de assepsia e nenhum grupo acusou presença de infecção. Segundo Cavalcanti Neto et al. (2005), quando não há ocorrência de contaminação bacteriana, o processo cicatricial se dá de forma acelerada,

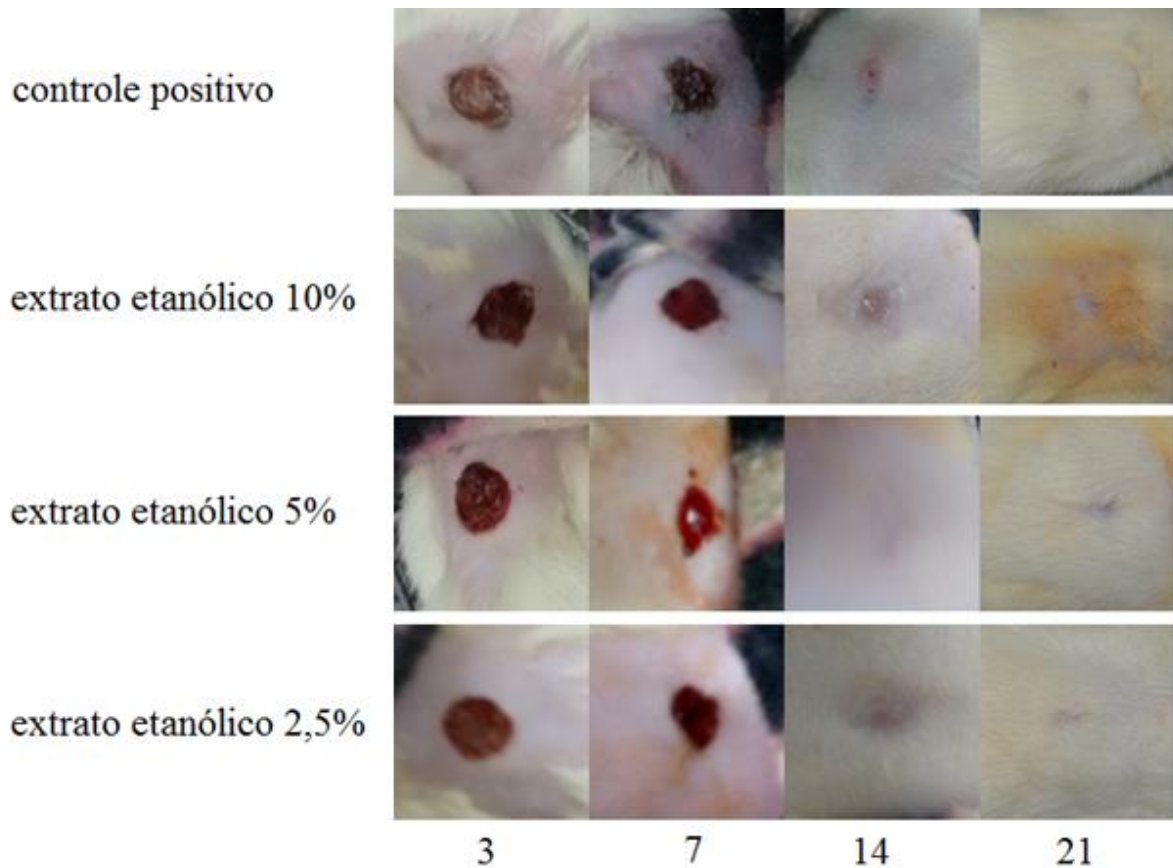
isso possivelmente explica a cicatrização a partir do dia 16 para todos os grupos no presente trabalho, incluindo o controle positivo; para todos os grupos a cicatrização se deu de forma habitual, respeitando todos os eventos comuns à mesma: hemostasia; fase inflamatória; formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares); e remodelação (KUMAR et al., 2010).

Uma explicação para o ocorrido está no fato de o controle positivo ser um antisséptico conhecido e amplamente utilizado para o tratamento de feridas; quanto aos três grupos que receberam o extrato etanólico, em diferentes concentrações, está no fato do mesmo possuir ação bactericida de amplo espectro, confirmada no presente trabalho.

Na Figura 13 estão apresentadas as fotos das feridas, nos dias das medições. Observou-se que as crostas começaram a se formar no dia 3 pós-operatório para o controle positivo e extratos etanólicos a 10% e 5%, porém, para o controle positivo elas eram espessas e ressecadas com presença de exsudação no centro da ferida; para o grupo tratado com extrato etanólico 10%, as crostas apresentaram-se mais delgadas e umedecidas; enquanto para o grupo tratado com extrato etanólico 5%, as crostas eram menos espessas que o grupo controle, porém, mais espessas que o grupo tratado com extrato a 10%, com um pouco de exsudação serosa. No grupo tratado com extrato etanólico 2,5%, as crostas começaram a aparecer no dia 5 e eram bem finas.

Observou-se para os três grupos tratados com extrato, que a partir do dia 5, as crostas que se formaram estavam niveladas com a pele e sem evidências de inflamação, mantendo-se com esta aparência durante todo o período de tratamento. Já as crostas espessas e ressecadas do grupo controle positivo se desprenderam somente no dia 10, quando houve maior sinal de epitelização da ferida e as crostas do grupo tratado com extrato etanólico 5% se desprenderam no dia 5, havendo grande evolução na redução da ferida. Para os grupos tratados com extrato etanólico, a epitelização ocorreu de modo uniforme, um pouco mais acelerado nos grupos tratados com extrato a 2,5% e 5%, comparado ao tratado com 10%, sendo possível, no decorrer do tempo, perceber a formação de pequeno halo em torno da ferida, indicando a redução da extensão do ferimento.

Figura 13 - Fotos das feridas nos dias 3, 7, 14 e 21 pós-operatório para o controle positivo e extrato etanólico, em diferentes concentrações.



Observou-se também que houve inflamação intensa no grupo controle positivo, intermediária no grupo tratado com extrato etanólico a 5%, e branda nos grupos tratados com extrato etanólico 10% e 2,5%. O processo inflamatório promove a exsudação de células leucocitárias que fagocitam e destroem agentes lesivos, restos celulares e tecido necrótico, sendo, portanto, necessário para a boa resposta da reparação tecidual. Entretanto, reação inflamatória intensa, como observado no controle positivo, pode prejudicar o processo de reparo por promover edema, quantidade excessiva de exsudato, os quais favorecem o crescimento bacteriano e conseqüentemente, a inibição da proliferação de fibroblastos e da deposição de colágeno (BATISTA et al., 2012).

Vários estudos apresentaram resultados similares ao presente trabalho, no qual se observou a formação de crostas nas feridas (BEHEREGARAY et al., 2010; VIEIRA et al., 2008). Salgado et al. (2007) relataram que a retirada das crostas é fundamental para uma boa cicatrização, tendo como objetivo estimular a capacidade contrátil dos miofibroblastos e evitar a contratura com deformidade da cicatriz. A presença da crosta pode atrasar o processo

cicatricial, evitando a contração da ferida, além de não possibilitar umedecimento e oxigenação suficientes para que as células migratórias promovam a retirada dos detritos celulares.

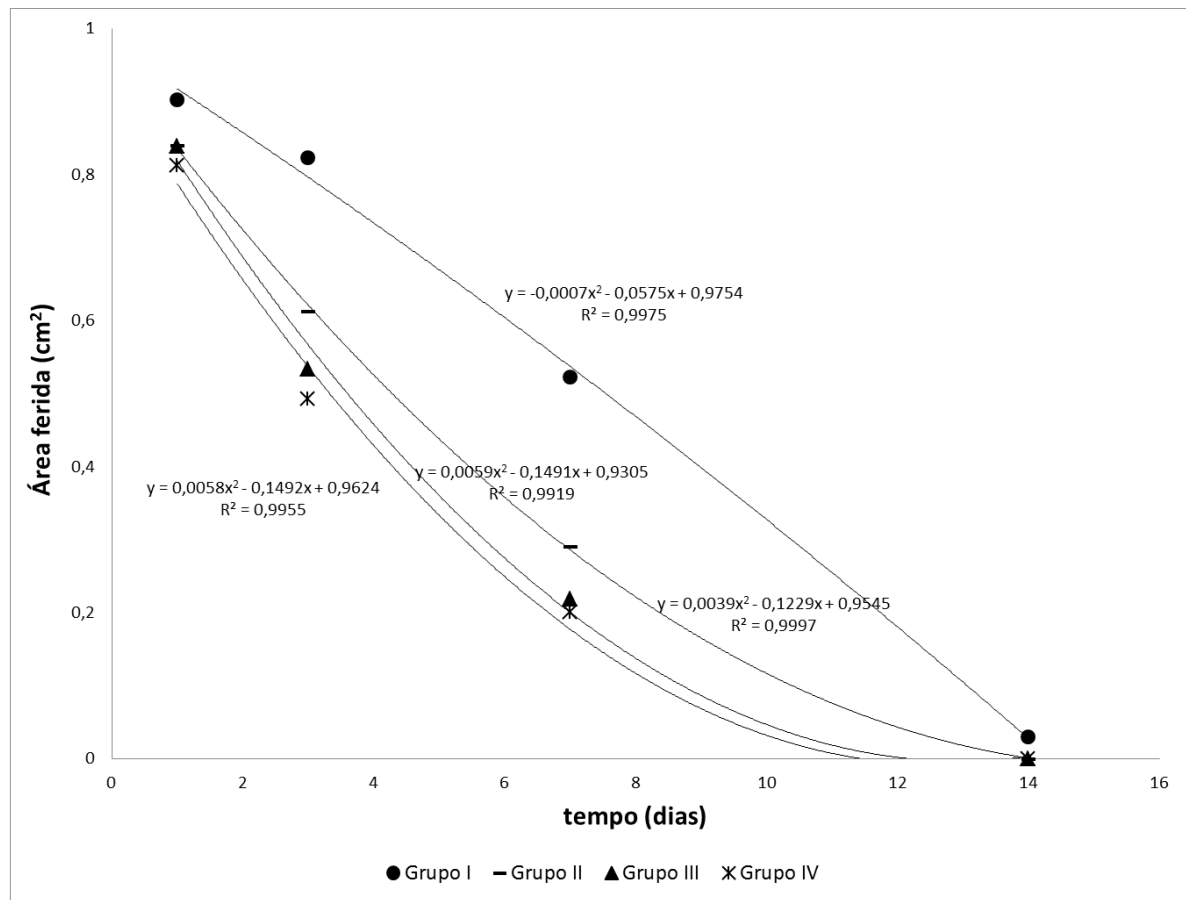
Como o objetivo no presente trabalho era observar a cicatrização apenas com a aplicação dos produtos, as crostas não foram removidas manualmente, o que explica o retardo inicial da cicatrização, principalmente, do grupo controle positivo, uma vez que as crostas espessas e ressecadas deste grupo não mantiveram a umidade necessária no leito da ferida e nem uma contratura eficaz. Quando as crostas caíram ocorreram eventos celulares normais, promovendo assim, a rápida cicatrização das feridas (KUMAR et al., 2010).

De acordo com D'Acampora et al. (2007), a formação de crostas, possivelmente compostas de detritos celulares, favorece o processo de reparação e o exsudato promove sua desagregação e o desenvolvimento de microrganismos. Comparando-se os grupos, controle positivo e extrato 5%, que apresentaram crostas mais espessas, isso explica o retardo na taxa de contração da ferida do grupo controle positivo devido à demora no desprendimento da crosta (no dia 10) e pelo fato de estar mais espessa e ressecada, já para o grupo tratado com extrato etanólico 5% estas crostas se desprenderam muito antes (no dia 5), o que pode ter acelerado a ação de contratura deste grupo desenvolvida pelos miofibroblastos.

Com essas observações, constatou-se que a cicatrização foi mais eficaz no grupo tratado com o extrato etanólico a 5%, devido aos seguintes aspectos: desprendimento mais rápido da crosta, sendo o processo de reepitelização mais eficiente, e para o grupo tratado com extrato etanólico a 2,5% devido a este grupo apresentar crostas finas e niveladas com a pele, com pouca evidência de inflamação, permitindo uma contratura acelerada desenvolvida pelos miofibroblastos. Isso se nota pelas diferenças macroscópicas da presença do tecido cicatricial e contração da ferida. No dia 14 foi verificada cicatrização completa das feridas para a maioria dos animais, sendo essa taxa maior para os grupos tratados com o extrato etanólico. No dia 16 de tratamento, observou-se a cicatrização completa das feridas e crescimento de pelos em torno da ferida para os animais de todos os grupos.

A análise de variância das áreas das feridas foi significativa para a interação tratamento x tempo (Tabela 5A, Apêndice) e na Figura 14, está apresentada a curva de regressão dessas áreas. Observou-se que ocorreu diminuição da área das feridas, ao longo do tempo, para os quatro grupos, entretanto, a cicatrização ocorreu de forma mais lenta para o grupo controle e entre os grupos tratados com extrato etanólico a cicatrização foi mais rápida na seguinte ordem: grupo tratado com 2,5% > 5% > 10%, confirmando a análise visual.

Figura 14 – Curva de regressão da área das feridas nos dias das medições para cada grupo de animais.



Grupo I – controle positivo, tratado com Bactrovet®, contendo 0,580 mg de sulfadiazina de prata mL<sup>-1</sup>; grupo II - tratado com solução aquosa do extrato etanólico liofilizado da farinha de casca de jabuticaba (EE) a 10%, contendo 0,300 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup>; grupo III - tratado com solução aquosa do EE a 5%, contendo 0,150 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup> e o grupo IV - tratado com solução aquosa do EE a 2,5%, contendo 0,075 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup>.

No dia 3 pós-operatório, o controle positivo apresentou contração de  $8,59 \pm 3,37\%$ , enquanto os grupos tratados com extrato etanólico 10%, 5% e 2,5% apresentaram  $26,74 \pm 7,72\%$ ;  $35,47 \pm 13,10\%$  e  $39,03 \pm 5,98\%$  de contração, respectivamente, em relação ao dia 1, portanto, a contração das feridas foi muito menor no grupo controle. No dia 7 pós-operatório, houve contração de  $42,64 \pm 11,49\%$ ;  $64,96 \pm 10,25\%$ ;  $73,28 \pm 8,84\%$  e  $75,01 \pm 8,81\%$  para os grupos controle, extratos etanólicos 10%, 5% e 2,5%, respectivamente. As mensurações das feridas foram realizadas até o dia 14 pós-operatório, pois, após este dia, as feridas encontravam-se cicatrizadas, com fechamento total dos bordos (Figura 13).

Resultado semelhante também foi obtido por Parente et al. (2009), quando mensuraram a área de feridas cutâneas de ratos tratados com extrato etanólico de *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil, em que as crostas começaram a se formar também no dia 3, tanto para o grupo tratado como para o grupo controle, sendo mais delgadas e umedecidas no grupo tratado e mais espessas e ressecadas no grupo controle, assim como no presente trabalho. No dia 7 pós-operatório, nos dois grupos, as crostas se desprenderam, o que no presente estudo aconteceu no dia 5 para o extrato etanólico 5% e no dia 10 para o controle positivo. No dia 14 pós-operatório foi verificada cicatrização completa das feridas em ambos os grupos, o que no presente trabalho pode ser observado no dia 16 pós-operatório.

Esses resultados corroboram os obtidos por Andrade (2006), que tratando feridas em caprinos com extrato de *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze, registraram maior contração das feridas do grupo tratado com extratos que no grupo controle, em torno de 90% e 80,78%, respectivamente. Já Estevão et al. (2008), tratando feridas de ratos com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), encontraram contração no dia 14 pós-operatório de 95,42% para o grupo tratado e observaram maior contração entre os dias 7 e 14 pós-operatório; fato que no presente trabalho, pode ser observado entre os dias 3 e 7 pós-operatório; sendo que no dia 14, a maioria das feridas já se encontravam cicatrizadas.

Garros et al. (2006) constataram em relação à área da ferida decréscimo significativo ao longo do tempo, acentuadamente entre os dias 7 e 14 pós-operatório tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado com *Passiflora edulis*, não havendo diferença significativa em todo o período de observação. Para Oliveira et al. (2010), isto se justifica pelo fato desse período corresponder à fase de fibroplasia da cicatrização, com presença dos fibroblastos e miofibroblastos, podendo variar de um tratamento para o outro.

A sulfadiazina de prata é um agente anti-infeccioso comumente utilizado para controlar a proliferação bacteriana e a infecção da ferida. Embora, indicado para lesões profundas de espessura parcial e de espessura total e sugerido como eficaz na redução de fases inflamatórias e de granulação de cicatrização em incisões suturadas, ela tem sido descrita como tendo efeitos citotóxicos em fibroblastos e queratinócitos in vitro e retarda a cicatrização de feridas in vivo. Uma possível explicação para este problema pode estar na debilidade da sulfadiazina de prata em distinguir entre células saudáveis envolvidas no processo de cicatrização e microorganismos, o que pode levar a destruição de tecido e consequente retardo na cicatrização (POON et al., 2004; TARAMESHLOO et al., 2012).

Apesar disso, a sulfadiazina de prata é o agente tópico mais utilizado no tratamento de feridas (ATIYEH et al., 2007; MOONEY et al., 2006).

No presente trabalho, utilizou-se como controle positivo o Bactrovet®, que contém a sulfadiazina de prata na concentração de  $0,580 \text{ mg mL}^{-1}$  e para o extrato etanólico 10%, 5% e 2,5% as concentrações de compostos fenólicos foram de  $0,300 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,150 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente, o que demonstrou mais uma vez a alta eficiência do extrato etanólico como bactericida e possível antisséptico a ser utilizado, pois em concentrações muito menores mostraram-se mais eficientes que a sulfadiazina, que é um cicatrizante bastante utilizado e difundido.

Segundo Ayres et al. (2008) e Silveira et al. (2012), valores de CMB inferiores a  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  representam uma boa atividade antimicrobiana; valores situados entre  $0,1$  e  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  indicam atividade moderada; e valores entre  $0,5$  e  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  equivalem a uma fraca atividade antimicrobiana. Considerando-se essa classificação, o extrato etanólico de FCJ, nos ensaios de microdiluição, apresentou uma boa atividade contra todas as bactérias testadas e de amplo espectro, uma vez que foi eficaz tanto para Gram positiva quanto para Gram negativa, uma vez que o mesmo foi bactericida até a concentração de  $0,038 \text{ mg mL}^{-1}$  de compostos fenólicos.

Corroborando com nosso trabalho, Tarameshloo et al. (2012) demonstraram que a *Aloe vera* utilizada em feridas suturadas em ratos apresentou efeitos mais significativos que a sulfadiazina de prata, na cicatrização das feridas. Os achados indicaram que a aplicação desta não teve efeito positivo sobre a reepitelização de incisões suturadas comparada a *Aloe vera* que é um produto natural, assim como o extrato etanólico da FCJ se mostrou mais eficaz na cicatrização.

Valente (2014) também tratando feridas de ratos com extrato de própolis, extrato de calêndula, vaselina, ácidos graxos essenciais, solução fisiológica 0,9%, sulfadiazina de prata e sem tratamento, observou que a sulfadiazina apresentou a menor taxa de contração, com exceção do sem tratamento, o que está de acordo com o presente trabalho no qual se pode observar a contratura mais rápida da ferida apenas após as crostas terem se desprendido no grupo controle.

A cicatrização é um processo complexo e dinâmico de restabelecimento das estruturas celulares e, conseqüentemente, das camadas do tecido epitelial. Este processo é realizado a fim de estabelecer uma reepitelização mais próxima do seu estado normal (KUMAR et al., 2010).

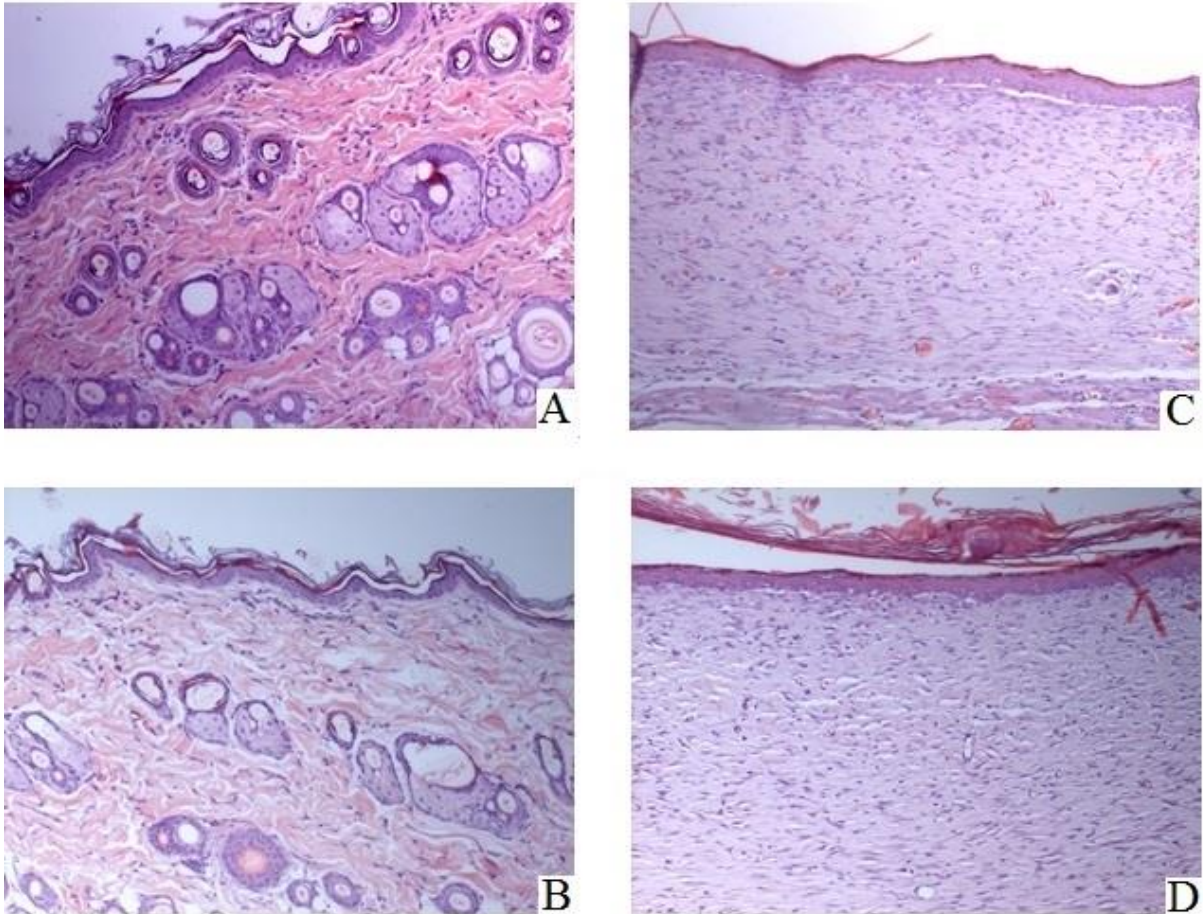


Como as análises deste estudo foram feitas por fotogrametria, ou seja, análise macroscópica, não foi possível analisar os tecidos biológicos microscopicamente entre os dias das medições dos halos das feridas para melhor detalhamento da cicatrização. Esta medida microscópica foi feita apenas no dia 21, dia programado para eutanásia e análise histológica destes animais, todavia, neste tempo, as feridas de todos os animais já se encontravam cicatrizadas.

No dia 21 pós-operatório, tanto o grupo controle quanto dos extratos etanólicos se apresentavam com lesões totalmente epitelizadas (Figura 15), com cicatrização completa, epiderme com espessura e constituição equivalentes às áreas adjacentes. Derme com proliferação de tecido conjuntivo colagenizado, com fibroblastos orientados paralelamente à superfície epidérmica. Anexos cutâneos (folículos pilosos e glândulas sebáceas) e tecido adiposo ausentes, em acordo com uma região lesionada.

Nesta fase ocorre a epitelização da lesão, que é controlada por complexo glicoproteico denominado chalona, e que estimula a atividade mitótica epitelial. Isto pode ser observado em outros trabalhos, em que no dia 21 de tratamento, as feridas se encontravam cicatrizadas e também não encontraram diferenças entre os epitélios das lesões do grupo controle e dos grupos tratados (GARROS et al., 2006; PARENTE et al., 2009).

Figura 15 – Exemplo do aspecto histológico das feridas no dia 21 pós-operatório dos grupos controle, extrato etanólico 10%, extrato etanólico 5% e extrato etanólico 2,5%.



Imagens A e B: Tecido adjacente a ferida mostrando epitélio com espessura equivalente ao da região da lesão e presença de anexos cutâneos (folículos pilosos e glândulas sebáceas) e tecido adiposo, que não são observados no tecido lesado; Imagens C e D: lesões totalmente epitelizadas, com cicatrização completa, derme com proliferação de tecido conjuntivo colagenizado, com fibroblastos orientados paralelamente à superfície epidérmica.

## 5 CONCLUSÃO

Os extratos etanólico, acetônico e metanólico da farinha de casca de jaboticaba (FCJ) apresentaram atividade bactericida, entretanto, o extrato etanólico foi o de maior atividade, tanto para bactérias Gram positivas como para Gram negativas. Este potencial pode ser atribuído às substâncias presentes nos extratos, como os compostos fenólicos, sobretudo, os taninos catequina, epicatequina e galato de epicatequina, que são majoritários no extrato etanólico.

Quanto a análise do processo de cicatrização do ponto de vista clínico e macroscópico, conclui-se que o uso do extrato etanólico liofilizado de FCJ, principalmente, nas concentrações de 5% (contendo 0,150 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup> e 2,5% (contendo 0,075 mg de compostos fenólicos mL<sup>-1</sup>) apresentam influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, por promover reação inflamatória menos intensa e fechamento mais rápido das feridas, com potencial de ser explorado pela indústria farmacêutica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T. et al. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food Agriculture**, Oxford, v. 92, p. 1679–1687, 2012.
- AFONSO, C. et al. **Prevenção e tratamento de feridas: da evidência à prática**. Portugal: [s.n.], 2014. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Prevencao\_Trat\_Feridas-Da\_Evidencia\_A\_Pratica.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.)Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) o. Berg. **Food Research International**, Barking, v. 54, n. 1, p. 468-477, Nov. 2013.
- AL-HABIB, A. et al. Bactericidal effects of grape seed extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of Toxicological Sciences**, Sapporo, v. 35, n. 3, p. 357-364, Jun. 2010.
- ALVES, A. P. de C. et al. Influence of drying temperature on the chemical constituents of jaboticaba (*Plinia Jaboticaba* (Vell.) Berg) skin. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 36, n. 4, p. 721-726, 2014a.
- ALVES, A. P. de C. et al. Physicochemical properties of jaboticaba skin flour stored at room temperature. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 32, n. 2, p. 271-280, jul./dez. 2014b.
- ALVES, A. P. de C. et al. Toxicity of the phenolic extract from jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) fruit skins on *Spodoptera frugiperda*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 74, n. 2, p. 200-204, Apr./June, 2014c.
- ANDRADE, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 231-235, abr./jun. 2007.
- ANDRADE, L. S. S. **Avaliação terapêutica das pomadas do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. e do extrato de *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em caprinos (*Capra hircus* L.) Aspectos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos**, 2006. 76 p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Recife, 2006.
- ANDREO, D. et al. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.
- ARBOS, K. A., et al. Antimicrobial and antioxidant activity and total phenolic content in mango peel and kernel. **Revista Ceres**, Viçosa, v.60, n. 2, p. 161-165, mar./abr. 2013.
- ASCHERI, D. P. R. et al. Caracterização da farinha de bagaço de jaboticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 897-905, out. 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18. ed. Maryland: AOAC, 2005. 1094 p.

- ATIYEH, B. S. et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. **Burns**, Guildford, v. 33, n. 2, p. 139-148, Mar. 2007.
- AURICCHIO, M. T. et al. Antimicrobial and antioxidant activities and toxicity of *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 1, p. 76-81, Jan. 2007.
- AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n.1, p. 90-97, jan./mar. 2008.
- BATISTA, J. S. et al. Antibacterial and healing activities of buriti oil *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 1, p. 136-141, dez. 2012.
- BEHEREGARAY, W. K. et al. Uso do laser ALGaNP na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 3, p. 237-243, 2010.
- BERG, O. *Myrtaceae*. In: MARTIUS, C. F. P. **Flora brasiliensis**: volume 14. São Paulo: CRIA, 1857. p. 1-655.
- BERTUCCI, A. et al. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay river. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1a, p. 20-25, jan./mar. 2009.
- BOWLER, P. G. Bacterial Growth Guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing. **Ostomy Wound Manage**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 44-53, 2003.
- BOWLER, P. G. et al. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 244-269, Apr. 2001.
- BRASIL. Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9, out. 2008.
- BRUNTON, L. L. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 2112p.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- CAVALCANTE, L. C. et al. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Periodontia**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 69-73, 2012.
- CAVALCANTI NETO, A. T. et al. Análise comparativa entre o óleo-resina de copaíba e o diglucona clorexidina no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 107-112, abr./jun. 2005.
- CITADIN, I. et al. Jabuticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 32, n. 2, p. 343-656, 2010.

- CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. CLSI document M7-A6 [ISBN 1-56238- 486-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 45-51, jan./fev. 2010.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**: volume 4. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. 450 p.
- CRAGG, G. M. et al. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, June 2013.
- D'ACAMPORA, A. J. et al. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Santa Catarina, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2007.
- DANNER, M. A. et al. Enraizamento de jaboticabeira (*Plinia trunciflora*) por mergulha aérea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p.530-532, dez. 2006.
- DECLOUR, A., Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **National Institutes of Health**. v. 1749, n. 5, p. 808-816, 2009.
- DENG, Y. et al. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. **Food Control**, Guildford, v. 38, p. 184-191, Apr. 2014.
- DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B., Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.
- ENGELS, C. et al. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 17, p. 7712-7718, Sept. 2009.
- ESTEVÃO, L. R. M. **Avaliação da contração de feridas cutâneas em ratos (*rattus norvegicus albinus*) tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*)**, 2008. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- FACCO, E. M. P. **Compostos funcionais no processamento de vinhos**. 2006. 131 p. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- FAZLI, M. et al. Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 19, n. 3, p. 387–391, May/June 2011.
- FERREIRA, D. F. **Programa SISVAR: Sistema de Análise de Variância: versão 5.6 (Build 86)**. Lavras: DEX/UFLA, 2011.
- FERREIRA, F. S. et al. Atividade Antibacteriana in vitro de extratos de *Rhizophoramangle* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 305-310, 2011.
- FORTES, G. A. C. et al. Assessment of a maturity index in jaboticaba fruit by the evaluation of phenolic compounds, essential oil components, sugar content and total acidity. **American Journal of Food Technology**, Amsterdam, v. 6, n. 11, p. 974–984, 2011.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos Secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, out./dez. 2008.

GARROS, I. C. et al. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 3, p. 55-60, 2006.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005.

GELATTI, L. C. et al. Sepsis due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 4, p. 458-460, jul./ago. 2009.

GONÇALVES, A. L. et al. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, jul./set. 2005.

GOULD, D. Effective strategies for prevention and control of Gram negative infections. **Nursing Standard**, London, v. 23, n. 48, p. 42-46, Aug. 2009.

GU, H. et al. Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2008.

GUEDES, R. C. M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 4, p. 520-524, 2009.

GUIA de feridas. Araraquara: [s.n.], 2011. Disponível em: <<http://www.uniara.com.br/arquivos/file/cursos/graduacao/farmacia/guias-de-medicamentos/guia-feridas.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

GUIMARÃES, W. et al. Antocianinas em extratos vegetais: aplicação em titulação ácido-base e identificação via cromatografia líquida/espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1673- 1679, 2012.

GÜNTER, C. I. et al. New strategies in clinical care of skin wound healing. **European Surgical Research**, Basel, v. 49, n. 1, p. 16-23, 2012.

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 1, p. 118-123, 2008.

GURJAR, M. S. et al. Efficacy of plant extracts in plant disease management. **Agricultural Sciences**, Godollo, v. 3, n. 3, p. 425-433, May 2012.

GUTIERREZ, J. et al. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 448 p.

HENDRICKSON, D. et al. Factors that affect equine wound repair. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 33–44, Apr. 2005.

HERBÁRIO. **Jaboticaba**. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/dataherb16/jaboticaba.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2015.

HOSSEINIMEHR, S. J. et al. Effect of aloe cream versus silver sulfadiazine for healing burn wounds in rats. **Acta Dermatovenerol Croat**, Zagreb, v. 18, n. 1, p. 2-7, 2010.

HSU, S. Green tea and the skin. **Journal of American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 52, n. 6, p. 1049-1059, June 2005.

HUSSEIN, A. J. et al. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. **North American Journal of Medical Sciences**, Hamilton, v. 3, n. 4, p. 193-197, Apr. 2011.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre, Artmed, 2005. 712 p.

KABIR, F.; SULTANA, M. S.; KURNIANTA, H. Polyphenolic Contents and Antioxidant Activities of Underutilized Grape (*Vitis vinifera* L.) Pomace Extracts. **Preventive Nutrition and Food Science**, Korea, v. 20, n. 3, p. 210-214, sept. 2015

KEMPFER, C. B. et al. Secretions of cultures of skin: study of prevalence and sensitivity to antimicrobial in a university hospital. **Revista Saúde**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p.57-66, jan./jun. 2010.

KIRKETERP-MØLLER, K. et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 8, p. 2717–2722, Aug. 2008.

KONG, K. F. et al. Characterization of poxB, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. **Gene**, Amsterdam, v. 358, p. 82-92, Sept. 2005.

KRISHNAN, P. The scientific study of herbal wound healing therapies: current state of play. **Current Anesthesia & Critical Care**, Amsterdam, v. 17, n. 1-2, p. 21-27, 2006.

KUMAR, K. A. et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels- utilization of fruit waste. **International Journal of Engineering Science and Technology**, Amsterdam, v. 3, n. 6, p. 5414-5421, June 2011.

KUMAR, V. et al. **ROBBINS e COTRAN – Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1504 p.

LAFKA, T. I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidante activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 3, p. 1206-1214, Feb. 2007.

LAGE, F. F. et al. Jaboticaba [*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg] skins decrease lipid peroxidation: hepatoprotective and antihyperlipidemic effects. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, n. 11, p. 1295-1302, Mar. 2014.

LEITE, A. V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 6, p. 2277–2283, Mar. 2011.



- LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, Barking, v. 49, n. 1, p. 153–160, Nov. 2012.
- LIMA, A. J. B. et al. Anthocyanins, pigment stability, and antioxidant activity in jaboticaba [*M. cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 877-887, set. 2011.
- LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química da fruta jaboticaba (*M. cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 58, n. 4, p. 416-421, Dic. 2008.
- LIMA, R. O. L. et al. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação: revisão de literatura. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 56, n. 18, p. 53-59, 2012.
- LOGUERCIO, A.P., BATTISTIN, A., VARGAS, A.C., HENZEL, A., WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.
- MAMEDE, M. E. O. et al. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.
- MARTINS, J. G. P. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva mate e resíduos agroindustriais**. 2011. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- MATTOS, J. L. R. **Frutíferas nativas do Brasil**. São Paulo: Nobel, 1983. 92 p.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.
- MCGOWAN, J. E. J. Resistance in nonfermenting Gram negative Bacteria: multidrug resistance to the maximum. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 119, Suppl. 1, p. 29-36, 2006.
- MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, abr./jun. 2008.
- MELO, P. S. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, jun. 2011.
- MENDES, L. P. M. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Perperomia pelúcida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.
- MENDONÇA, J. R. et al. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 257-262, jul. 2009.
- MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Laboratory diagnosis of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medica Laboratorial**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 399-406, dez. 2007.
- MIRGHANI, M. E. S. et al. Antibacterial activity of mango kernel extracts. **Journal of Applied Sciences**, Oxford, v. 9, n. 17, p. 3013-3019, Dec. 2009.

- MOONEY, E. K.; LIPPITT, C.; FRIEDMAN, J. Plastic surgery educational foundation DATA Committee. Silver dressings. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 1, n. 17, p. 666-669, 2006.
- MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 5, p. 565-570, Aug. 2005.
- MOULEHI, I. et al. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 74-80, Sept. 2012.
- MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. São Paulo: Elsevier, 2006. 835 p.
- NACZK, M. et al. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, Oct. 2004.
- NATHEER, S. E. et al. Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Elmsford, v. 6, n. 11, p. 783-788, Mar. 2012.
- NEWMAN, D. J. et al. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311-335, Mar. 2012.
- NOGUEIRA, R. M. B. et al. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e colagenase. **Nosso Clínico**, São Paulo, v. 8, n. 43, p. 25-28, jan./fev. 2005.
- OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 302-310, jul./set. 2010.
- OLIVEIRA, F. C. de. **Extratos de casca de jaboticaba: compostos fenólicos e atividade antibacteriana**. 2016. 55 p. Mestrado (Dissertação em Agroquímica, área de concentração em Química/ Bioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2016.
- OLIVEIRA, I. V. P. de M.; DIAS, R. V. de C. Wound healing: stages and influencing factors. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.6, n.4, p.267-271, 2012.
- OLIVEIRA, M. M. M. et al. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr./jun. 2008.
- PAGANELA, J. C. et al. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 104, n. 569-572, p. 13-18. 2009.
- PAL, A.; LABUZA, T. P.; DIEZ-GONZALEZ, F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 460- 470, May 2008.
- PANOBIANCO, M. S. et al. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. **Revista Rene**, Fortaleza, v. 11, nesp. p. 15-22, 2012.

- PARENTE, L. M. L. et al. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 383-391, 2009.
- PELLISSARI, G. P. et al. Antibacterial activity of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 20, n. 1, p. 70-74, jan./mar. 2010.
- POON, V. K. et al. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. **Burns**, Guildford, v. 30, n. 2, p. 140-147, Mar. 2004.
- PRATA, E. R. B. A. **Identificação de antocianinas e composição química de casca de diferentes variedades de café (Coffea arábica)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- PRATA, M. B. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 43-48, abr./jun. 1988.
- PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C. Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.
- RABÊLO, S. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, nesp. 1, p. 265-271, 2014.
- RAMSEY, D. T. et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 7, p. 941-949, July 1995.
- RASKIN, L. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 12, p. 522-531, Dec. 2002.
- REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 109, n. 4, p. 883-890, Aug. 2008.
- RICE, L., BONOMO, R. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. em Victor Lorian, M. D., **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 5ª ed., Nova Iorque, p. 441-476, 2005.
- RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 4, p. 357-376, June 2009.
- ROCHA JUNIOR, A. M. et al. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 150-156, jan. 2006.
- RUSAK, G. et al. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 4, p. 852-858, Oct. 2008.
- SALGADO, M. I. et al. Cicatrização conduzida em enxerto de pele parcial no tratamento de feridas. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 80-84, jan./fev. 2007.

- SANTOS, A. L. et al. Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.
- SANTOS, D. T. et al. Optimization of bioactive compounds extraction from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO<sub>2</sub>. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 398-406, July 2011.
- SANTOS, S. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de Abaremacochliocarpos (Gomes) Barneby&Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 215-219, abr./jun. 2007.
- SANTOS, S. C. et al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 124-129, jan./mar. 2010.
- SARANDY, M. M. **Avaliação do efeito cicatrizante do extrato de repolho (Brassica oleracea var. capitata) em ratos wistar**. 2007. 49 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- SASSO, S. A. Z. **Propagação vegetativa de jaboticabeira**. 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.
- SATO, A. C. K. et al. Effect of particle size on rheological properties of jaboticaba pulp. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, n. 4, p. 566-570, Apr. 2009.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 12, p. 3875-83, 1991.
- SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- SCHMID, M. W. et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 1, p. 1-18, Jan. 2005.
- SIBBALD, R. G. et al. Preparing the wound bed 2003: focus on infection and inflammation. **Ostomy Wound Manage**, King of Prussia, v. 49, n. 11, p. 23-51, Nov. 2003.
- SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu, 2010.
- SILVA, P. B. et al. Avaliação do potencial aleopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos da folhas de *Pyrostegia venusta* (KerGawl.) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 447-455, jan. 2011.
- SILVEIRA, S. M. da et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus paniculata* (eucalyptus) and *Lavandula angustifolia* (lavender). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 471-80, 2012.
- SIMÃO, A. A.; RAMOS, V. O. ; CORRÊA, A. D. ; SOUZA, R. V. ; MARCUSSI, S. . Anti-obesity Effects of the Administration of *Tournefortia paniculata* Cham Extract on Wistar Rats Subjected to a Hypercaloric Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, s. n., p. 494-503, Curitiba, 2015.

- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 519-535, 2010.
- SOBRAL, M. Alterações nomenclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). **Boletim do Museu Botânico de Curitiba**, Curitiba, n. 63, p. 1-4, 1985.
- SOUZA, A. A. et al. Determination of minimum bactericidal concentration of sixteen essential oils on enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, jan./mar. 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722016000100105](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000100105)>. Acesso em: 15 out. 2016.
- SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 308-311, Feb. 2010.
- SOUZA, E. S. et al. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. **Texto & Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 24, n. 1, p. 220-228, jan./mar. 2015.
- TACON, K. C. B. et al. Healing activity of laser InGaAlP (660nm) in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 373-378, set./out. 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.
- TARAMESHLOO, M. et al. Aloe vera gel and thyroid hormone cream may improve wound healing in Wistar rats. **Anatomy & Cell Biology**, Seoul, v. 45, n. 3, p. 170-177, Sept. 2012.
- TERCI, D. B. I. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. 2004. 224p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- TOMSONE, L.; KRUMA, Z.; GALO BURDA, R. Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from Horseradish roots (*Armoracia rusticana*). **World Academy of Science, Engineering and Technology**, Weinheim, v. 64, p. 903-908, Apr. 2012.
- TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 964 p.
- VALENTE, F. S. **Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar**. 2014. 111 p. Mestrado (Dissertação em Ciências Vetrinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- VAQUERO, M. J. R. et al. Antimicrobial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 2, p. 93-101, Feb. 2007.
- VERONESI, R. et al. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2010. 2600 p.
- VIEIRA, R. C. et al. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 8, p. 358-366, ago. 2008.
- VOLP, A. C. P. et al. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico.** 2005. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

ZANOTTO, D. L.; BELLAVER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves.** Concórdia: Embrapa, 1996. 5 p.

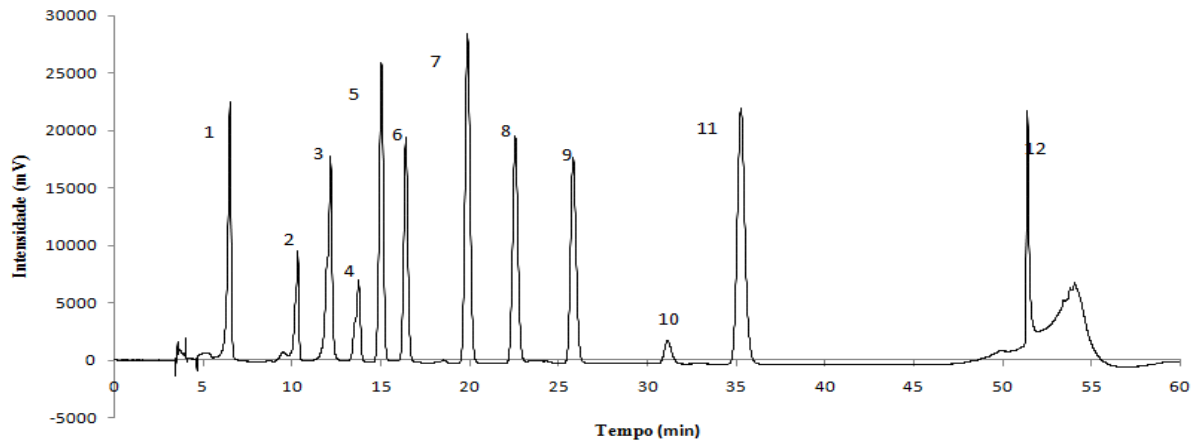
ZHAO, B.; HALL, A. C. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 2, p. 511–518, May 2008.

ZUANAZZI, J. A. S. et al. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.

**APÊNDICE**

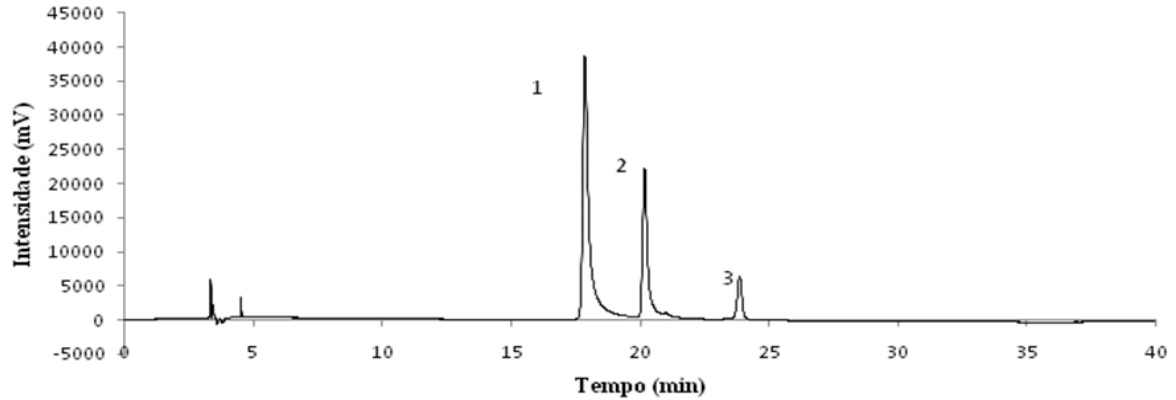
|   |    |
|---|----|
| Figura 1A - Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica.....                                  | 79 |
| Figura 2A - Cromatograma da solução de antocianinas com detecção espectrofotométrica.....   | 79 |
| Tabela 1A - Tempo de retenção médio para os compostos fenólicos analisados.....   | 80 |
| Tabela 2A - Parâmetros e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das curvas analíticas.....  | 80 |
| Tabela 3A - Resumo da análise de variância dos extratos de farinha de casca de jabuticaba para cada composto fenólico.....        | 81 |
| Tabela 4A - Resumo da análise de variância dos compostos fenólicos nos diferentes extratos de farinha de casca de jabuticaba..... | 81 |
| Tabela 5A - Resumo da análise de variância da área das feridas nos dias que foram realizadas as medições.....                     | 82 |

Figura 1A - Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica.



Concentração de cada padrão: 1) Ácido gálico; 2) Catequina; 3) Galato de epicatequina; 4) Epicatequina; 5) Ácido siríngico; 6) Ácido *o*-cumárico; 7) Ácido *p*-cumárico; 8) Ácido ferúlico; 9) Ácido vanílico; 10) Ácido salicílico; 11) Resveratrol 12) Quercetina.

Figura 2A - Cromatograma da solução de antocianinas com detecção espectrofotométrica.



Concentração de cada padrão: 1) Cloreto de delphinidina, 2) Cloreto de cianidina, 3) Cloreto de malvidina.



Tabela 1A - Tempo de retenção ( $t_R$ ) médio para os compostos fenólicos analisados.

| Composto fenólico         | $t_R$ minutos* |
|---------------------------|----------------|
| Ácido gálico              | 6,58 ± 0,01    |
| Catequina                 | 10,37 ± 0,06   |
| Galato de epicatequina    | 12,11 ± 0,02   |
| Epicatequina              | 13,96 ± 0,03   |
| Ácido siríntrico          | 15,66 ± 0,20   |
| Ácido <i>o</i> - cumárico | 16,40±0,05     |
| Cloreto de delphinidina   | 16,53 ± 0,05   |
| Ácido <i>p</i> -cumárico  | 20,18 ± 0,03   |
| Cloreto de cianidina      | 21,25 ±0,04    |
| Cloreto de malvidina      | 24,44 ± 0,03   |
| Ácido ferúlico            | 26,16 ± 0,01   |
| Ácido vanílico            | 25,83±0,02     |
| Ácido salicílico          | 32,11 ± 0,02   |
| Resveratrol               | 35,37 ± 0,03   |
| Quercetina                | 51,39 ± 0,01   |

\*Dados são média de três repetições ± desvio padrão.

Tabela 2 A - Parâmetros e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das curvas analíticas\*.

| Composto fenólico        | a        | b         | $R^2$ |
|--------------------------|----------|-----------|-------|
| Ácido gálico             | 39,329   | -165,3    | 0,997 |
| Catequina                | 10 011   | -946,1    | 0,996 |
| Galato de epicatequina   | 18121    | -3420     | 0,998 |
| Epicatequina             | 11500    | -165,0    | 0,997 |
| Ácido siríntrico         | 51597    | -2432     | 0,998 |
| Ácido <i>o</i> -cumarico | 31956    | 31932     | 0,995 |
| Cloreto de delphinidina  | 32561,91 | 92716,95  | 0,990 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 84964    | -2899     | 0,998 |
| Cloreto de cianidina     | 2201,76  | -16658,52 | 1,000 |
| Cloreto de malvidina     | 2804,57  | -2145,21  | 0,990 |
| Ácido ferúlico           | 52298    | -1130     | 0,997 |
| Ácido vanílico           | 64240    | 2294      | 0,998 |
| Ácido salicílico         | 10686    | -1738     | 0,997 |
| Resveratrol              | 73052    | -7788     | 0,998 |

\*Regressão linear:  $y = a + bx$

Tabela 3A - Resumo da análise de variância dos extratos de farinha de casca de jabuticaba para cada composto fenólico.

|          | GL | Quadrado médio                   |        |         |        |        |           |           |          |           |           |           |
|----------|----|----------------------------------|--------|---------|--------|--------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
|          |    | Compostos fenólicos <sup>a</sup> |        |         |        |        |           |           |          |           |           |           |
|          |    | A                                | B      | C       | D      | E      | F         | G         | H        | I         | J         | K         |
| Extratos | 3  | 0,52**                           | 0,54** | 37,80** | 1,73** | 2,19** | 6045,72** | 4699,37** | 632,57** | 2105,44** | 1171,57** | 1686,96** |
| Resíduo  | 8  | 0,03                             | 0,01   | 0,13    | 0,00   | 0,00   | 20,95     | 7,55      | 4,18     | 2,12      | 1,31      | 2,09      |
| Total    | 11 | -                                | -      | -       | -      | -      | -         | -         | -        | -         | -         | -         |
| CV%      | -  | 7,3                              | 16,19  | 9,44    | 5,95   | 6,32   | 8,01      | 9,63      | 9,25     | 3,88      | 8,82      | 7,13      |

<sup>a</sup>Composto fenólico: A= ácido gálico, B = ácido ferúlico, C = ácido *p*-cumárico, D = ácido *o*-cumárico, E = ácido siríngico, F = catequina, G = galato de epicatequina, H = epicatequina, I = cloreto de cianidina, J = cloreto de malvidina e K = cloreto de delphinidina.

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4A - Resumo da análise de variância dos compostos fenólicos nos diferentes extratos da farinha de casca de jabuticaba.

|                     | GL | Quadrado médio    |                |                   |                    |
|---------------------|----|-------------------|----------------|-------------------|--------------------|
|                     |    | Extrato acetônico | Extrato aquoso | Extrato etanólico | Extrato metanólico |
| Compostos fenólicos | 10 | 713,96**          | 656,96**       | 4591,00**         | 1743,59**          |
| Resíduo             | 22 | 0,27              | 0,78           | 11,57             | 0,69               |
| Total               | 32 | -                 | -              | -                 | -                  |
| CV%                 | -  | 6,16              | 10,07          | 11,91             | 5,11               |

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 5A - Resumo da análise de variância da área das feridas nos dias que foram realizadas as medições.

| FV               | GL    | Quadrado médio |
|------------------|-------|----------------|
| Tratamento       | 3     | 0,168**        |
| Erro 1           | 20    | 0,019          |
| Tempo            | 3     | 3,261**        |
| Tratamento*tempo | 9     | 0,035**        |
| Erro 2           | 60    | 0,005          |
| CV 1 (%)         | 31.31 |                |
| CV 2 (%)         | 16.66 |                |

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.