

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
CAMPUS POÇOS DE CALDAS

LEILIANE APARECIDA DE ALMEIDA

**MEMBRANA DE QUITOSANA INCORPORADA COM EXTRATO
DE UVA JACQUEZ PARA TRATAMENTO DE FERIDAS
CUTÂNEAS**

Poços de Caldas/MG
2017

LEILIANE APARECIDA DE ALMEIDA

**MEMBRANA DE QUITOSANA INCORPORADA COM EXTRATO
DE UVA JACQUEZ PARA TRATAMENTO DE FERIDAS
CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientadora: Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos

A447m Almeida, Leiliane Aparecida de.

Membrana de quitosana incorporada com extrato de uva Jacquez para tratamento de feridas cutâneas / Leiliane Aparecida de Almeida. – Poços de Caldas, 2017.
93 f. –

Orientadora: Maria Gabriela Nogueira Campos.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.
Bibliografia.

1. Uva. 2. Quitosana. 3. Cicatrização de feridas. I. Campos, Maria Gabriela Nogueira. II. Título.

CDD: 620.11

LEILIANE APARECIDA DE ALMEIDA

MEMBRANA DE QUITOSANA INCORPORADA COM EXTRATO DE
UVA JACQUEZ PARA TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS

A banca examinadora abaixo-assinada,
aprova a Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Ciência e
Engenharia de Materiais, pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais da
Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração:
Desenvolvimento, Caracterização e
Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 28 de julho de 2017.



Prof(a.) Dr(a). Maria Gabriela Nogueira Campos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof(a.) Dr(a). Maria do Socorro Fernandes Melo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG



Prof(a.) Dr(a). Renata Vieira da Mota

Instituição: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG

À minha mãe Roseli, meu irmão Mateus, meus avós Maria Helena e Delphino e meus sogros, pelo carinho e incentivo em todos os momentos. Ao meu noivo Chrisrobert, sempre presente em minha vida, pela paciência, cumplicidade e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado esta oportunidade e proporcionado que eu chegasse até aqui.

À minha amiga e orientadora Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos, pela paciência, carinho, apoio e dedicação em todos os anos que trabalhamos juntas.

À professora Dra. Maria do Socorro Fernandes Melo, pela grande ajuda, paciência e dedicação.

À equipe UNIFAL-MG e do Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, por terem me auxiliado e possibilitado o desenvolvimento desta pesquisa.

À Casa Geraldo localizada em Andradas – MG, pelo fornecimento das uvas analisadas no presente estudo.

À Karine e Isabela pela ajuda e à todos os colegas de estudo que, de certa forma, contribuíram para a realização e conclusão desta etapa em minha vida.

“ Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre teresa de Calcutá)

RESUMO

O estudo sobre tratamentos de feridas é constante por ser uma enfermidade que atinge grande parte da população mundial, abrangendo desde queimaduras até doenças mais graves como diabetes. Com isso, busca-se um melhor recobrimento que substitua as funções epiteliais sem que haja contaminações por microrganismos. Um biopolímero muito estudado para este fim é a quitosana. Ela é derivada da quitina e encontrada principalmente em exoesqueletos de insetos e crustáceos. A uva é uma fruta rica em compostos fenólicos que se concentram principalmente na casca, semente e engaços. Tanto a quitosana quanto a uva possuem propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias e antibacterianas. Assim, por meio deste estudo foram desenvolvidas e caracterizadas membranas de quitosana acrescidas de extrato de uva para potencial aplicação no tratamento de feridas cutâneas. Uma primeira etapa deste estudo foi a obtenção e caracterização do extrato da cultivar Jacques (*Vitis bourquina*), considerando a baga inteira. O extrato foi obtido por maceração hidroalcoólica de etanol 50% v/v. A partir do extrato pronto, seguiu-se para as análises qualitativas e semi-quantitativas, além da atividade antirradicalar, análise de FTIR, para que fosse possível caracterizar os compostos ali presentes, e análise da atividade antimicrobiana. As análises qualitativas e semi-quantitativas apontaram para a presença de compostos fenólicos e taninos condensados no extrato. O espectro de FTIR comprovou a existência de grupos hidroxilas pertencentes a compostos fenólicos e água. Também pode-se observar a presença de bandas relacionadas a moléculas aromáticas derivados de pirano referente a taninos condensados. O extrato mostrou baixa atividade antirradicalar comparada com os padrões quercetina e ácido gálico, possivelmente em razão da pequena presença de flavonoides. Com relação à análise antimicrobiana, a concentração do extrato empregada não apresentou formação de halo de inibição para as bactérias analisadas. Na segunda etapa da pesquisa, as membranas foram sintetizadas e caracterizadas quanto aos teores de umidade, comportamento hídrico, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e também analisadas pelo FTIR, DSC, MEV e análise da atividade antimicrobiana. As membranas contendo quitosana e extrato de uva apresentaram uniformidade em sua composição e transparência, fator ideal para a manutenção das feridas cutâneas. Elas também apresentaram umidade, capacidade de absorção de água e passagem de vapores de água satisfatórios, mantiveram a integridade no teste de solubilidade, e ainda, mostraram resistência térmica acima da temperatura corpórea. Por meio destas análises e também pelo espectro de FTIR foi possível averiguar a interação entre a quitosana e o extrato. Entretanto, a atividade antibacteriana não foi observada em nenhuma membrana. Conclui-se que o método de extração empregado foi eficiente, pois no extrato obtido há presença de compostos cicatrizantes de interesse, assim como as membranas de quitosana acrescidas deste extrato apresentaram propriedades satisfatórias para aplicação no tratamento de feridas cutâneas.

Palavras-chave: Uva. Quitosana. Membrana. Compostos fenólicos. Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

The study is a constant on wound treatments illness that affects a large part of the world population, ranging from burns to more serious diseases such as diabetes. Thus, a better coating is proposed that replaces epithelial functions without contamination by microorganisms. A very studied biopolymer for this purpose is chitosan. It is derived from chitin and found mainly in exoskeletons of insects and crustaceans. Grape is a fruit rich in phenolic compounds that concentrate mainly on skin, seed and stalks. Both chitosan and grape have healing, anti-inflammatory and antibacterial properties. Thus, through this study were developed and characterized chitosan membranes plus grape extract for potential application in the treatment of cutaneous wounds. A first step of this study was the obtaining and characterization of the extract of the cultivar Jacques (*Vitis bourquina*), considering the whole berry. The extract was obtained by hydroalcoholic maceration of 50% v / v ethanol. From the ready-made extract, the qualitative and semi-quantitative analyzes were followed, besides the anti-radical activity, FTIR analysis, so that it was possible to characterize the compounds present, and analysis of the antimicrobial activity. The qualitative and semi-quantitative analyzes indicated the presence of phenolic compounds and condensed tannins in the extract. The FTIR spectra showed the existence of hydroxyl groups belonging to phenolic compounds and water. It is also possible to observe the presence of bands related to aromatic molecules derived from pyran referring to condensed tannins. The extract showed low antiradical activity compared to the quercetin and gallic acid standards, possibly due to the small presence of flavonoids. Regarding the antimicrobial analysis, the concentration of the extract used did not present inhibition halo formation for the analyzed bacteria. In the second stage of the research, the membranes were synthesized and characterized by moisture content, water behavior, solubility, water vapor permeability and also analyzed by FTIR, DSC, SEM and analysis of antimicrobial activity. The membranes containing chitosan and grape extract presented uniformity in composition and transparency, an ideal factor for the maintenance of cutaneous wounds. They also showed satisfactory moisture, water absorption capacity and passage of water vapors, maintained integrity in the solubility test, and also showed thermal resistance above body temperature. Through these analyzes and also by the FTIR expectation, it was possible to verify the interaction between the chitosan and the extract. However, antibacterial activity was not observed on any membrane. It is concluded that the extraction method employed was efficient, because in the extract obtained there are presence of healing compounds of interest, as well as the chitosan membranes added with this extract had satisfactory properties for application in the treatment of cutaneous wounds.

Keywords: Grape. Chitosan. Membrane. Phenolic compounds. Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura geral da pele identificando os tecidos principais: epiderme, derme e hipoderme.....	15
Figura 2 -	Etapas da cicatrização de feridas cutâneas.....	19
Figura 3 -	Estrutura da quitina, quitosana e celulose.....	27
Figura 4 -	Estrutura química geral dos flavonoides.....	31
Figura 5 -	Subclasses dos flavonóides.....	32
Figura 6 -	Estrutura química de tanino hidrolisável.....	35
Figura 7 -	Estrutura química de tanino condensado.....	35
Figura 8 -	Estádios fenológicos de videiras em geral.....	37
Figura 9 -	Estrutura de dímeros de procianidinas contendo uma ligação interflavânica C4-C8.....	40
Figura 10 -	Fluxograma geral dos procedimentos adotados.....	45
Figura 11 -	Uva Jacquez (<i>Vitis bourquina</i>).....	46
Figura 12 -	Maceração hidroalcoólica da uva.....	47
Figura 13 -	Reação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu.....	50
Figura 14 -	Formação do complexo entre flavonoide (quercetina) e o alumínio.....	51
Figura 15 -	Reação da vanilina com 3-flavanól monomérico produzindo um aducto vermelho com absorvância máxima a 500 nm.....	52
Figura 16 -	Atividade sequestrante de radicais DPPH com o extrato de uva <i>Vitis bourquina</i>	54
Figura 17 -	Recipiente hermeticamente fechado contendo a célula de permeação.....	60
Figura 18 -	Extrato de uva concentrado.....	64
Figura 19 -	Ensaio qualitativos do extrato de uva verde.....	65
Figura 20 -	Comparação da atividade sequestrante de radicais DPPH entre o extrato de uva <i>Vitis bourquina</i> e os padrões de quercetina e ácido gálico.....	68
Figura 21 -	Espectro de FTIR da amostra de extrato de uva <i>Vitis bourquina</i>	69
Figura 22 -	Resultado da atividade antimicrobiana para o extrato de uva Jacquez concentrado (1) e controle positivo (2) para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Figura 23 -	Membranas sintetizadas : a- membrana de quitosana (QUIT); b- membrana quitosana/extrato de uva (QE).....	72
Figura 24 -	Comparação das micrografias: membrana QUIT (a) e (b) a 100µm (superfície) e 3µm (interior), respectivamente; e membrana QE (c) e (d) a 100µm (superfície) e 3µm (interior), respectivamente.....	74
Figura 25 -	Comparação da porcentagem de absorção de água entre as membranas QE e QUIT.....	76
Figura 26 -	Deslocamento da temperatura de fusão e redução da área para a membrana QE em comparação à membrana QUIT.....	78
Figura 27 -	Comparação dos espectros de FTIR das amostras de quitosana em pó, extrato de uva <i>Vitis bourquina</i> , Membrana QUIT e membrana QE.....	80
Figura 28 -	Resultados da atividade bacteriana. Em a: <i>Escherichia coli</i> , para as amostras A1 (QUIT), A2 (QE), A3 (controle positivo) e A4 (controle negativo). Em b: <i>Staphylococcus aureus</i> , para as amostras B1 (QUIT), B2 (QE), B3 (controle positivo) e B4 (controle negativo).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Microrganismos utilizados na análise antimicrobiana	56
Tabela 2 -	Análise da presença de compostos fenólicos no extrato de uva <i>Vitis bourquina</i> .	64
Tabela 3 -	Teores de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados no extrato de uva <i>Vitis bourquina</i> .	66
Tabela 4 -	Espessuras das membranas de quitosana (QUIT) e quitosana com extrato de uva (QE)	73
Tabela 5 -	Umidade e intumescimento das membranas de QUIT e QE	76
Tabela 6 -	Solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) das membranas QUIT e QE	
Tabela 7 -	Resultados obtidos do ensaio de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	PELE.....	14
2.2	FERIDAS CUTÂNEAS.....	16
2.3	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	18
2.3.1	Tipos de cicatrização.....	21
2.3.2	Curativos.....	22
2.4	BIOMATERIAIS E TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS.....	23
2.4.1	Quitosana.....	26
2.5	PLANTAS E TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS.....	28
2.5.1	Compostos fenólicos.....	29
2.5.1.1	Flavonoides.....	30
2.5.1.2	Taninos.....	34
2.6	UVA E A CULTIVAR JACQUEZ.....	36
2.6.1	Compostos fenólicos presentes em uvas.....	40
2.7	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	METODOLOGIA GERAL.....	46
3.2	EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS DA CASCA E SEMENTE DE UVA.....	47
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO.....	48
3.3.1	Análises qualitativas.....	48
3.3.1.1	Flavonoides.....	49
3.3.1.2	Taninos.....	49
3.3.2	Análises semi-quantitativas.....	50
3.3.2.1	Compostos fenólicos totais.....	50
3.3.2.2	Flavonoides.....	51
3.3.2.3	Taninos condensados.....	52
3.3.3	Atividade antirradicalar (DPPH).....	54

3.3.4	Análise de infravermelho (FTIR)	55
3.3.5	Atividade antimicrobiana	55
3.4	PREPARO DAS MEMBRANAS	57
3.5	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	57
3.5.1	Espessura	57
3.5.2	Determinação da umidade	58
3.5.3	Comportamento hídrico (intumescimento)	58
3.5.4	Solubilidade em água	59
3.5.5	Permeabilidade ao vapor de água	59
3.5.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	61
3.5.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
3.5.8	Análise de infravermelho (FTIR)	62
3.5.9	Atividade antimicrobiana	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	63
4.1.1	Rendimento	63
4.1.2	Análises qualitativas	65
4.1.3	Análises semi-quantitativas	65
4.1.4	Atividade antirradicalar (DPPH)	67
4.1.5	Análise de infravermelho (FTIR)	69
4.1.6	Atividade antimicrobiana	70
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	71
4.2.1	Análise macroscópica e morfológica	72
4.2.2	Determinação da umidade, comportamento hídrico, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água	74
4.2.3	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	77
4.2.4	Análise de infravermelho (FTIR)	79
4.2.5	Análise antimicrobiana	80
5	CONCLUSÃO	82
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

A pele é um dos principais órgãos do corpo, pois exerce um papel de extrema importância no ser humano atuando como interface entre o organismo e o ambiente externo. Desta forma, evita-se o contato interno com agentes físicos e químicos e também contra microrganismos patogênicos. Dentre outras importantes funções estão o impedimento da perda de água, a garantia da homeostasia de líquidos e minerais, atuação na secreção e excreção de moléculas endógenas, participação na regulação térmica e atuação como receptores para a percepção do meio ambiente (BOROJEVIC; SERRICELLA, 1999). Apesar desta vasta funcionalidade, a pele está vulnerável a ataques externos, o que provoca lesões, cortes e queimaduras (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Após o rompimento tecidual inicia-se o processo de reparo, no qual uma sequência de reações ocorre a fim de reconstruir o tecido lesionado. Esta série de reações denomina-se como sendo o processo de cicatrização. A cicatrização tem como finalidade substituir o tecido danificado por um tecido conjuntivo vascularizado, reconstituindo assim a homeostasia tecidual (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Por esta razão, é importante o conhecimento desse processo para que melhores tratamentos sejam elaborados com o intuito de acelerar a cicatrização, evitar infecções que agravem as lesões e também proporcionar o bem-estar do paciente (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Variados métodos vêm sendo estudados para amenizar e até mesmo solucionar estes problemas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) incentiva fortemente o estudo de plantas para esta finalidade, porém, sempre avaliando os benefícios e riscos de seu uso (SANTOS et al., 2012). Poucos estudos citam o poder cicatrizante da uva, entretanto, em sua composição há compostos fenólicos, como os flavonoides e os taninos condensados, que possuem características anestésicas, agente esterilizante, agente promotor da regeneração celular além de propriedades bactericidas e antivirais (ABE et al., 2007).

Os biomateriais também estão conquistando espaço na área médica. Como biopolímero destaca-se a quitosana, um derivado da quitina encontrada em exoesqueletos de crustáceos e insetos. A quitosana possui propriedades, como poder hemostático e função analgésica, que

contribuem para uma boa cicatrização de feridas, além de ser biocompatível, atóxica, biodegradável e possuir atividade antimicrobiana (FRANCO, 2014).

Portanto, tanto a uva quanto a quitosana possuem características ideais para que haja uma boa cicatrização em feridas cutâneas. Até então não foram localizados estudos com membranas de quitosana e extrato de uva para a utilização em tratamento destas lesões. Ferreira et al. (2014) desenvolveram e caracterizaram membranas de quitosana e extrato de uva para aplicação em embalagens comestíveis a fim de reduzir a oxidação e, conseqüentemente, a deterioração nos alimentos.

O desafio é elaborar um único material que aumente a velocidade de cicatrização e seja economicamente viável, sendo acessível à toda população. Desta forma, esta pesquisa tem como objetivo desenvolver e caracterizar membranas a base de quitosana e extrato de casca de uva para tratamento de feridas cutâneas. Em específico, objetiva-se extrair os compostos fenólicos da casca de uva, desenvolver a melhor formulação para a membrana e, a partir destes, analisar a morfologia, os comportamentos hídrico, térmico e antimicrobiano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este tópico aborda de maneira sucinta, os principais conceitos encontrados na literatura que envolvem o tema estudado. Foram descritas informações sobre a pele, feridas cutâneas e o processo de cicatrização, biomateriais e as plantas no tratamento de feridas cutâneas, a uva e a cultivar Jacquez e, finalizando com os métodos de extração e análise de compostos fenólicos.

2.1 PELE

A pele consiste em um sistema epitelial equivalente ao de mucosas, sistema digestivo e ao trato urogenital que possui a função de proteger estruturas internas do ambiente externo. O que difere a pele destes tecidos epiteliais é o fato do ambiente externo, a que está exposta, ser imensamente agressivo. Pode-se denominar a pele como a fronteira entre o organismo e o ambiente (HARRIS, 2003).

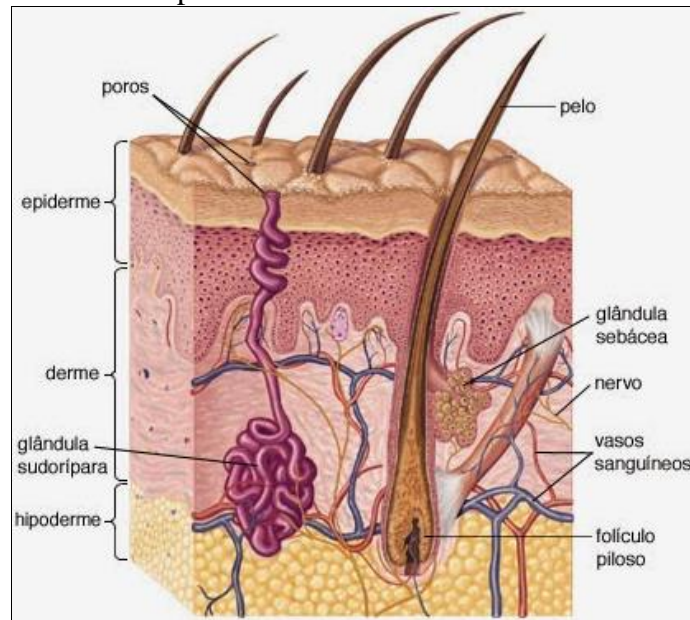
Ela possui funções importantes como garantir sua própria integridade assim como a do organismo interno, protegendo contra agressões de agentes externos; controlar a absorção e secreção de líquidos; controlar a temperatura; proteger da absorção de luz ultravioleta bem como seus efeitos nocivos à saúde; atuar no metabolismo da vitamina D; além de funções estéticas e sensoriais (HARRIS, 2003).

Sua estrutura básica é formada por dois tecidos principais: a epiderme e um tecido conectivo formado pela derme e a hipoderme (Figura 1). A epiderme se localiza na parte mais externa, possui uma estrutura mais compacta e impermeável sendo perfurada por poros dos folículos pilossebáceos e das glândulas com origem na derme. Ela não é vascularizada, recebe os nutrientes através da derme por permeação capilar. Entre a derme e a epiderme está a membrana basal, na qual sua ultra-estrutura proporciona à pele parte de suas propriedades mecânicas. Em sua área mais profunda encontra-se uma rede de colágeno com fibras longitudinais possuindo uma estrutura emaranhada com aberturas para os canais sudoríferos e para os infundíbulo dos folículos pilossebáceos (HARRIS, 2003).

A derme contém os tecidos conectivos fibrosos de elastina e colágeno. Além de pêlos e glândulas sudoríparas e sebáceas estão presentes os nervos, células matrizes, fibroplastos, miofibroplastos e macrófagos. É muito vascularizada assegurando a nutrição sanguínea da

epiderme. Já a hipoderme é formada por um tecido conectivo gorduroso, tecido adiposo, contendo nervos e vasos sanguíneos. A função do tecido adiposo é regular a temperatura, agir como termoisolante, suprimento de energia, proteção e suporte (HARRIS, 2003).

Figura 1 – Estrutura geral da pele identificando os tecidos principais: epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: MONTAGNA; EBLING, (2016).

Assim como todo organismo multicelular, a pele possui um tempo limitado de vida e sofre mudanças fisiológicas com o passar do tempo. Estas mudanças são atribuídas a vários fatores, como defeito genético, meio ambiente (principalmente à exposição solar), surgimento de doenças e expressões de genes do envelhecimento. Sobre todas estas causas atuam os radicais livres. Este termo se refere a átomos ou moléculas que são altamente reativos devido ao não emparelhamento de elétrons da última camada. Seu potencial reativo pode ser variado, no qual os menos reativos são mais estáveis e seletivos em relação aos seus substratos, e os mais reativos são menos seletivos e muito instáveis interagindo com qualquer substrato e são considerados os mais perigosos para o sistema celular. Há uma grande variedade de radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (Eron), regularmente eles atuam como bases abstraindo átomos de hidrogênio, como nucleófilos, substituindo outros grupos e se adicionando a sistemas insaturados (HARRIS, 2003).

As camadas que compoem a pele também sofrem alterações histológicas e funcionais. Na epiderme há uma grande diminuição da atividade biossintética dos queratinócitos, que são os principais constituintes deste tecido e responsáveis pela produção da queratina, além da diminuição de sua espessura. A membrana basal tem a redução do colágeno IV que é responsável pela estabilidade mecânica do tecido e é usada como molde para novas moléculas na regeneração tecidual. Na derme e hipoderme ocorre uma diminuição da biossíntese dos fibroblastos, reduzindo os teores de colágeno e elastina que garantem as propriedades mecânicas da pele e também redução do tecido adiposo. Quando expostas à radiação solar, essas perdas são mais intensas (HARRIS, 2003).

2.2 FERIDAS CUTÂNEAS

Quando a pele sofre ataques externos há um rompimento tecidual, no qual ocorrem danos em sua estrutura dando origem às feridas cutâneas. Elas podem ser classificadas, após exame físico e histórico clínico, em feridas agudas ou crônicas e em limpa, limpa-contaminada, contaminada e infeccionada, conforme o grau de contaminação (SANTOS, 2016).

As feridas agudas são consideradas desde um simples arranhão até uma lesão profunda que conseguem uma cura completa, com o mínimo ou nenhuma formação de cicatrizes, em um prazo de três semanas. Certos tipos de úlceras ou feridas diabéticas são consideradas como feridas crônicas e começam a se desenvolver quando a ferida não se cicatriza após um tempo mínimo de três meses. Estas feridas apresentam elevado nível de exsudato, em razão ao período extenso de inflamação, destruição dos tecidos adjacentes o que leva a uma predisposição às infecções (PATRULEA et al., 2015; SANTOS, 2016).

As feridas limpas não apresentam sinal de infecção, pois ocorrem em condições assépticas e não abrangem os sistemas respiratório, digestivo e genito-urinário. Apresentam baixa probabilidade de infecção, entre 1 a 5%. As lesões limpa-contaminadas já apresentam algum grau de contaminação e ocorrem, normalmente, em operações cirúrgicas dos sistemas respiratório, digestivo e genito-urinário. A possibilidade de infecções é em torno de 10%. As feridas contaminadas são provenientes de lesões ocorridas há mais de seis horas, acidentais, desenvolvidas perto ou sobre áreas contaminadas e/ou inflamadas, ou sem terem tido uma assepsia correta. Estas feridas podem alcançar um nível de infecção entre 20 e 30%. Quando

as feridas já apresentam sinais de infecção como pus, perfuração de vísceras ou contagem bacteriana superior a 100 mil organismos por grama de tecido, elas são tidas como infeccionadas (SANTOS, 2016).

No Brasil, o ministério da saúde tem dado uma atenção maior ao tratamento de feridas cutâneas, tanto ao que se refere às queimaduras quanto às feridas crônicas (CRUZ et al., 2012).

As queimaduras ocorrem geralmente em ambientes domésticos e são comumente provocadas pelo manuseio de líquidos superaquecidos. As estatísticas apontam a água quente como principal causadora das queimaduras em crianças de 0 a 5 anos de idade, totalizando 37,1% de casos. Em seguida estão os líquidos combustíveis onde o álcool colabora com cerca de 20% dos casos (CRUZ et al., 2012).

Outros meios de sofrer queimaduras são as exposições direta da pele às chamas, superfícies quentes, frio, substâncias químicas, radiação, atrito ou fricção. As lesões com substâncias químicas são oriundas de ácidos, bases, orgânicas ou inorgânicas. Esta exposição destrói parcial ou totalmente o tecido epitelial, expandindo os danos para o tecido celular subcutâneo, músculos, tendões e ossos (TAVARES; HORA, 2011).

Queimaduras de decorrência elétrica provocam destruição tecidual e necrose interna, ainda que, as lesões externas aparentem ser pequenas (TAVARES; HORA, 2011). Uma grave complicação das queimaduras é a infecção, responsável por 75 a 80% dos óbitos. Elas são decorrentes da extensão superficial corporal queimada, translocação bacteriana gastrointestinal, internação prolongada e uso inadequado de antimicrobianos, além dos procedimentos invasivos que comprometem a defesa natural (CRUZ,2012; TAVARES; HORA, 2011).

Além das queimaduras, as feridas crônicas representam uma grande preocupação para o sistema de saúde. Existem pacientes com feridas durante vinte ou até trinta anos. Úlceras venosas de perna, úlceras de pressão e úlceras de pés diabéticos incluem estes tipos de feridas. Com uma maior frequência têm-se as úlceras de pressão, que afetam mais de 60% dos doentes com feridas crônicas. Estas são lesões ocasionadas pela isquemia tecidual prolongada em razão da pressão mantida dos tecidos moles entre o osso e uma superfície dura. As úlceras de perna são resultado da hipertensão venosa, ou seja, alterações no sistema venoso ou arterial, que está associado a pacientes com diabetes e/ou artrite reumatoide. Por outro lado, estão as úlceras de pés diabéticos possuindo um custo de bilhões de dólares anuais. Elas geram

complicações neuropáticas e vasculares, além de um defeito na espessura da pele que requer um grande período de tempo para cicatrização (CRUZ et al., 2012).

Existem também as feridas cirúrgicas complicadas, necrotizantes, traumáticas, de vasculite e as feridas pós-radiações. Se uma incisão cirúrgica abre após realizada a operação, ela é denominada como ferida cirúrgica complicada. Elas surgem devido às infecções ou isquemia tecidual e são agravadas pelas condições clínicas dos pacientes. Feridas necrotizantes possuem uma infecção agressiva dos tecidos, ocasionando lesões profundas e necrose tecidual. Este é o caso das celulites graves e da síndrome de Fournier, no qual ambas ocorrem em pacientes com imunossupressão ou doença associada (COLTRO et al., 2011).

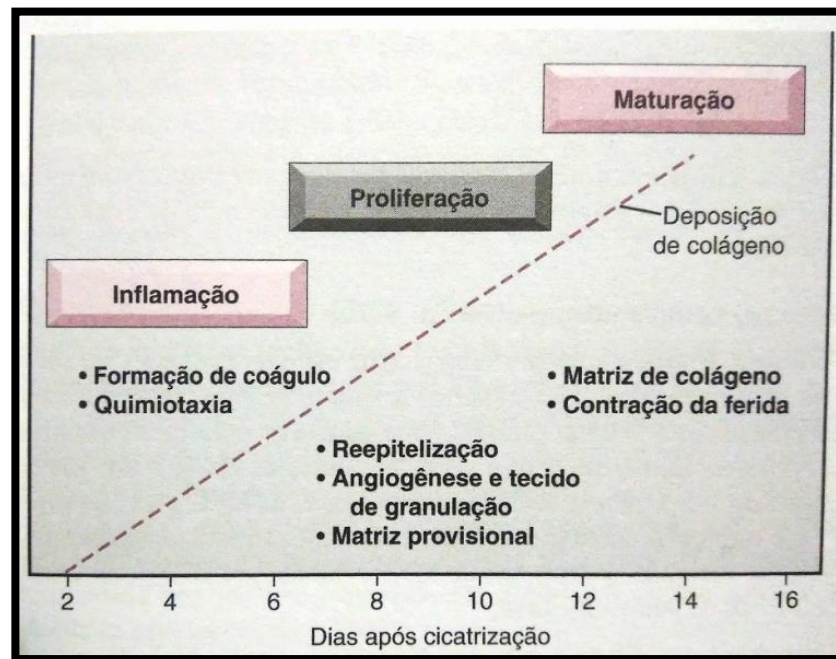
As feridas traumáticas são decorrentes de traumas graves como deslocamentos e perdas de tecidos dos membros inferiores, amputações de membros e dedos, contusões, lacerações e esmagamentos. Feridas de vasculite ocorrem devido às inflamações dos vasos sanguíneos ou por imunopressão, em razão de doenças como artrite eumatoide, lúpus, esclerodermia, dermatomiosite, anemia falciforme, entre outros. E, finalmente, as feridas denominadas pós-radiação são as patologias de radiodermite ou radionecrose em decorrência da radioterapia no tratamento de neoplasias (COLTRO et al., 2011).

2. 3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A cicatrização de feridas pode ser entendida como um conjunto de processos que se iniciam logo após a ocorrência de uma lesão, ou seja, é um processo espontâneo. Ela é uma resposta inflamatória aguda, com edema e formação de exsudato seroso, provocando morte celular, ruptura dos vasos sanguíneos, seguidos por coagulação e alteração da vascularização (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011).

O processo ocorre através de três fases distintas e superpostas (Figura 2): inflamação, proliferação e maturação (MITCHELL et al., 2012).

Figura 2 - Etapas da cicatrização de feridas cutâneas.



Fonte: MITCHELL et al. (2012, p. 57).

A inflamação ocorre logo após a ocorrência da lesão, se prolongando normalmente por 24 a 72 horas. Possui como objetivo a reparação tecidual e a restauração da funcionalidade. Nesta etapa um coágulo sanguíneo se forma para estancar o sangramento e também viabilizar uma matriz rica em fatores de crescimento e quimiocinas agindo assim, como suporte para a migração dos leucócitos e células estromais. Após 24 horas, os neutrófilos surgem nas margens e tem início o processo de esterilização da ferida e degradação de resíduos (MITCHELL et al., 2012).

Transcorridos dois dias da lesão o tecido de granulação é formado por meio da proliferação de fibroblastos e de endotélio. Este é um tecido conjuntivo vascularizado frouxo e marca o início da reparação do tecido. Há formação de edema local, pois os vasos ainda não possuem uma boa vedação, o que aumenta a deposição de proteínas e líquidos nos tecidos. Esta primeira etapa do processo de cicatrização deve ser finalizada em até três dias nas feridas cirúrgicas ou agudas. A presença de bactérias ou tecidos necrosados irão estender o período de inflamação ocasionando o desgaste do paciente. Assim, principalmente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, normalmente presentes na contaminação das feridas, devem ser evitadas (CAMPOS et al., 2007; MITCHELL et al., 2012).

A proliferação celular ocorre após quatro dias da injúria, onde tem-se a substituição dos neutrófilos pelos macrófagos. Eles são elementos fundamentais na limpeza de resíduos,

direcionamento da angiogênese e na deposição de matriz extracelular (MEC). Em seguida, a estrutura do tecido de granulação é convertida em uma cicatriz composta de fibroblastos e colágeno. No processo de cicatrização os macrófagos são os principais elementos para a produção de vários fatores, especialmente o agente de crescimento transformador fibrinogênico TGF- β , que irá levar à migração e proliferação de fibroblastos e produção de MEC (MITCHELL et al., 2012).

Decorrentes duas semanas da lesão tem-se principalmente a deposição de colágeno com regressão da vasculatura, no qual o tecido de granulação é convertido em uma cicatriz avascular sem inflamação e coberta por epitélio íntegro. A contração da cicatriz ocorre em lesões maiores devida a ação de miofibroblastos e possui o aspecto sintético dos fibroblastos e a capacidade contrátil das células da musculatura lisa. Desta forma, estes elementos reduzirão a área da ferida (MITCHELL et al., 2012).

A etapa de remodelação tem início na terceira semana. Nesta fase ocorre a deposição aleatória do colágeno obedecendo a orientação e organização das fibronectinas e a direção da natureza das forças de tensão aplicadas sobre o tecido. Em seguida, as metaloproteinases que são produzidas pelos macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais digerem as fibras que são resintetizadas e organizadas conforme o sentido das fibras do tecido conjuntivo adjacente. Como resultado há formação de fibras de colágeno maiores e uma cicatriz com aparência mais uniforme. Terminada esta etapa ocorre uma regeneração limitada dos anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas, e uma cicatriz de coloração pálida com até 80% da força de tensão original (SANTOS, 2016).

Existem vários fatores que afetam negativamente o processo de cicatrização de feridas, dentre eles encontram-se os fatores locais e os sistêmicos. Os fatores locais estão relacionados aos resíduos, que estão dentro da ferida, e ao movimento. Eles atuam como uma barreira física para o desenvolvimento ordenado do tecido de granulação e deposição de colágeno. A existência de uma infecção é o maior empecilho para um processo de cicatrização, onde as bactérias presentes na pele podem colonizar a ferida e, conseqüentemente, haver uma deficiência do fluxo sanguíneo para a lesão, diminuindo desta forma a taxa de recuperação. Quando a ferida está exposta a uma alta mobilidade, ela se torna mais predisposta à inflamação. Por outro lado, quando completamente imobilizada, a ferida leva a um arranjo desorganizado do colágeno substituinte (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011).

Os fatores sistêmicos incluem, entre outros, o estado nutricional, a hipotermia, o trauma e o uso de anti-inflamatórios (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011).

A escassez de proteínas antes da lesão leva a uma formação reduzida de reações teciduais, ocorrendo o contrário quando a perda ocorre após o ferimento. A vitamina C é de extrema importância para a síntese do colágeno e também para a produção de N-acetil galactosamina, um componente de matriz e tecido de granulação. Sua falta reduz a resistência da ferida à tensão e retarda o processo de cicatrização. O mineral magnésio é responsável pela síntese de proteínas e o zinco facilita a função das metaloproteínas que são importantes para o colágeno e para a fase de remodelagem. A temperatura também influencia na cicatrização de feridas. Quando baixas, reduzem a microcirculação local devido a diminuição da oxigenação e nutrição tecidual (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Alguns anti-inflamatórios ao invés de auxiliarem na cicatrização acabam por interferir negativamente, tornando a pele mais suscetível ao surgimento de lesões e outras patologias cutâneas. Como por exemplo, pode-se citar os anti-inflamatórios esteroidais. Eles reduzem a fase inflamatória inibindo a taxa e qualidade da cicatrização. Desta forma, os tecidos granulares não são formados corretamente e causam proliferação dos fibroblastos e neovascularização (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

O campo de estudo para cicatrização de feridas é amplo devido à diversidade de feridas existentes. As áreas cirúrgicas estão sempre em busca de inovações, entretanto, o controle das feridas pós-cirúrgicas ainda é um grande desafio. Com relação às queimaduras, no Brasil, o número anual de vítimas é de cerca de 170 mil, de acordo com o Ministério da Saúde. No mundo, cerca de 320 mil crianças morrem vítimas de queimaduras a cada ano. Dentre todos esses casos, 95% ocorrem nos países em desenvolvimento, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (FRANÇA, 2010).

O tratamento das feridas crônicas também está propenso a novas tecnologias. Desta forma, o uso de polímeros biocompatíveis como a quitosana, pectina, gelatina, policaprolactona, ácido hialurônico, dentre outros, têm sido descritos (PATRULEA et al., 2015).

2.3.1 Tipos de cicatrização

Ao atender o paciente, inicialmente o médico cirurgião classifica a ferida para só depois determinar qual o melhor método de cicatrização a ser adotado. Há três tipos de cicatrizações: por primeira, segunda e terceira intenção (SANTOS, 2016).

Na cicatrização por primeira intenção é realizada a restauração tecidual através de suturas, adesivos, colas ou grampos das bordas das feridas geradas com menos de 24 horas. O local da lesão deve estar limpo e as bordas devem estar próximas para que seja possível a adoção desta técnica. O reparo ocorre de forma rápida e sem complicações, pois as condições são favoráveis havendo um equilíbrio em todas as fases do processo. Existe um metabolismo satisfatório de colágeno, proliferação celular e degradação da matriz extracelular. Nessa classificação, as feridas são ocasionadas por agentes lesivos que produzem apenas uma pequena ruptura da camada epidérmica e causam uma reduzida destruição de tecidos conjuntivo e epidérmico adjacentes, logo a regeneração epitelial é predominante (SANTOS, 2016; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

Caso as bordas das feridas não possam ser aproximadas devido à perda excessiva de tecido, tem-se a cicatrização por segunda intenção. Estas feridas serão restauradas abertas e ocorrerá a contração das margens e reepitelização após formação do tecido de granulação. O tempo de cicatrização será maior, uma vez que as etapas de angiogênese e reepitelização são mais prolongadas, desta forma estarão mais predispostas às infecções. Essa reparação é normalmente empregada para o tratamento de úlceras diabéticas, vasculares ou de pressão, ou em pacientes com infecções, deiscências, inadequada perfusão sanguínea ou imunossupressão que não se cicatrizam corretamente por primeira intenção (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014; SANTOS, 2016).

A cicatrização por terceira intenção é aplicada quando a área lesionada apresenta infecção ou algum tipo de contaminação, entretanto, existe uma quantidade adequada de tecidos permitindo a aproximação das bordas. Assim, primeiro é necessário o tratamento do quadro de infecção e depois ocorre a sutura da lesão (GODEIRO; MONTENEGRO; FAGUNDES, 2012; SANTOS, 2016).

2.3.2 Curativos

Na história a preocupação em relação ao tratamento de feridas existe desde 3000 anos a. C., onde as pessoas utilizavam vários meios para tratar as lesões. Como por exemplo, faziam uso de extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e até lama (PIRIZ et al., 2014).

Os egípcios empregavam óleos vegetais e aderiam às faixas de algodão. Já gregos e romanos usavam banhas, óleos minerais, pomadas, entre outros. As plantas medicinais ganharam destaque nos monastérios no período medieval, no qual defendiam a importância da manutenção da ferida limpa e remoção de corpos estranhos. O surgimento da penicilina foi marcado na I Guerra Mundial, trazendo um controle da infecção e uma aceleração no processo de cicatrização (PIRIZ et al., 2014).

Atualmente, apesar da vasta diversidade de curativos existentes com propriedades e usos variados existe dificuldade em encontrar uma combinação curativo/ferida ideal para uma lesão em particular (YOUNG, 2015).

Os curativos podem proporcionar às feridas dois ambientes: úmido ou seco. O ambiente úmido tem algumas vantagens sobre o ambiente seco. Ele previne a desidratação do tecido que leva a morte celular, pode aumentar a movimentação das células epidérmicas e a formação do tecido de granulação e evita a perda excessiva de líquidos. Além disso, esse ambiente contém mais fatores de crescimento que aumentam a angiogênese e diminuem a fibrose e servem como barreira contra traumas e infecções. Desta forma, proporcionam para o paciente menor sensação de dor, melhor conforto em suas atividades diárias, trocas de curativos com menos frequência e menor formação do tecido cicatricial (POWERS; MORTON; PHILLIPS, 2013).

Os biomateriais estão ganhando espaço na área de cicatrização de feridas. Dentre os biomateriais utilizados para esta aplicação estão os filmes, espumas, hidrocoloides, alginatos e hidrogéis (BRIANEZI, 2016).

2.4 BIOMATERIAIS E TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Biocompatibilidade é o pré-requisito essencial para que um material classifique-se como biomaterial. Este tem por função tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Para ser biocompatível, um material deve receber uma resposta positiva do seu hospedeiro para determinadas aplicações (NAIR; LAURENCIN, 2005).

Dentre os materiais que podem ser considerados biomateriais, estão os metais, cerâmicas, vidros e os polímeros. Os polímeros recebem maior atenção na área médica. Isto pode ser explicado em razão de sua flexibilidade, permitindo assim, sintetizá-los de acordo com as propriedades físicas e mecânicas de vários tecidos ou órgãos do corpo (NAIR; LAURENCIN, 2005).

Para desempenharem a função de recobrimento de feridas, os biomateriais devem proteger a lesão contra a perda de fluidos e proteínas, prevenir a invasão de bactérias, melhorar e estimular o processo de cicatrização, promover adequadas trocas gasosas e térmicas com o ambiente externo e acima de tudo ser biocompatível e atóxico. Eles devem preencher a região afetada até a completa recomposição do tecido, ou seja, sua função é temporária. No caso, por exemplo, de próteses que substituem válvulas cardíacas, os biomateriais devem ser permanentes sendo utilizados por tempo indeterminado na substituição do tecido lesionado (FRANCO, 2014).

Os principais tipos de curativos utilizados como biomateriais são: filmes, espumas, hidrocoloides, alginatos e hidrogéis que devem conter transparência, flexibilidade, durabilidade, resistência mecânica, permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, impermeabilidade aos microrganismos e espessura fina (FRANCO, 2014).

Filmes são folhas finas auto-adesivas que possuem transparência e são permeáveis a gases e vapor d'água, mas impermeáveis às bactérias. São facilmente compatíveis com feridas com ângulos e formas complexas. Como vantagens permitem a visualização da ferida e flexibilidade para usar como curativo primário ou secundário. Entretanto, por alguns materiais não conterem propriedades absorventes podem levar ao excesso de acumulação de exsudato (POWERS; MORTON; PHILLIPS, 2013; YOUNG, 2015).

Nas espumas a camada externa é permeável ao vapor de água e pode ter taxas variáveis de transmissão de vapor de umidade, entretanto, protege contra bactérias. Já o interior possui as propriedades de absorção. Estes curativos podem ser ou não aderentes e, quando não são, um filme secundário pode ser necessário. Eles são utilizados sobre as proezas ósseas ou dentro de cavidades exsudativas e devem ser substituídos quando há encharcamento em razão do exsudato (POWERS; MORTON; PHILLIPS, 2013).

Os hidrocoloides são compostos por matrizes poliméricas reticuladas com adesivos e amidos integrados, como celulose, gelatina, pectina e guar. Se apresentam sob forma de folhas, pastas e pós. Quando em contato com exsudatos das feridas, os hidrocoloides formam

géis. Em forma de folha o curativo é auto-adesivo, impermeável e não necessita de um curativo secundário. Como desvantagens podem-se citar a natureza opaca do curativo que limita as verificações frequentes da ferida e o gel formado pode ser grosso, amarelo e com mal odor, podendo ser confundido com infecção. Devem ser trocados a cada quatro dias, dependendo do grau de saturação. Eles são ótimos para aplicações em articulações pois oferecem amortecimento suave. Também são ideais em feridas pós-operatórias, úlceras de pressão superficial e úlceras rasas nas pernas (POWERS; MORTON; PHILLIPS, 2013; YOUNG, 2015).

Os curativos de alginato são compostos por algas. Os íons de cálcio contidos no curativo interagem com os íons de sódio do exsudato da ferida para formar um gel de alginato. Este gel é muito absorvente, o que torna este curativo a melhor opção para feridas altamente exsudativas. Por esta razão, este curativo é muito indicado para pacientes com úlceras drenantes trazendo melhor qualidade de vida a eles. O cálcio liberado também apresenta propriedades hemostáticas que promovem a coagulação. Deve-se realizar a troca do curativo semanalmente, caso contrário, eles podem secar e aderir à ferida ocasionando dor aos pacientes. São aplicados em úlceras de pressão profunda, pioderma gangrenoso e úlceras exsudativas na extremidade inferior (POWERS; MORTON; PHILLIPS, 2013; YOUNG, 2015).

Os hidrogéis são polímeros reticulados de amido compostos por até 96% de água. Eles podem ser sintetizados na forma de folhas, géis amorfos (secos ou pré-misturados) e gazes impregnados. Eles possuem uma melhor aplicação em feridas secas, pois conseguem reidratar e manter o ambiente úmido. Também causam o efeito refrescante na ferida diminuindo a sensação de dor. Como desvantagens eles requerem um curativo secundário, uma vez que não são aderentes e sua capacidade de absorção é limitada, assim em feridas com alta liberação de exsudato não possuem aplicação requerida. Os curativos devem ser trocados a cada três dias, dependendo da necessidade de hidratação da ferida. Estudos mostram que eles possuem aplicação sobre feridas de úlceras de pés diabéticos, queimaduras superficiais e de espessuras parciais (POWERS; MORTON; PHILLIPS, 2013; YOUNG, 2015).

Nos últimos anos, várias formas de curativos de feridas à base de quitina e quitosana estão sendo comercialmente disponíveis, assim como diversos estudos vêm sendo publicados. Elas podem ser facilmente sintetizadas na forma de hidrogéis, nanopartículas, grânulos, filmes

e espumas em variados tipos de aplicações biomédicas, como na liberação de medicamentos e em processos de cicatrização de feridas (JAYAKUMAR et al., 2011).

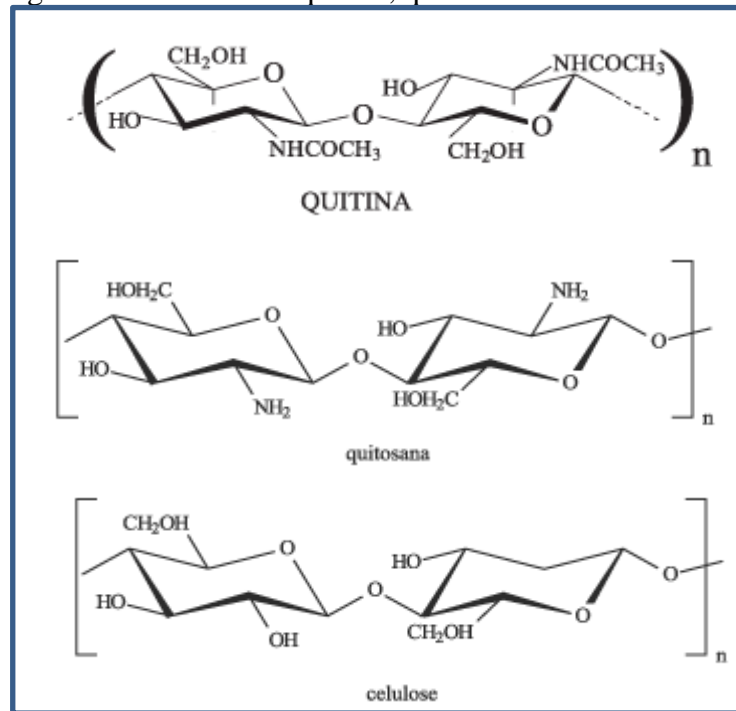
2.4.1 Quitosana

Dentre os biomateriais, a quitosana vem tendo destaque na aplicação como curativos e substitutos de pele. Obtida a partir da desacetilação da quitina, polissacarídeo extraído principalmente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, a quitosana também pode ser encontrada naturalmente em fungos pertencentes aos gêneros *Mucore zygomycetes*. É um copolímero linear com ligação β -1,4, junção entre glucosamina (2-amino-2-desoxi- β -D-glucose) e quantidades menores de *N*-acetilglucosamina (NASCIMENTO et al., 2009). Foi descoberta em cogumelos em 1811, pelo químico francês Henri Braconnot, mas somente em 1970 Prudedd concluiu que a glucosamina e *N*-acetil-D-glucosamina acelerava os processos de cicatrização de feridas. Na década de 1980 a quitosana foi utilizada pela primeira vez para este fim. A partir deste momento, quitina e quitosana foram intensamente pesquisadas para melhorar a cicatrização de feridas em animais e seres humanos (PATRULEA et al., 2015).

A estrutura da quitosana, diferente da quitina, contém o grupo amino. A quitina possui uma estrutura semelhante à celulose, alterando-se somente o carbono-2, no qual se encontra ligado um grupo OH na celulose e grupo acetilado (-NHCOCH₃) na quitina (FRANCO, 2014). A Figura 3 apresenta as diferentes estruturas descritas.

Variadas pesquisas relatam as propriedades únicas e ideais para a cicatrização de feridas que a quitosana possui. Ela é biodegradável, biocompatível, atóxica, possui propriedades antimicrobianas e antifúngicas contra vários agentes patogênicos, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, é hemostática e possui a função analgésica. A quitosana ainda estimula a atividade de macrófagos e fibroblastos sobre o processo de cicatrização, o que resulta em uma maior formação de tecido de granulação. Pode ser utilizada em formatos variados, como em géis, filmes e nanopartículas. Com todas estas características seu campo de aplicação é vasto, especialmente nas áreas médica, veterinária e cosmética (NASCIMENTO et al., 2009; PATRULEA et al., 2015; SILVA et al., 2006).

Figura 3 - Estrutura da quitina, quitosana e celulose.



Fonte: Adaptado de ASSIS ; VALMIR (2003, p. 224).

Um bom curativo deve manter a ferida úmida, garantir solubilização dos fatores de crescimento e/ou dos agentes antimicrobianos e suportar o crescimento de fibroblastos, ter uma boa absorção de exsudato e boa capacidade de troca de oxigênio. A quitosana atende a esses requisitos, pois interage com muitos processos celulares durante todo o processo de cicatrização. Ela promove a migração de leucócitos polimorfos nucleares, os neutrófilos, e promove a granulação por induzir proliferação de fibroblastos dérmicos. Durante as fases iniciais, ela exibe sua propriedade hemostática e promove a infiltração e migração de neutrófilos e macrófagos. Desta forma, as feridas são protegidas de agentes externos e forma-se um tecido de granulação permitindo a formação de tecido fibroso e uma reepitelização. Quando há formação de cicatrizes hipertróficas, que é causada pela excessiva produção de colágeno na fase de remodelação, a quitosana diminui o tecido da cicatriz permitindo uma boa reepitelização (PATRULEA et al., 2015).

Huang e colaboradores (2014) estudaram a ação analgésica e cicatrizante da quitosana e seu derivado, carboximetilquitosana, em áreas lesionadas em ratos. Os autores concluíram que o carboximetilquitosana mostrou um efeito analgésico superior ao somente evidenciado pela quitosana. Entretanto, os dois compostos mostraram eficientes efeitos cicatrizantes.

Okamoto e colaboradores (2003) estudaram os efeitos da quitina e quitosana sobre a coagulação do sangue agindo sobre as plaquetas. Concluíram que a quitosana mostrou-se mais efetiva na coagulação sanguínea comparada à quitina, enquanto que a quitina foi capaz de agregar mais plaquetas do que a quitosana. Quando combinadas elas liberam na ferida compostos que desempenham papéis importantes no processo de cicatrização. Desta forma, seria interessante a combinação da quitina e da quitosana para aplicação biomédica, especialmente para a hemostasia.

Zheng e Zhu (2003) estudaram a atividade antibacteriana de moléculas de quitosana com diferentes pesos moleculares contra bactérias gram-negativa e gram-positiva (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente). Foi observado que para bactérias gram-positivas quanto maior a massa molecular de quitosana maior será a atividade antimicrobiana. Por outro lado, para bactérias gram-negativas, quanto menor a massa da molécula maior será sua atividade antimicrobiana. No caso das gram-positivas, a molécula de alto peso molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que a quitosana de baixo peso molecular penetra mais facilmente nas bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos.

2.5 PLANTAS E TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Como visto, o processo de cicatrização é complexo pois envolve a organização de células, sinais químicos e remodelamento da matriz extracelular a fim de ocasionar o fechamento rápido da lesão para a obtenção de uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória. Para que isso ocorra é essencial uma melhor compreensão do processo biológico envolvido (SILVA et al., 2015).

Muitos pesquisadores têm desenvolvido medicamentos para tratamento de feridas utilizando as plantas. A prática do uso de plantas medicinais começou na antiguidade e acompanha a sabedoria dos povos, culturas e gerações. Por vários anos as plantas serviram de base para o tratamento de diversas doenças, seja pelo conhecimento das propriedades de determinada planta, que foi passado de geração a geração (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; PIRIZ et al., 2014).

Esta prática tem sido acentuada inclusive em países desenvolvidos que vêm proibindo o uso de modernas terapias com antibióticos e corticóides devido os seus efeitos colaterais.

Cerca de 60% da população mundial faz uso de plantas para medicações e os produtos naturais têm sido reconhecidos como uma fonte importante de medicamentos terapeuticamente eficazes (SILVA et al., 2015).

Nos últimos anos o Ministério da Saúde brasileiro implementou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), ambas de 2006 que buscam incentivar o uso de práticas complementares e plantas medicinais para o cuidado no sistema oficial de saúde, de forma segura e eficaz (PIRIZ et al., 2014).

Em geral, as plantas promovem a coagulação do sangue, combatem infecções e aceleram o processo de cicatrização, além disso são mais econômicas, acessíveis e mais seguras (SILVA et al., 2015). Existe uma grande variedade de compostos bioativos responsáveis pela atividade terapêutica das plantas medicinais. Dentre eles estão os terpenos, compostos que contém enxofre (sulfetos, glucosinolatos e tiofenos), carotenóides, saponinas, alcaloides, diferentes açúcares, óleos essenciais, resinas, fitoesteróis, proteínas, peptídeos e compostos fenólicos que incluem os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, ligninas, estilbenos e cumarinas. Em especial os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos possuem atividade antimicrobiana, propriedades antioxidantes e capacidade de aumentar a proliferação celular, além de produzir colágeno e sintetizar DNA (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BEN-SHABAT, 2015).

2.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de, no mínimo, um grupo fenol. São gerados a partir do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o crescimento e reprodução delas. Também se formam em condições de estresse, tais como infecções, ferimentos e radiações UV, desta forma, atuam como agentes anti-patogênicos (ANGELO e JORGE, 2007). Apresentam-se na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas e abrangem desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. São extremamente diversificados, tanto em suas estruturas químicas quanto em suas funções biológicas. Essa variedade é explicada por estarem ligados a grupos hidroxilas, metoxilas e conjugados com açúcares. Atualmente, são listadas mais de 4000 estruturas fenólicas (LAGE, 2009; PIMPÃO, 2009).

Pela diversidade existente de processos metabólicos para formação de substâncias fenólicas, o teor quantitativo destes compostos é difícil de ser estimado no tecido das plantas de um modo geral. Geralmente, a cada espécie vegetal se associa uma determinada família de polifenóis como sendo mais importante, cujos teores variam com a idade e também de acordo com o desenvolvimento vegetativo das plantas. A divisão em subgrupos é dada em função do número de anéis fenólicos e dos elementos estruturais a que são ligados e que se localizam entre eles (LAGE, 2009).

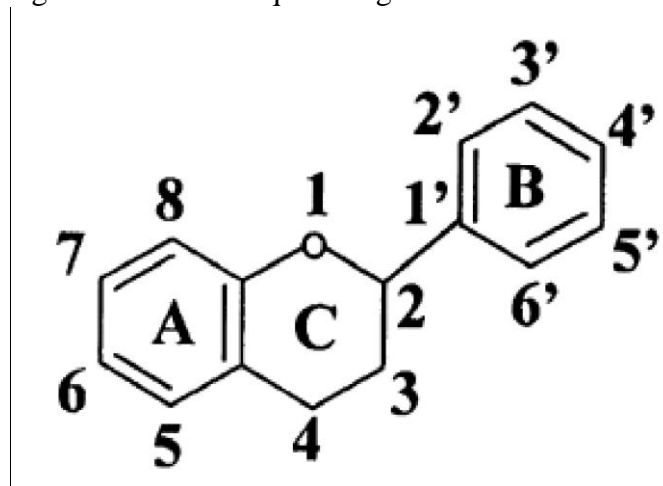
Na literatura encontra-se uma classificação destes compostos em três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza. Dentre os compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza estão os fenóis mais simples como o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. A esta família também pertencem os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina. No subgrupo dos polímeros estão os taninos e as ligninas que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais. Por fim, na família dos compostos largamente distribuídos na natureza encontram-se os fenólicos que estão distribuídos em todo o reino vegetal. Assim destacam-se os flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) (ANGELO; JORGE, 2007).

2.5.1.1 Flavonoides

Os flavonoides são produtos de origem vegetal encontrados nas frutas, vegetais, sementes, flores e cascas de árvores e pertencem ao grupo dos polifenóis. Possuem utilização como anestésico local, agente esterilizante e promotor da regeneração celular, protegendo e curando lesões, além de possuírem propriedades bactericidas e antivirais (PEREIRA, 2010).

Sua estrutura química consiste de anéis benzênicos e pirano (Figura 4), e são diferenciados de acordo com o substituinte da cadeia lateral, que pode ser uma hidroxila, um grupamento metóxi ou glicosídico, além da conjugação entre os anéis A e B. A presença de grupos hidroxil na posição carbono 3 do anel C, a presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C e o número de radicais hidroxil ligados nos anéis A e B, aumentam sua atividade antioxidante (VIEIRA, et al., 2008).

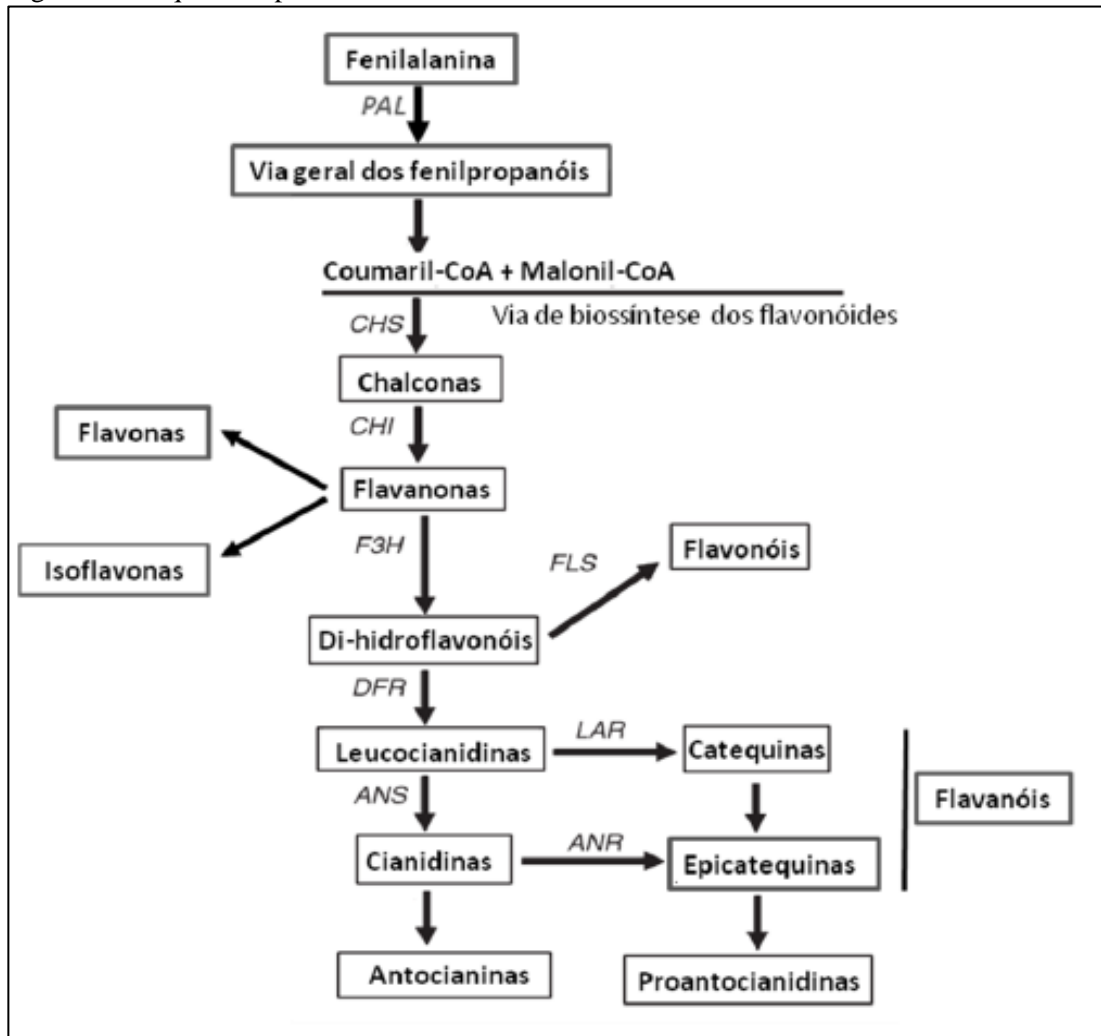
Figura 4 - Estrutura química geral dos flavonoides.



Fonte: VIEIRA, et al. (2008, p. 10).

Diante das inúmeras variações possíveis, os flavonoides também podem ser agrupados em diversas subclasses: flavonóis, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas, flavanonóis e antocianinas (Figura 5) (PIMPÃO, 2009).

Figura 5 - Esquema representativo da via biossintética das classes de flavonóides.



Nota: As principais enzimas representadas desta via biossintética são: fenilalanina amonia liase (PAL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), di-hydroflavonol-4-redutase (DFR), flavonol sintase (FLS), antocianidina sintase (ANS), antocianidina redutase (ANR), leucoantocianidina redutase (LAR).

Fonte: PIMPÃO (2009, p. 5).

As flavonas são encontradas em quantidades reduzidas nos tomates e plantas aromáticas como as mentas. Já em frutos cítricos, como o limão e a laranja, podem ser encontrados em maiores quantidades. As isoflavonas se assemelham às estruturas dos estrogênios, possuindo propriedades pseudo-hormonais e por isso são classificadas como fitoestrogênios. Podem ser encontradas em plantas leguminosas, como a soja (PIMPÃO, 2009).

Os flavanóis, di-hidroflavonóis, estão associados a taninos na madeira. As catequinas, que são unidades monoméricas de flavanóis, são encontradas em diversos tipos de frutos e também podem ser localizadas em vinho tinto, chocolate e chá verde. Catequina e

epicatequina são os principais flavanóis nos frutos, enquanto galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina são encontrados em grandes quantidades em certos tecidos de leguminosas e principalmente no chá (PIMPÃO, 2009).

Quando os flavonoides estão na forma dimérica, oligoméricos ou poliméricos, estes compostos são denominados de proantocianidinas ou taninos condensados. São encontrados em frutos como uvas, pêssegos, maçãs, pêras, caqui, em bebidas como vinhos, cidra, chá, cerveja e, ainda, no chocolate, onde são responsáveis pela sua adstringência (PIMPÃO, 2009).

As antocianinas são pigmentos glicosilados que se encontram dissolvidos no vacúolo das células de tecidos epidermiais das flores e frutos e proporcionam a coloração vermelha, rosa, azul ou roxa. Elas possuem uma elevada capacidade antioxidante já comprovada por diversos estudos realizados (PIMPÃO, 2009).

Testes bioquímicos realizados para identificar o mecanismo de ação dos flavonoides, demonstraram que os compostos inibem uma grande variedade de enzimas. Como por exemplo, a oxigenase prostaglandina-sintetase responsável pela biossíntese de eicosanoides fundamentais na inflamação, sensação dolorosa e reparo tissular. Também inibem a enzima hialuronidase prevenindo a disseminação bacteriana (VIEIRA, et al., 2008).

Na literatura são encontradas várias pesquisas que comprovam a eficácia dos flavonoides na cicatrização de feridas. Süntar et al. (2009) avaliaram a atividade cicatrizante da planta *Colutea cilicica*. Para tal estudo foram utilizados extratos aquosos das flores e frutos desta planta para aplicação em um modelo de excisão tecidual em camundongos até completa cicatrização. Os autores afirmam que os flavonoides, identificados no extrato, são responsáveis pela cicatrização das lesões devido às suas propriedades antimicrobianas e pela elevada capacidade de taxa de epitelização.

Khalil, Afifi e Al-hussaini (2007) avaliaram o efeito cicatrizante dos extratos aquosos de *Inula viscosa*, *Ajuga chia*, *Rubia taenifolia* e *Parietaria diffusa* e do óleo essencial de *Laurus nobilis* em camundongos. Nos extratos de *Inula viscosa*, seguido por *Parietaria diffusa*, *Laurus nobilis* e *Ajuga chia* foram observados as melhores atividades cicatrizantes os quais apresentaram compostos fenólicos/flavonoides, entre outras substâncias, em sua composição conforme os resultados obtidos na análise fitoquímica. O extrato menos ativo foi o de *Rubia taenifolia*, cuja análise fitoquímica não identificou tais compostos.

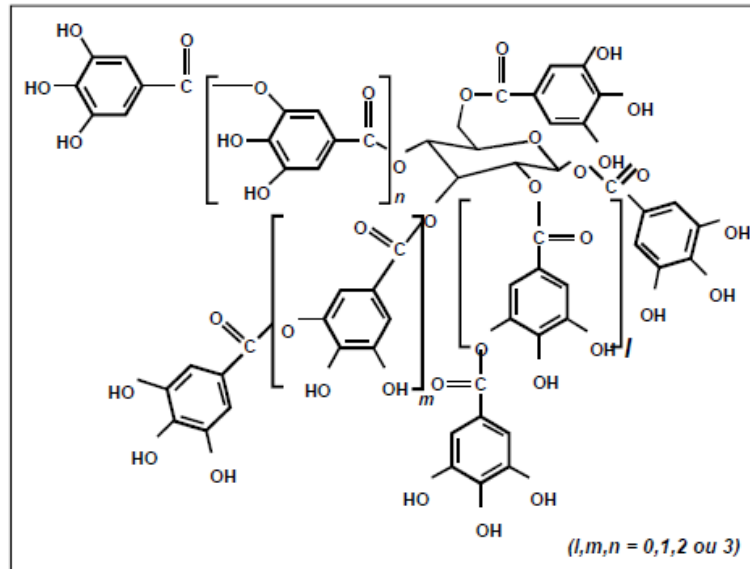
2.5.1.2 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos com alto peso molecular (500 – 3000Da) oriundos do metabolismo secundário das plantas.

Podem ser encontrados nas raízes, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. Eles são muito reativos quimicamente formando pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, o que permite uma grande afinidade de ligação com proteínas. Um mol de taninos é capaz de ligar-se a doze mols de proteínas. Também são capazes de se ligar a aminoácidos e polissacarídeos. Esta capacidade de ligação é possível devido às propriedades que possuem, como baixa solubilidade, moléculas grandes e mobilidade, proporcionando assim ligações hidrofóbicas, iônicas, covalentes e pontes de hidrogênio (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

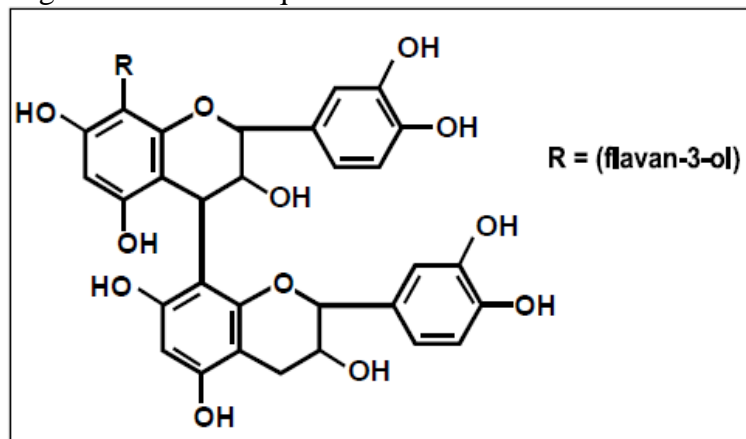
São classificados como hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis (Figura 6) são poliésteres de ácidos fenólicos como o ácido gálico. São constituídos por uma molécula de D-glucose e não são muito abundantes na natureza. Conhecidos também como proantocianidinas (Figura 7), os taninos condensados são constituídos por oligômeros e polímeros de unidades monoméricas de 2-fenilbenzopiranos, onde o radical (R) pode ser monômeros de (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-3-O-galato. Quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico suas ligações interflavânicas são quebradas liberando antocianidinas por ruptura da ligação C-O. Essas antocianidinas podem ser as cianidinas que se denominam como procianidinas. As proantocianidinas dão a característica de adstringência por se ligarem com as proteínas da saliva, precipitam proteínas e possuem grande diversidade estrutural em razão dos padrões de substituições entre unidades flavônicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; NASCIMENTO, 2011).

Figura 6 - Estrutura química de tanino hidrolisável.



Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, (2004, p.72).

Figura 7 - Estrutura química de tanino condensado.



Fonte: BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, (2004, p.74).

Estudos apontam os taninos como inibidores do crescimento microbiano. O mecanismo está associado à formação de complexos entre os taninos e a parede celular das bactérias fazendo com que ocorra a inibição do transporte de nutrientes para a célula ocasionando a morte destas. Outros estudos mostraram que os taninos alteram morfológicamente a estrutura das bactérias. Testes *in vivo* identificaram ação fungicida, antiviral, inibição de enzimas como glicosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (CABRAL FILHO, 2004; QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002).

Franco (2014) desenvolveu e caracterizou membranas de quitosana com casca de banana verde, ricas em taninos condensados, no qual apresentaram resultados inibitórios de

crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As membranas também apresentaram permeabilidade ao vapor d'água, característica esta importante para uma maior eficiência na cicatrização de feridas cutâneas.

Os taninos também estão relacionados no combate a queimaduras, em cortes epiteliais para estancar o sangramento, diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, problemas estomacais, renais e do sistema urinário. Eles possuem estas funções por haver complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e complexação com proteínas, polissacarídeos e aminoácidos (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002).

O efeito anti-inflamatório dos taninos permite a aplicação interna, ajudando a limitar as indicações de gastrite, distúrbios intestinais e úlceras gástrica sendo possível graças à neutralização de enzimas autolíticas. Os taninos também permitem o tratamento de diarreias. A diarreia é causada devido à irritação da enterite ou do intestino delgado provocando até várias mortes em todo o mundo. Os taninos não interrompem o fluxo da substância perturbadora no estômago, mas ajudam a controlar a irritação no intestino delgado (BEELEN; PEREIRA FILHO; BEELEN, 2008).

2.6 UVA E A CULTIVAR JACQUEZ

Em 2014, a produção mundial de uva em volume foi de 74,5 milhões de toneladas ficando em quarta colocada, perdendo para a banana, melancia e maçã (primeiro, segundo e terceiro lugares respectivamente) (PARANÁ, 2017). A plantação das videiras ocupa um espaço total de 715,5 milhões de hectares, no qual 71% são utilizadas para uvas de vinho, 27% para uva de mesa e 2% para uvas passas. A China foi o maior produtor mundial de uvas em 2014 (11.100 milhões de quilos), seguida pelos Estados Unidos (7.700 milhões de quilos), França (6.940 milhões de quilos) e Itália (6.890 milhões de quilos). O Brasil possui uma área aproximada de 18,1 milhões de hectares de plantação. A região Sul é responsável pela maior produção de vinhos finos, já o vale do São Francisco se destaca com a produção de uvas de mesa (MOREIRA, 2015; PROTAS, 2014).

O ciclo de uma videira é dividido em dois sub-ciclos: o vegetativo e o reprodutivo. O sub-ciclo vegetativo varia conforme a cultivar e as condições climáticas do local de cultivo.

Ele compreende as fases de mobilização de reservas, crescimento vegetativo, acúmulo de reservas e repouso vegetativo (dormência) (RODRIGUES, 2009).

A fase de mobilização de reservas tem início pouco antes da manifestação do “choro” até o início da brotação. Nesta etapa, após as plantas passarem pelo período de repouso vegetativo ou dormência, ocorre a ativação da respiração celular, recuperação da absorção de água e de elementos minerais. Assim, haverá a nutrição das pontas de crescimento (gemas) para dar início ao desenvolvimento e brotação. O “choro” antecede a brotação e consiste na perda de líquido por cortes realizados em função da poda. Na fase de crescimento vegetativo as escamas que cobrem as gemas se separam dando origem à brotação e ao desenvolvimento dos ramos. A fase de acúmulo de reservas se inicia no “veraison”, quando há uma parada temporal do crescimento das bagas, perda progressiva da clorofila e início da coloração característica dos frutos, e termina com a queda natural das folhas. E, por fim, tem-se a fase de repouso vegetativo, no qual ocorre a queda das folhas no final do ciclo e a entrada da planta em dormência reduzindo sua atividade metabólica (RODRIGUES, 2009).

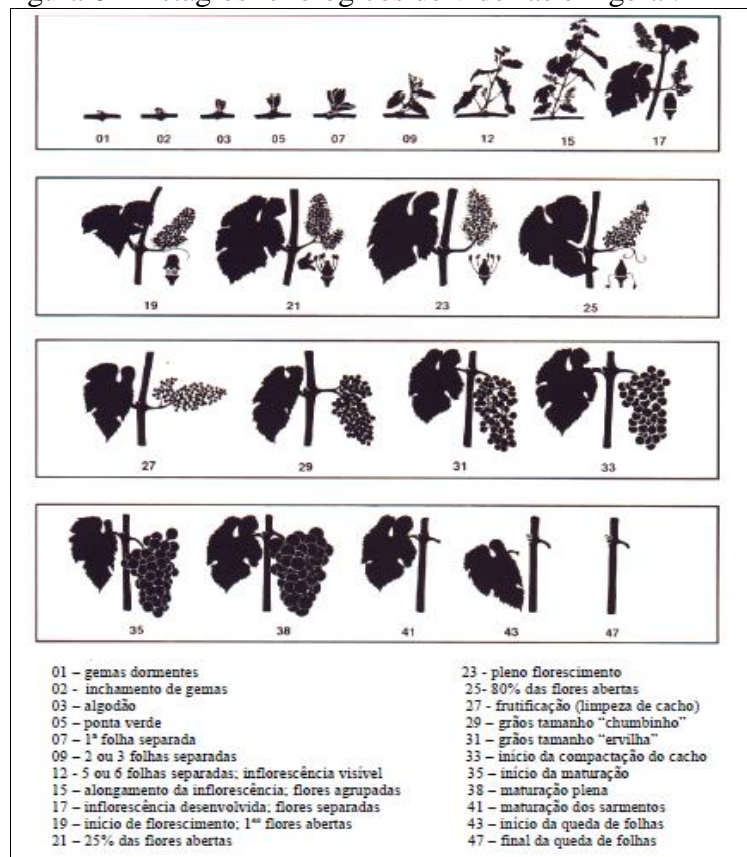
O sub-ciclo reprodutivo ocorre em paralelo com o sub-ciclo vegetativo. Esta etapa é realizada sobre os ramos originados de uma gema mista do ano anterior. Sobre este ramo ocorre também a preparação e a diferenciação das gemas prontas e das mistas para o ano seguinte. Este sub-ciclo compreende as fases de indução, iniciação e diferenciação floral; florescimento, polinização e fertilização; fixação e desenvolvimento de frutos; e maturação e colheita (RODRIGUES, 2009).

Na fase de indução, iniciação e diferenciação são produzidas as futuras estruturas sobre os meristemas apicais. Estes meristemas sofrem mudanças fisiológicas e transformam-se da forma vegetativa para reprodutiva originando o primórdio floral ou de inflorescência, até que as gemas entrem em dormência. Após a brotação das gemas seu processo de desenvolvimento continua até a formação das flores. Nas fases de florescimento, polinização e fertilização tem-se início a formação dos cachos de uva. Terminada a floração, a fertilização ocorre após dois ou três dias da polinização. Em seguida acontecem as fases de fixação e desenvolvimento de frutos, no qual, após a polinização, o ovário da flor inicia a formação do fruto. A fase de maturação abrange o período que vai da mudança de cor “veraison” até a colheita. Pode ocorrer em um intervalo entre 30 a 70 dias, dependendo da cultivar e da região de cultivo. Com a maturação ocorre o aumento da baga, variação hormonal, acúmulo de açúcares, diminuição da acidez, acúmulo de pigmentos, variação de polifenóis, amolecimento das

bagas, variação em compostos nitrogenados e minerais, síntese de substâncias aromáticas e modificação no sabor. A colheita deve ser realizada quando a uva atingir o estágio ótimo de consumo, considerando suas propriedades organolépticas, já que ela não amadurece após a colheita. Normalmente, utiliza-se o teor de açúcar como indicativo de colheita baseando-se na medição em um refratômetro (RODRIGUES, 2009).

De acordo com a classificação da *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (1984), os estágios da videira são apresentados na Figura 8 (ELIAS, 2008).

Figura 8 – Estágios fenológicos de videiras em geral.



Fonte: ELIAS (p.8, 2008).

Segundo Elias (2008), o teor de taninos condensados varia durante a maturação da uva, sendo que os maiores valores são observados na fase chumbinho, diminuindo nas fases seguintes (início e final do pintor e a maturação). ABE e colaboradores (2007) afirmam que o açúcar acumulado durante a maturação, serve de base para a origem e aumento de antocianinas (quanto mais escura a uva maior o teor) e outros compostos relacionados ao aroma. Fraige (2012) relata que os flavonóis nas bagas de uva é baixa antes do *veraison*

(início da fase pintor) e há um aumento durante seu desenvolvimento. Dentre os flavanóis as catequinas, (+)-catequina e (-)-epicatequina, que mais se encontram nas uvas, possuem uma concentração baixa nas bagas em formação alcançando um máximo durante o *veraison* e diminuindo rapidamente nas maduras.

Segundo Fournand e colaboradores (2006), os taninos condensados se acumulam antes do *veraison*. Se o teor e/ou a composição destes sofrem variação nas cascas durante a maturação, ainda não é possível afirmar. Alguns autores observaram um aumento nos taninos totais após a *veraison* e outros uma diminuição. Entretanto, os métodos de análise utilizados não eram sempre os mesmos. Da mesma forma, tanto um aumento quanto diminuição do grau médio de polimerização já foi citado.

O longo tempo de cultivo da uva permite a existência de diferentes tipos de cultivares. A cultivar Jacquez (*Vitis bourquina*) também é conhecido como cultivar Seibel Pica Longa e teve origem na Carolina do Sul, Estados Unidos. Geralmente, seu brotamento tem início entre 7 a 17 de setembro e amadurece entre 15 de janeiro a 25 de fevereiro. Ela possui um potencial produtivo de 25 a 30 t/ha e um bom potencial de concentração de açúcares, variando de 16 a 20°Brix e uma acidez total média de 153 meq/L. Sua casca é muito fina dificultando seu transporte, por essa razão, o ideal é que ela seja vinificada logo após sua colheita. Produz um mosto muito bom, com coloração (violácea) e extrato fortes. Entretanto, sua cor não é duradoura nos vinhos e nos sucos. Além de boa produtividade, a cultivar é resistente às moléstias fúngicas, como o oídio e míldio, e ao ataque da filoxera (GIOVANNINI, 2014; SATO et al., 2008).

Ela é muito utilizado na produção de vinhos tradicionais da Ilha da Madeira, nos Açores e em partes das Canárias e de Cabo Verde. Devido à sua alta resistência a doenças serviu também como porta-enxertos no sul da França e da Península Ibérica (GALET; GRISARD, 2015).

Em 1935, na França, a cultivar foi interdita, assim como o comércio dos vinhos provindos dela. A proibição se deu em razão da elevada concentração de metanol (tóxico para o nervo óptico) em comparação com os vinhos produzidos a partir da espécie *Vitis vinífera*. Contudo, estudos recentes apontaram que o vinho Jacques contém uma taxa de metanol comparável aos vinhos Merlot, Cabernet Sauvignon e Syrah não sendo prejudicial para a saúde, ao contrário são benéficos, pois apresentam um alto teor de resveratrol (GALET; GRISARD, 2015).

A quem diga que essa proibição está relacionada com o contexto político-econômico do início do século XX. Nessa época, a superprodução de vinhos levou a um questionamento da cultura dos cultivares muito produtivos e que não necessitavam de tratamentos fitossanitários. Havia a necessidade de preservar uma imagem de qualidade para a viticultura europeia, resultando na interdição de vinhos produzidos a partir de espécies que não fossem *Vitis vinífera*. Apesar desta interdição, a cultivar persiste em diversas regiões europeias incluindo regiões montanhosas do Lure na França (GALET; GRISARD, 2015).

A uva Jacquez foi introduzida pela primeira vez no Brasil em 1870 na cidade de Campinas-SP pelo Dr. Reinhardt. Em 1883 foi reintroduzida pelo Dr. Pereira Barreto trazendo a fruta da França. No ano de 1912, a uva já podia ser encontrada no Rio Grande do Sul, porém só ficou mais conhecida em 1940. Nos dias atuais ela pode ser encontrada também nos estados de Santa Catarina e sul de Minas Gerais (CAMARGO, 2007).

Por ser encontrada na região do sul de Minas Gerais, esta variedade foi escolhida para a realização do presente estudo e assim analisar seu teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, verificar se possui propriedades propícias para a cicatrização de feridas.

2.6.1 Compostos fenólicos presentes em uvas

Uma grande variedade de compostos fenólicos é encontrada em produtos secundários da uva, tanto em seu suco quanto em seu vinho. A casca e a semente da fruta apresentam em ordem crescente de concentração: os flavonóis, os ácidos fenólicos, as catequinas e as proantocianidinas. Também é encontrado o resveratrol que vem atraindo uma atenção especial por apresentar uma correlação entre o consumo moderado de vinho e a diminuição de doenças cardiovasculares. As antocianinas são encontradas somente nas cascas aparecendo após o “*veraison*”. (JORDÃO, 2000; SOARES et al., 2008).

Diversos benefícios à saúde são atribuídos aos compostos fenólicos. Estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro* afirmam que eles contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, osteoporose e pedras renais (GRASES, 2015).

As antocianinas são responsáveis pela coloração e aspectos sensoriais em uvas tintas. Elas se desenvolvem durante a maturação dos frutos e seu teor é afetado pelas condições de crescimento da baga. Possuem propriedades antioxidantes e antimutagências. A catequina, epicatequina e galoepicatequina representam os flavan-3-ol e são responsáveis pela

adstringência em vinhos. Estes monômeros são sintetizados antes do *veraison* e sofrem alteração durante o amadurecimento dos frutos. Elas atuam na proteção de doenças cardiovasculares ateroscleróticas. Os flavonóis caempferol, quercetina e mircetina são encontrados em vinhos, mas na baga estão presentes como os correspondentes glucosídeos, galactosídeos e glucoronídeos (ADAMS, 2006; ANJO, 2004; KENNEDY; SAUCIER; GLORIES, 2006).

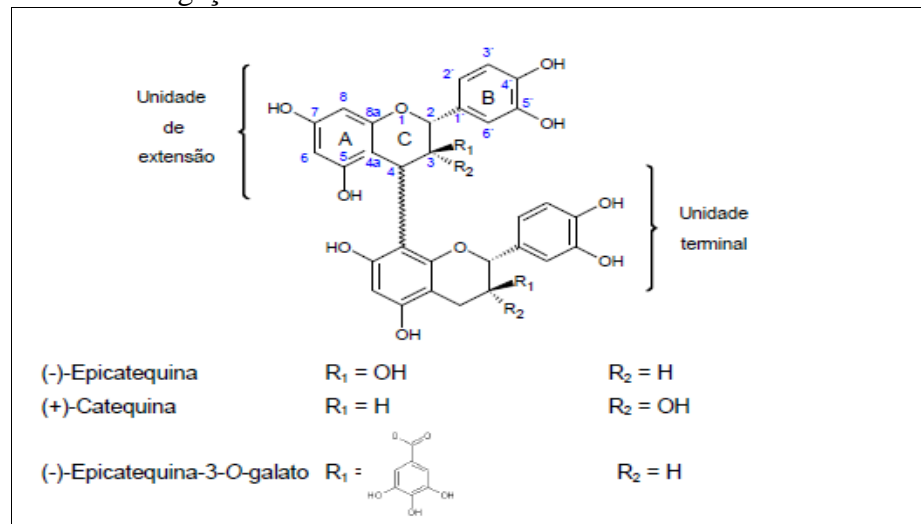
As flavonas, flavononas, flavonóis, catequinas e antocianinas protegem contra a oxidação do LDL-colesterol, pois reduzem os radicais livres e quelação de íons metálicos. Eles também atuam contra radicais livres, alergias, inflamações, úlceras, virose, tumores e hepatotoxinas (ANJO, 2004).

A classe mais abundante de compostos fenólicos presentes em bagas de uva são os polímeros de flavan-3-ols que são encontrados nas camadas hipodérmicas da casca e nas sementes do fruto. O tamanho médio dos taninos encontrados na casca é muito maior do que os taninos presentes nas sementes. Outra diferença está no fato de que os taninos da casca contêm subunidades de epigallocatequina e os taninos das sementes possuem maior proporção de galato de epicatequina, o que não se encontra na casca. Em geral, os taninos das uvas são muito diversificados e variam em tamanho de dímeros, trímeros e até oligômeros com mais de trinta subunidades (ADAMS, 2006; KENNEDY; SAUCIER; GLORIES, 2006).

Diferente dos taninos hidrolisáveis, os condensados aparecem naturalmente em uvas. Os hidrolisáveis estão presentes na madeira e, desta forma, aparecem em vinhos armazenados e envelhecidos em barris. Assim, os taninos condensados se concentram principalmente na casca e na superfície das sementes. Seus teores crescem rapidamente da formação da baga até próximo da fase do pintor. Nesta fase as antocianinas começam a aparecer e as proantocianidinas decrescem e se estabilizam quando se aproximam da fase de maturação tecnológica (NASCIMENTO, 2011; RICCI et al., 2017).

No gênero *Vitis* são observados os monômeros (+)-catequina, (-)-epicatequina, galato de (-)-epicatequina e galocatequina (Figura 9). Localizam-se nos engaços e na casca, e já foram localizados monômeros e dímeros na polpa na cultivar *Alicante Bouschet* (NASCIMENTO, 2011).

Figura 9 - Estrutura de dímeros de proantocianidinas contendo uma ligação interflavânica C4-C8.



Fonte: NASCIMENTO (2011, p. 4).

Várias pesquisas apontam a presença de compostos fenólicos incluindo os flavonoides e taninos em diversas variedades de uvas. Em uma pesquisa sobre compostos fenólicos Mota e colaboradores (2009), encontraram uma média de 54,61 mg EAG/g somando a casca e a semente de bagas maduras da cultivar Folha de Figo sobre diferentes porta-enxertos. A solução extratora utilizada foi o metanol acidificado (HCl 1%).

Em outro estudo, Mota e colaboradores (2010) estudaram a composição físico-química de uvas para vinho fino em ciclos de verão e inverno. Neste estudo as cultivares analisadas foram Pinot Noir, Tempranillo, Merlot, Cabernet Sauvignon, Syrah, Chardonnay e Sauvignon Blanc, todas coletadas no estágio maduro e também utilizaram como solução extratora o metanol acidificado com HCl 1% para a análise de fenóis totais. A variedade que apresentou maior teor de fenólicos totais foi a cultivar Pinot Noir apresentando uma média de 143,15 mg EAG/g de semente e casca. Por outro lado, a cultivar que apresentou um menor teor foi o cultivar Sauvignon Blanc com uma média de 69,55 mg EAG/g de semente e casca.

Regina e colaboradores (2010), avaliaram a influência da altitude na qualidade das uvas da cultivar Chardonnay e Pinot Noir, em Minas Gerais. Para a análise de fenóis totais a solução extratora utilizado foi o metanol acidificado com HCl 1%, as amostras foram coletadas no final da maturação. A cultivar Chadonnay apresentou uma média de 102,19 mg EAG/ mg de semente e casca no município de Caldas - MG e uma média de 89,76 mg EAG/g de semente e casca no município de Cordislândia - MG. Com relação à cultivar Pinot Noir no

município de Caldas - MG foi encontrada uma média de 135,55 mg EAG/g de semente e casca e no município de Cordislândia - MG uma média de 129,95 mg EAG/g de semente e casca.

Abe e colaboradores (2007), pesquisaram o teor de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O maior e o menor teor de flavonóis foi encontrado na cultivar Folha de Figo no valor de 1,82 mg/ g de base úmida e na cultivar Moscato Embrapa no valor de 0,045 mg/ g de base úmida, respectivamente.

Dal'osto (2012), determinou o teor de compostos fenólicos totais presente na casca e semente de uva da cultivar Syrah madura em solução de metanol acidificado a 1% HCl. A pesquisa apontou uma quantidade de 23,723 mg/g casca e 49,692 mg/g semente.

Regina e colaboradores (2010) analisaram o teor de antocianinas presente na cultivar Pinot Noir maduro nos municípios de Caldas e Cordislândia situados em Minas Gerais. A solução extratora utilizado foi metanol acidificado a 1% HCl. Foi encontrado, respectivamente, os valores de 3,54 mg maldivina/g casca e 2,58 mg maldivina/g casca.

Mota e colaboradores (2010), também analisaram o teor de antocianinas em diferentes cultivares de uvas finas em regime de dupla poda. A solução extratora utilizado foi metanol acidificado a 1% HCl. A cultivar que apresentou maior teor foi a Syrah, apresentando uma média de 8,0 mg malvidina/g casca.

Valverde e colaboradores (2012) analisaram o teor de taninos condensados nas cascas e sementes de três cultivares maduros distintos: Monastrell, Cabernet Sauvignon e Syrah. Somando os teores encontrados nas sementes e cascas têm-se os valores de 37,15; 35,40 e 29,94 mg/ g casca e semente, respectivamente.

Dal'osto (2012), também determinou a quantidade de compostos fenólicos presente na casca e semente da cultivar Syrah madura em metanol acidificado 1% HCl. A pesquisa encontrou um valor de 73,41 mg/g casca e semente.

Kennedy e colaboradores (2000), estudaram a variação de taninos condensados em sementes de uva durante o amadurecimento da cultivar Shiraz. O maior teor foi encontrado antes da fase pintor, alcançando um pico de aproximadamente 2,2 mg/g. Após este estágio o teor se manteve constante por um curto período de tempo, obtendo em seguida um rápido declínio até chegar ao valor de 1,27 mg/g na etapa final da maturação.

Soares e colaboradores (2008), determinaram a atividade antioxidante de uvas do cultivar Niágara e Isabel por meio dos métodos ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-

ácido sulfônico) e DPPH. A média de valores de atividade antioxidante correlaciona-se de forma positiva com a média dos valores de polifenóis e antocianinas para o método DPPH. No método ABTS para a uva Isabel, os compostos fenólicos mostraram maior contribuição na atividade antioxidante do que as antocianinas. Já para as uvas Niágara, as correlações entre polifenóis e antocianinas são próximas.

2.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Uma fase importante e preparatória que antecede a caracterização e identificação de compostos presentes em uma amostra é a etapa de extração. Os métodos de extração não são padronizados. Há aqueles que são tidos como tradicionais, como as extrações de sólido-líquido ou Soxhlet que foram usadas durante várias décadas. Entretanto, este último consome muito tempo e requer grandes quantidades de solventes, além disso, pode haver perda de polifenóis durante o processo devido à ionização, hidrólise e oxidação que ocorre em razão do aquecimento e ebulição (ROCKENBACH et al., 2008).

Com o avanço da química, algumas novas técnicas surgiram e outras foram aperfeiçoadas obtendo desta forma sucesso na extração de fenóis em uvas. Essas técnicas reduzem o tempo de extração e a quantidade de solvente orgânico utilizada, aumentando assim, a sustentabilidade do processo e mantendo os compostos de interesse (DOWNEY; HANLIN, 2010; ROCKENBACH et al., 2008).

A técnica mais aplicada para extração de polifenóis em uvas é a extração sólido-líquido (maceração). Neste processo os analitos contidos em uma matriz sólida migram para um solvente que está em contato com a matriz. O tipo de solvente, tamanho da partícula, temperatura e tempo de extração são variáveis que influenciam a eficiência da extração. O tipo de solvente em especial é um dos principais fatores que afetam essa eficácia. Os polifenóis possuem uma natureza polar, logo eles são facilmente solubilizados em meio prótico polar como em soluções hidroalcoólicas (DOWNEY; HANLIN, 2010; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; ROCKENBACH et al., 2008; VERGARA-SALINAS et al. 2013).

Os solventes mais empregados são metanol, etanol, acetona e água variando sua eficiência de extração. Quando se utiliza os álcoois na extração há uma liberação progressiva de polifenóis contidas nas uvas em função do tempo. A escolha de um solvente ideal é

complexa, uma vez que pesquisas publicadas não chegaram a uma conclusão. É necessário levar em consideração as características da uva, ou seja, a variedade a ser trabalhada, as condições de plantio, colheita, além das condições de extração mencionados acima como temperatura, tempo e concentração do solvente (DOWNEY; HANLIN, 2010; FONTANA, ANTONIOLLI e BOTTINI, 2013; ROCKENBACH et al., 2008; VERGARA-SALINAS et al. 2013).

A mistura de solvente/água aumenta a permeabilidade das células, permitindo uma melhor transferência de massa por difusão molecular bem como a recuperação de compostos solúveis em água. Pesquisas que realizaram a extração com o sistema etanol/água apresentaram resultados melhores em comparação com acetona ou metanol/água, além deste ser mais acessível e ter um custo reduzido (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; VERGARA-SALINAS et al. 2013;).

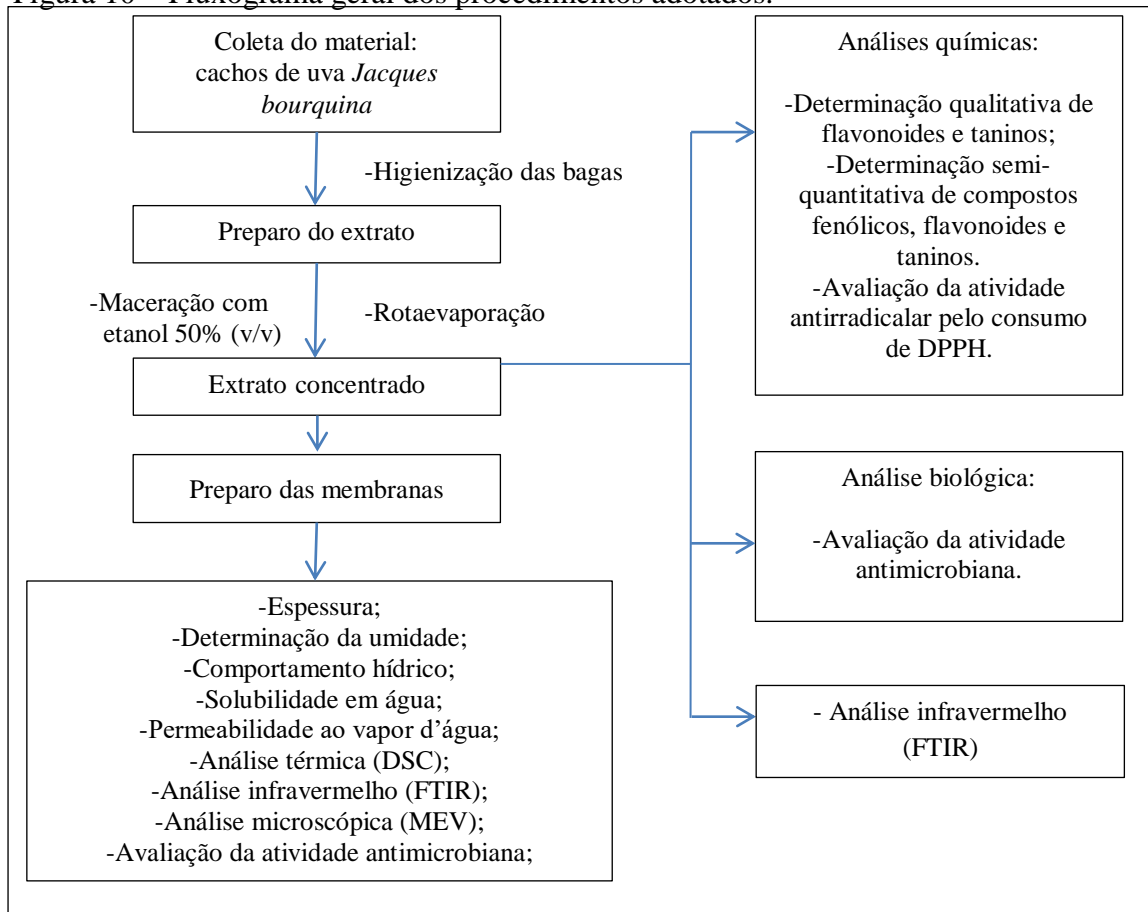
3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir estão descritas as metodologias que foram empregadas na obtenção do extrato de uva Jacques e na síntese das membranas de quitosana (QUIT) e quitosana incorporada com extrato (QE), assim como suas análises de caracterização.

3.1 METODOLOGIA GERAL

O fluxograma geral dos procedimentos adotados está representado na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma geral dos procedimentos adotados.



Fonte: Da autora.

3.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS DA BAGA DE UVA

As uvas utilizadas na pesquisa foram da cultivar Jacquez (*Vitis bourquina*) obtidas em vinhedo localizado em Andradas - MG (22°S e 46°W, a 913 m de altitude), com temperatura média de 19°C e precipitação pluviométrica de 1579 mm anuais.

As uvas da safra 2016/2017, foram colhidas com 110 dias em um ciclo brotação/colheita de 158 dias aproximadamente (Figura 11), estando assim na fase chumbinho (de acordo com a classificação da *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (1984)). O início do processo de extração foi realizado no mesmo dia.

Figura 11 – Uva Jacquez (*Vitis bourquina*).



Fonte: Da autora.

Inicialmente, os cachos de uva foram higienizados com água corrente seguida de desengace manual. Na sequência 1,6 kg de bagas foram pesados e processados em liquidificador junto à adição de uma solução extratora hidroalcoólica de etanol 50% v/v. A mistura foi despejada em um recipiente âmbar que foi encoberto com papel alumínio, para proteger da luz e deixado em repouso para maceração por uma semana, recebendo agitação em dias alternados (Figura 12).

Figura 12 – Maceração hidroalcoólica da uva.



Fonte: Da autora.

Após o período de maceração, a solução foi filtrada em algodão e levada para o rota evaporador a 50°C a fim de remover o solvente etanol e, com adição de N-butanol concentrado foi possível remover parte da água. Neste processo utilizou-se o rotaevaporador ALPAX do Laboratório Multidisciplinar de Ciências das Engenharias do *campus* Poços de Caldas da UNIFAL-MG. O resíduo remanescente contido no balão foi retirado adicionando metanol concentrado e levado para o ultrassom. Este solvente também foi evaporado colocando a mistura sobre uma chapa aquecedora, resultando assim em um extrato concentrado. Durante todos os intervalos para a obtenção do extrato e até mesmo após sua obtenção, o mesmo foi armazenado em congelador a uma temperatura de -4°C.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

O extrato foi caracterizado por meio de análises qualitativas e semi-quantitativas que estão descritas a seguir.

3.3.1 Análises qualitativas

O extrato foi submetido a testes preliminares qualitativos com o intuito de detectar a presença de flavonoides e taninos. Os ensaios foram realizados em duplicatas, sempre partindo da utilização de aproximadamente 40mg de extrato de uva, cada.

3.3.1.1 Flavonoides

Reação de Shinoda

Devido a presença das funções oxigenadas vicinais, muitos compostos flavonoides podem realizar uma ligação com íons metálicos. Desta forma, a presença de flavonóides é indicada pelo desenvolvimento de uma coloração variando de laranja a vermelho dentro de 1 a 2 minutos (SCHOLZ e LIEBEZEIT, 2006).

Para este ensaio o extrato foi, inicialmente, solubilizado em 2mL de metanol puro. Em seguida, foi adicionado 1 fragmento de magnésio metálico seguido de 1mL de ácido clorídrico concentrado.

3.3.1.2 Taninos

Reação com gelatina

Em um tubo de ensaio foi adicionado o extrato juntamente com 2mL de metanol puro e uma gota de ácido clorídrico 10%. Em seguida, gota a gota de solução de gelatina a 2,5% foi adicionado ao tubo na ausência de agitação. O aparecimento de turbidez ou precipitado da solução indica a ligação da gelatina (proteína) com os taninos presentes na amostra (DA PUREZA, 2003).

Reação com água de bromo

Em um tubo de ensaio foram adicionados o extrato juntamente com 2mL de metanol puro e algumas gotas de água de bromo. Os taninos condensados formam imediatamente um precipitado amarelado ou avermelhado (DA PUREZA, 2003).

Reação com cloreto férrico

Ao tubo de ensaio foram adicionados o extrato, 2mL de metanol puro, 5mL de água destilada e 3mL de solução aquosa de cloreto férrico 2%. A coloração azul indica taninos hidrolisáveis e a verde taninos condensados (DA PUREZA, 2003).

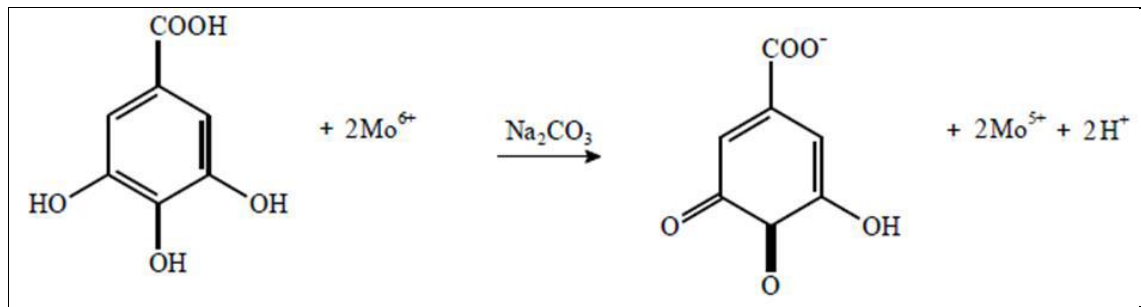
3.3.2 Análises semi-quantitativas do extrato

As análises semi-quantitativas foram realizadas a partir de uma solução mãe no qual o extrato de uva foi diluído em etanol absoluto a fim de se obter uma concentração 1000 µg/mL, seguindo a metodologia proposta por Bastos (2015). Tais análises foram realizadas no *campus* de Alfenas da UNIFAL-MG.

3.3.2.1 Compostos Fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado por espectrofotometria utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu. Utiliza-se preferencialmente o reagente de Folin-Ciocalteu para semi-quantificações de compostos fenólicos por meio da técnica espectrofotométrica. O reagente é a mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstênio, onde o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação VI, apresentando uma coloração amarela. Quando em contato com compostos fenólicos e solução de sódio (Na_2CO_3), ocorre uma reação de oxidorredução e formam-se ânions fenolatos. Estes ânions, na presença do reagente de Folin-Ciocalteu, geram complexos de molibdênio e tungstênio, com coloração azul no qual, por meio do espectrofotômetro, lê-se um determinado valor de absorbância. A reação pode ser observada na Figura 13 (BASTOS, 2015).

Figura 13 – Reação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu.



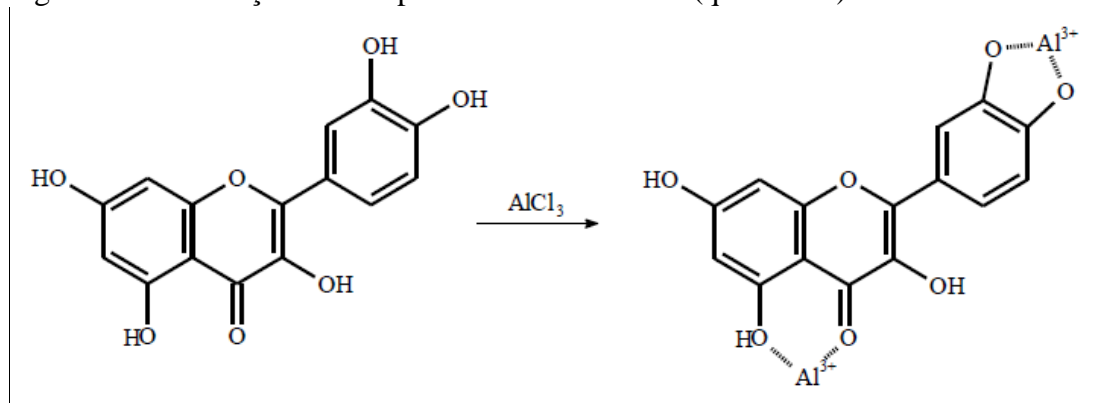
Fonte: BASTOS (2015, p. 110).

A 0,5 mL de amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin–Ciocalteu 10% (v/v) e 2 mL de carbonato de cálcio 4% (m/v). Após a adição dos reagentes, os tubos foram agitados e deixados em repouso por 2h ao abrigo de luz. Os mesmos procedimentos foram utilizados para a construção da curva de calibração, utilizando-se como padrão o ácido gálico em solução etanólica, nas diluições de 6,5; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. A absorbância foi lida no espectrofotômetro UV-VIS Biospectro SP-220 a 750 nm (correspondente ao pico de absorção dos óxidos de molibdênio e de tungstênio). O branco foi preparado adicionando-se todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto. A quantidade de compostos fenólicos no extrato foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração. Os valores foram expressos como equivalentes de ácido gálico – EAG (mg de ácido gálico/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata (BASTOS, 2015).

3.3.2.2 Flavonoides

Um método espectrofotométrico muito empregado na determinação de flavonoides constitui-se na propriedade do cátion alumínio (Al^{3+}) em formar complexos estáveis com os flavonoides em meio alcoólico (etanol ou metanol). A leitura ocorre em um comprimento de onda onde os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas, diferentes dos flavonoides, não absorvem em presença de cloreto de alumínio, AlCl_3 (Figura 14) (BASTOS, 2015).

Figura 14 - Formação do complexo entre flavonoide (quercetina) e o alumínio.



Fonte: BASTOS (p. 111, 2015).

A 0,5 mL de amostra, foram adicionados 1,5 mL de etanol absoluto, 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio hexaidratado 10% (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio 1,0 M. Em seguida, o volume da solução foi ajustado para 5 mL com 2,8 mL de água destilada. Após a adição dos reagentes, os tubos foram agitados e deixados em repouso por 30 minutos. Os mesmos procedimentos foram utilizados para a construção da curva de calibração, utilizando-se como padrão a quercetina em solução etanólica, nas concentrações de 2; 5; 10; 20; 40; 50; 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A absorbância foi lida no espectrofotômetro UV-VIS Biospectro SP-220 a 425 nm (correspondente ao pico de absorção do complexo flavonoide-alumínio). O branco foi preparado adicionando-se todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto. A quantidade de flavonóides no extrato foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração. Os valores foram expressos como equivalentes de quercetina – EQ (mg de quercetina/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata (BASTOS, 2015).

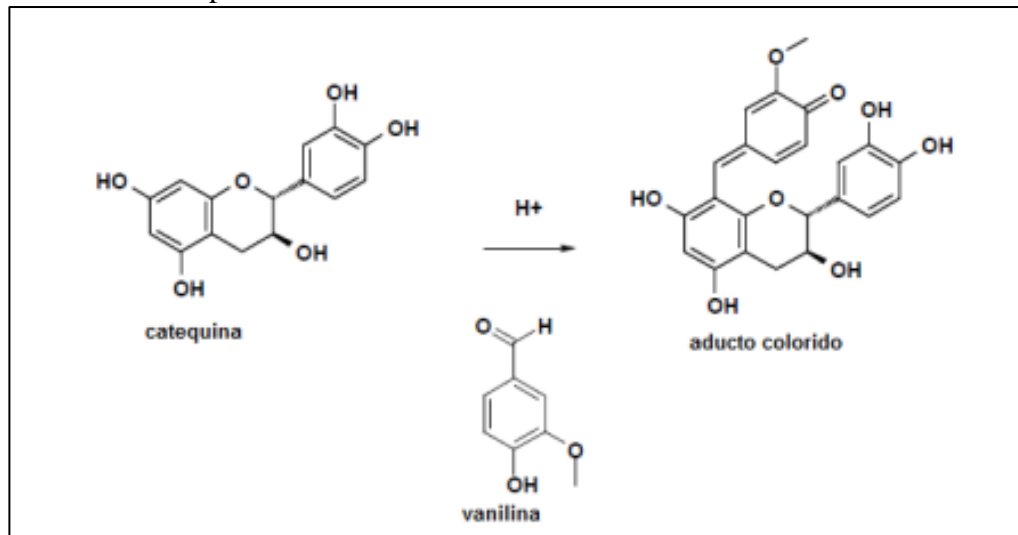
3.3.2.3 Taninos condensados

Vários métodos são utilizados para quantificar a presença de taninos em vegetais. Tais métodos são por precipitação de metais ou proteínas e por métodos colorimétricos. Estes últimos são utilizados para quantificar grupos específicos de taninos (CABRAL FILHO, 2004).

A reação com a vanilina envolve a reação do aldeído aromático com o anel meta substituído por grupos hidroxilas dos flavonóis produzindo um composto vermelho com absorvância máxima a 500 nm (Figura 15). Para se ter um bom resultado, o tipo de solvente, a

concentração dos taninos, a natureza do ácido, o tempo de reação, a temperatura e a concentração da vanilina são fatores primordiais (NASCIMENTO, 2011).

Figura 15 - Reação da vanilina com 3-flavanól monomérico produzindo um composto vermelho com absorvância máxima a 500 nm.



Fonte: NASCIMENTO (2011, p. 9).

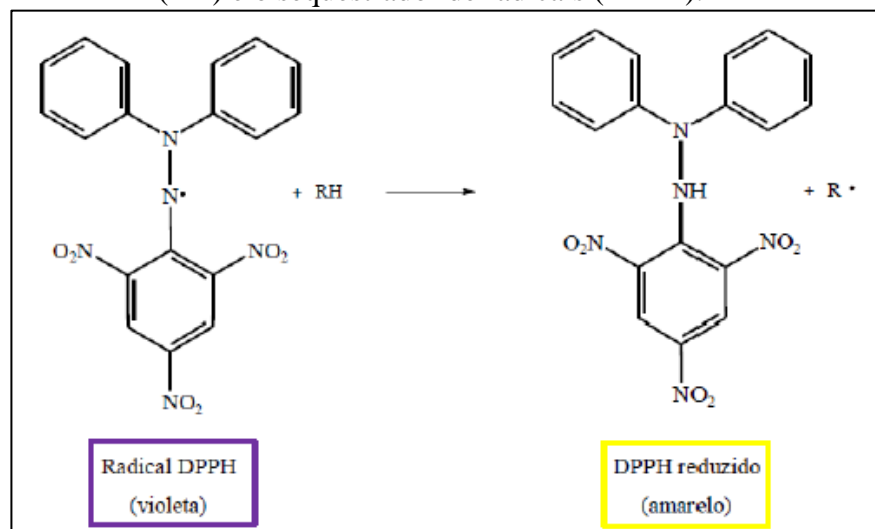
A 1 mL de amostra, foram adicionados 0,5 mL de solução de vanilina 1% (m/v) e 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Após a adição dos reagentes, os tubos foram agitados e mantidos em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Os mesmos procedimentos foram utilizados para a construção da curva de calibração, utilizando como padrão a catequina em solução etanólica, nas concentrações de 2; 5; 10; 20 e 40 µg/mL. A absorvância foi lida no espectrofotômetro UV-VIS Biospectro SP-220 a 510 nm. O branco foi preparado adicionando-se todos os reagentes e 1 mL de etanol absoluto. A quantidade de taninos condensados no extrato foi determinada por interpolação da absorvância das amostras contra a curva de calibração. Como o valor médio de absorvância extrapolou os valores de absorvâncias médios da curva de calibração, foi necessário diluir a amostra para que fosse possível se enquadrar. Para isto, foram pesados 25 mg de amostra diluídos em 50 mL de etanol, obtendo-se assim uma concentração de 500 µg/mL. Os valores foram expressos como equivalentes de catequina – EC (mg de catequina/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata (ROCHA et al., 2011).

3.3.3 Atividade antirradicalar (DPPH)

Para análise de avaliação da atividade antirradicalar, o método usualmente empregado é o DPPH. Com nomenclatura 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, o DPPH é um radical estável de coloração púrpura que quando reduzido pelo composto antirradicalar, gera o difenil-picrilhidrazina, de coloração amarela. O ensaio foi realizado através do monitoramento do sequestro de radicais DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila) pelos componentes das amostras, tendo como consequência o decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. A reação está representada na Figura 16 (BASTOS, 2015).

Para elucidar melhor os resultados, costuma-se apresentar a concentração efetiva necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução, denominado EC_{50} . Desta forma, fica fácil e clara a interpretação dos resultados e tal apresentação é muito utilizada na análise de compostos antirradicalares obtidos de frutos e extratos vegetais. Portanto, quanto menor o valor de CE_{50} , maior será a atividade antirradicalar da amostra analisada (BASTOS, 2015).

Figura 16 – Reação de oxirredução entre a molécula antirradicalar (RH) e o sequestrador de radicais (DPPH).



Fonte: BASTOS (p. 116, 2015).

Para tal análise, foram preparadas soluções da amostra em etanol nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$. Como padrões para a construção da curva de calibração foram utilizadas soluções de ácido gálico e quercetina nas mesmas concentrações das amostras. A 2 mL das amostras foram adicionados 0,5 mL de solução do radical DPPH 0,5mM. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz. As

absorbâncias foram lidas no espectrofotômetro UV-VIS Biospectro SP-220 a 510 nm. O branco preparado constituiu de todos os reagentes e 2 mL de etanol absoluto. O zero de absorbância foi ajustado com 2 mL de etanol absoluto (BASTOS, 2015).

A porcentagem de radicais DPPH sequestrados foi calculada a partir da Equação 1.

$$\text{Sequestro DPPH (\%)} = \left[\frac{(Ab - Aa)}{Ab} \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde: Ab é a absorbância do branco da amostra e Aa é a absorbância da amostra.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em % de sequestro do radical DPPH e pela concentração que representa o sequestro de 50% de radical DPH.

3.3.4 Análise de infravermelho (FTIR)

O extrato de uva produzido foi analisado por espectroscopia de infravermelho (infravermelho por transformada de Fourier - FTIR), técnica na qual a luz infravermelha é passada pela amostra possibilitando a identificação de compostos orgânicos e a investigação da composição de uma amostra (FRANCO, 2014). O extrato de uva foi analisado para identificar os grupos funcionais presentes e assim consequentemente apontar os possíveis compostos fenólicos existentes.

O equipamento utilizado foi o Agilent Technologies modelo Cary 630 do Laboratório Multiusuário do Programa de pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do *campus* de Poços de Caldas da UNIFAL-MG. A amostra foi inserida diretamente no equipamento, sem a necessidade de um preparo prévio para leitura. Os espectros foram coletados em um intervalo entre 650 a 4000 cm^{-1} .

3.3.5 Atividade antimicrobiana

A análise do comportamento antimicrobiano foi realizada empregando duas concentrações: extrato concentrado e na concentração de 5mg/mL a ser utilizada na preparação das membranas.

Os testes foram realizados em triplicatas. Placas Petri contendo 30 mL do meio de cultura Agar Miller Hinton sólido foram incubadas a 37°C por 24 horas e discos de papel filtro, de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro, foram expostas em luz UV por meia hora cada lado. Estes processos foram necessários para certificação de ausência de contaminação indesejada nos materiais utilizados.

Após esse período, com o auxílio de uma alça de drigalski, foi espalhado uniformemente sobre a superfície da placa Petri cerca de 10 µL da cultura da bactéria *Staphylococcus aureus* (10⁸ células/mL). Logo em seguida, o extrato de uva concentrado foi colocado com auxílio de uma pinça flambada sobre discos de papel filtro previamente depositados sobre as placas Petri. Da mesma forma fez-se com o controle positivo, no qual foi utilizada a solução de clorexidina a 0,12%. As placas, não invertidas, foram colocadas na estufa a 37°C por 24 horas. Para a análise dos resultados, foi observado se houve a formação do halo de inibição ao redor da amostra (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003).

A análise do extrato na concentração de 5mg/mL foi realizada utilizando os mesmos procedimentos, alterando-se somente os microrganismos que podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Microrganismos utilizados na análise antimicrobiana.

Classificação do microrganismo	Nome científico	Classificação Gram
Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positiva
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Micrococcus luteus</i>	
Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	Negativa
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	
Fungo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—————
	<i>Candida albicans</i>	

Fonte: Da autora.

3.4 PREPARO DAS MEMBRANAS

Para o preparo das membranas utilizou-se a quitosana em pó de médio peso molecular (Sigma-Aldrich, EUA) com grau de desacetilação entre 75% e 85%.

O método de evaporação do solvente (casting) descrito por CAMPOS (2007) foi empregado para a elaboração dos filmes. Foram preparadas membranas de quitosana (QUIT) e com a combinação de quitosana e extrato de uva (QE), partindo de uma solução acidificada de quitosana a 2% (m/v) e 0,5% de extrato de uva (m/v). As formulações estão descritas a seguir.

QUIT: foram utilizados 0,2 g de quitosana, 10 mL de solução de ácido acético 0,1% (v/v), adicionando-se sob agitação, 0,5 mL de álcool 70%, até completa solubilização da quitosana e gelatinização da solução.

QE: para melhor solubilização, 0,05 g do extrato foram adicionados a 3 mL de solução de ácido acético 0,1% (v/v) e 0,5 mL de álcool 70%. Essa mistura foi centrifugada, onde se retirou o líquido sobrenadante, e incorporada à mistura de 0,2 g de quitosana e 10 mL de solução de ácido acético 0,1% (v/v) já mantida sob agitação.

Todas as membranas foram preparadas pelo método casting, vertendo-se cerca de 10 mL da solução gelatinizada em placas de Petri de polipropileno de 14 cm de diâmetro para posterior análise de permeabilidade ao vapor de água, e cerca de 1 mL em formas circulares de 3 cm de diâmetro para demais análises. As formas permaneceram à temperatura ambiente para secagem até que se desprendessem dos moldes.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas foram caracterizadas quanto a espessura, microscopia eletrônica de varredura (MEV), umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise de infravermelho (FTIR).

3.5.1 Espessura

A espessura das membranas foi medida utilizando um micrômetro de bancada, Digimatic Micrometer, do Laboratório Multiusuário do Programa de pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do *campus* de Poços de Caldas da UNIFAL-MG. Para cada amostra a espessura foi medida em dez posições diferentes obtendo-se a média final. Tal procedimento foi realizado em triplicata.

3.5.2 Determinação da umidade

A porcentagem de umidade foi determinada pelo método gravimétrico. Obteve-se a massa inicial das membranas (M_i) em balança analítica marca SHIMADZU modelo AY220. Em seguida, elas foram acondicionadas por 24 horas em estufa com circulação forçada de ar a 105°C. Após este período, obteve-se a massa final (M_f) (CAMPOS, 2007). Esta análise foi realizada em triplicata. A porcentagem de umidade foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$\%U = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100\% \quad (2)$$

Onde:

$\%U$ = porcentagem de umidade;

M_i = massa inicial da amostra (g);

M_f = massa final da amostra (g).

3.5.3 Comportamento hídrico (intumescimento)

Inicialmente, as membranas foram colocadas em um dessecador por um período de 24 horas sendo pesadas logo após (W_d). Em seguida elas foram imersas em aproximadamente 10mL de água destilada e colocadas em estufa a 37°C, para simular a temperatura corporal, durante 24 horas, sendo pesadas novamente (W_s). A porcentagem de intumescimento ($\%S$) foi obtida através da Equação 3 e calculada pela média de três repetições (CAMPOS et al., 2007).

$$\%I = \frac{(W_s - W_d)}{W_s} \times 100\% \quad (3)$$

Onde:

%I = porcentagem de intumescimento;

Ws = massa da amostra inchada (g);

Wd= massa da amostra seca (g).

3.5.4 Solubilidade em água

As amostras utilizadas no teste de umidade (M_i) foram imersas em erlenmeyer com 50mL de água destilada e agitadas lentamente em agitador Dubnoff por 24 horas a 25°C. Após este período, elas foram removidas e levadas para a estufa a 105°C por 24 horas e pesadas novamente (M_f). Após a secagem, a fração do material não solúvel foi determinada através da Equação 4. A análise foi realizada em triplicata.

$$\%S = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100\% \quad (4)$$

Onde:

%S = porcentagem de perdas;

M_i = massa inicial da amostra (g);

M_f = massa final da amostra (g).

3.5.5 Permeabilidade ao vapor d'água

O ensaio de permeabilidade ao vapor d' água foi realizado gravimetricamente de acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995). O método consiste no aumento de peso de um material higroscópico, no caso o cloreto de cálcio anidro, colocado no interior de uma célula permeável e isolado do ambiente pela membrana a ser analisada. Esse conjunto é parafusado, com parafusos inoxidáveis, e colocado dentro de um recipiente fechado hermeticamente com solução saturada de cloreto de sódio. O ganho de peso ao longo do tempo é usado para calcular o coeficiente de permeabilidade de acordo com a Equação 5 (DA SILVA; BIERHALZ; KIECKBUSCH, 2012).

$$PVA = \frac{G \cdot \delta}{A \cdot \Delta P_w} \times F \quad (5)$$

Onde:

PVA = coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água (g.mm/m².dia.kPa);

G = taxa de massa do sistema, calculada usando regressão linear do ganho de peso *versus* tempo (g/dia);

δ = espessura média do filme (mm);

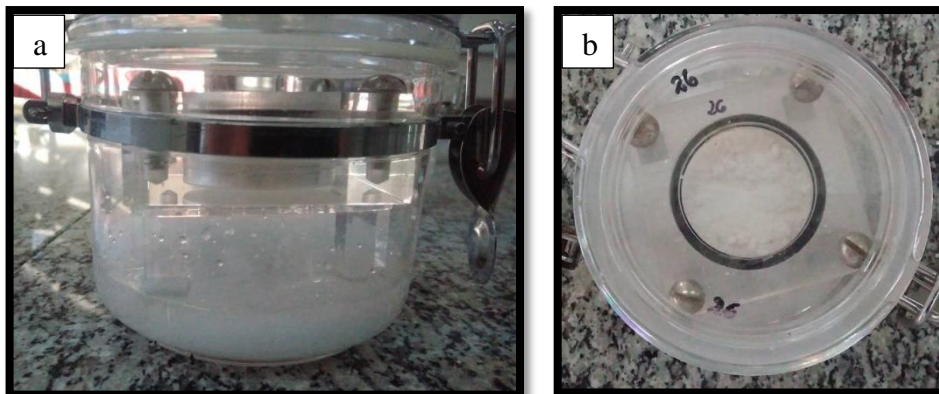
A = área exposta do filme (m²);

ΔP_w = diferença de pressão parcial de vapor d'água no ambiente dos dois lados do filme (kPa);

F = fator de correção.

O cloreto de cálcio foi colocado dentro do orifício das células e sobre ele as membranas foram acondicionadas de modo a cobri-lo. Essas células foram colocadas em recipientes hermeticamente fechados, contendo uma solução supersaturada de cloreto de sódio a 25°C de maneira a manter a diferença de umidade relativa em 75%. (DA SILVA; BIERHALZ; KIECKBUSCH, 2012). As células foram pesadas em intervalos regulares de tempo, durante cinco dias. O sistema está representado na Figura 17.

Figura 17 - Recipiente hermeticamente fechado contendo a célula de permeação.



Nota: (a) Vista frontal
(b) Vista superior

Fonte: Da autora

3.5.6 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O comportamento térmico foi analisado por meio da Calorimetria Diferencial de Varredura, a fim de avaliar a estabilidade das membranas frente às variações de temperatura. Esta técnica mede o fluxo de calor entre a amostra e um material termicamente inerte quando submetidos a uma variação de temperatura, sendo assim possível identificar e analisar as modificações ocorridas no estado físico da amostra. As análises foram realizadas no equipamento DSC 200-F3 da marca NETZSCH, com rampa de 0°C a 300°C e com taxa de aquecimento 10°C/min., sob a atmosfera de nitrogênio líquido, do laboratório Multiusuário do Programa de pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do *campus* de Poços de Caldas da UNIFAL-MG. O grau de cristalinidade (X_c) foi calculado a partir da Equação 6 (TURI, 1981), baseado nos parâmetros obtidos na análise térmica.

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H^{\circ}m} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

X_c = cristalinidade da amostra;

ΔH_m = entalpia de fusão experimental (Jg^{-1});

$\Delta H^{\circ}m$ = entalpia de fusão da quitosana 100% cristalina (Jg^{-1}).

3.5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica foi realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando o equipamento LEO Electron Microscopy/Oxford Leo 440i do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNANO) da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Para tal análise as amostras foram recobertas, para evitar o acúmulo de cargas negativas nas amostras não condutoras e conseqüentemente ocasionar uma distorção da imagem, com um filme ouro de espessura de 16 nm no Sputter Coater de marca EMITECH, modelo K450 por 60 segundos a 200 A°.

3.5.8 Análise de Infravermelho (FTIR)

Assim como feito com o extrato de uva, as membranas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (infravermelho por transformada de Fourier - FTIR), técnica na qual a luz infravermelha é passada pela amostra possibilitando a identificação de compostos orgânicos e a investigação da composição de uma amostra (FRANCO, 2014).

O equipamento utilizado foi o Agilent Technologies modelo Cary 630 do Laboratório Multiusuário do Programa de pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do *campus* de Poços de Caldas da UNIFAL-MG. A amostra foi inserida diretamente no equipamento, sem a necessidade de um preparo prévio para leitura. Os espectros foram coletados em um intervalo entre 650 a 4000 cm^{-1} .

3.4.9 Atividade antimicrobiana

A análise do comportamento antibacteriano das membranas QUIT e QE produzidas foram realizadas separadamente para as bactérias *Escherichia coli*, gram-negativa, e *Staphylococcus aureus*, gram-positiva, importantes na microbiologia de feridas da pele.

Os testes foram realizados em triplicatas. Placas Petri contendo 30 mL do meio de cultura Agar Miller Hinton sólido foram incubadas a 37°C por 24 horas e as membranas sintetizadas, previamente cortadas em formato de discos de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro, foram expostas em luz UV por meia hora cada lado. Estes processos foram necessários para certificação de ausência de contaminação indesejada nos materiais utilizados.

Após esse período, com o auxílio de um cotonete swab foi espalhado, uniformemente sobre a superfície da placa de Petri, aproximadamente 10 μL da cultura de bactéria (10⁸ células/bactéria). Em seguida, as membranas foram depositadas nas placas de Petri sobre o meio de cultura com o auxílio de uma pinça flambada. O controle positivo, solução de clorexidina a 0,12%, e controle negativo, água destilada, foram posicionados sobre discos de papeis filtro com o mesmo diâmetro das membranas, também previamente esterilizados em luz UV. As placas, não invertidas, foram colocadas na estufa a 37°C por 24 horas. Para a análise dos resultados foi observado se houve formação do halo de inibição ao redor das amostras (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões das análises realizadas estão apresentadas a seguir em duas partes: caracterização do extrato e caracterização das membranas.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Como caracterização do extrato estão apresentados os resultados e discussões do rendimento, da análise qualitativa, semi-quantitativa, atividade antirradicalar, infravermelho e atividade antimicrobiana.

4.1.1 Rendimento

Finalizado o processo de extração, o produto resultante foi pesado e, a partir do resultado, foi calculado seu rendimento. Obteve-se um valor de 91,99g equivalente a 5,74% com base em uma amostra inicial de 1,6kg de baga. Este valor é próximo ao encontrado por Oliveira (2010). Em seu estudo, empregou-se a maceração como método de extração entretanto, utilizou-se o ultrassom durante o processo. Desta forma, obteve-se um rendimento com etanol puro para uva Merlot de 5,97%. A cultivar Syrah também foi analisada, onde encontrou-se um valor de 9,1%. Utilizando água pura na extração os valores encontrados foram de 9,1% e 12% para as uvas Merlot e Syrah, respectivamente.

Isto indica que a variedade da uva e o método empregado na extração altera os valores de rendimento. Pode-se dizer que nesta pesquisa o extrato adquirido está concentrado, no qual foi possível eliminar grande parte da água e demais solventes extratores adicionados inicialmente. Este rendimento pode ser explicado pelo aumento da polaridade em misturas binárias de solventes polares, no caso etanol/água, indicando que os compostos presentes na uva Jacquez possuem mais caráter polar do que apolar (JAITAK et al., 2009).

Na Figura 18 é possível observar o extrato de uva Jacquez concentrado.

Figura 18 – Extrato de uva Jacquez concentrado.



Fonte: Da autora.

4.1.2 Análises qualitativas

Os resultados alcançados através dos ensaios qualitativos realizados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise da presença de flavonoides e taninos no extrato de uva Jacquez.

Extrato de uva	Flavonoides	Taninos		
	Reação de Shinoda	Gelatina 2,5%	Água de Bromo	Cloreto Férrico
	Coloração vermelha	+	+	Coloração Verde

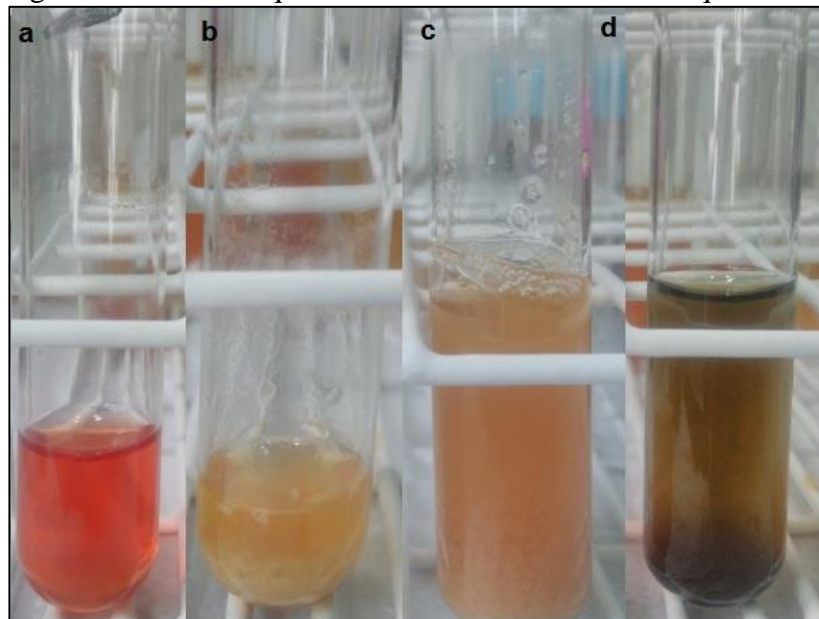
Nota: +, com turbidez/ precipitação; coloração vermelha: presença de flavonoides; coloração verde: presença de taninos condensados.

Fonte: Da autora.

Para o teste de flavonoides o ensaio mostrou-se positivo, pois houve o aparecimento de uma coloração vermelha na solução. Entretanto, essa coloração foi vista com um pouco de dificuldade, não estando totalmente nítida a princípio. A presença da cor vermelha corrobora a ocorrência de ligação entre os flavonoides e os íons metálicos da solução devido a presença das funções oxigenadas (SCHOLZ; LIEBEZEIT, 2006).

Na determinação dos taninos por meio do ensaio de gelatina houve precipitação, o que indica a ligação da proteína com os taninos. O ensaio de água de bromo também mostrou o surgimento de uma precipitação amarelada, confirmando a presença de taninos condensados. De acordo com Jesus e Cunha (2012), os taninos condensados formam um precipitado quando reagem com proteínas, assim como em solução de bromo. A fim de mais uma confirmação da presença de taninos condensados, o ensaio de cloreto férrico mostrou-se positivo onde a solução obteve uma coloração verde. Neste caso, houve a formação de um complexo entre o átomo de ferro e as hidroxilas vizinhas do tanino, que se encontram ligadas ao anel aromático ocasionando o precipitado esverdeado (OLIVEIRA et. al., 2010). A Figura 19 mostra os ensaios realizados.

Figura 19 – Ensaio qualitativos do extrato de uva Jacquez.



Nota: a - Reação de Shinoda; b – reação com gelatina 2,5%;
c – reação com água de bromo; d – reação com cloreto férrico 2%.

Fonte: Da autora.

4.1.3 Análises semi-quantitativas do extrato

Na Tabela 3 é possível visualizar os resultados obtidos com relação aos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos condensados contidos no extrato de uva Jacquez analisado.

Tabela 3 – Teores de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados no extrato de uva Jacquez.

Amostra	Fenóis totais (mg EAG/g extrato)	Flavonoides (mg EQ/g extrato)	Taninos condensados (mg EC/g extrato)
Extrato de uva Jacquez	82,09 ± 3,092 / 8,21%	3,24 ± 0,254 / 0,32%	47,62 ± 4,513 / 4,76%

Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3) e porcentagem em relação a 1g.
EAG – equivalentes em ácido gálico; EQ – equivalentes em quercetina; EC – equivalentes em catequina.

Fonte: Da autora.

Na literatura não foram encontrados estudos de análises fitoquímicas específicos da variedade Jacques, entretanto, outros estudos analisando outras variedades serviram de base para comparação. Vale salientar que: cada variedade, possui suas características e propriedades particulares; esta foi uma análise semi-quantitativa, pois não foi possível a identificação de todos os compostos presentes no extrato, uma vez que os resultados estão apresentados como equivalentes em ácido gálico, quercetina e catequina para a verificação de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados, respectivamente. Sendo assim, a amostra analisada contém outros compostos que, segundo a literatura, são muito diversificados e precisam de uma análise mais detalhada para tais identificações, como por exemplo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao Espectrômetro de massa.

Como pode ser observado o teor de fenóis totais presente no extrato foi de 82,09 ± 3,092 mg EAG/g extrato. Mota e colaboradores (2009) encontraram uma média de 54,61 mg EAG/g somando a casca e a semente de bagas maduras da cultivar Folha de Figo. Comparando este valor com o do presente estudo, percebe-se que o teor de compostos fenólicos está compatível, uma vez que a ordem de grandeza é semelhante. Apesar das pesquisas apresentarem valores referentes a uvas maduras, percebe-se que cada variedade possui uma determinada quantidade de compostos fenólicos. Ainda outros fatores são influenciadores, como as condições de cultivo, ou seja, o solo, a altitude, o clima, causando variações nos valores determinados, além, é claro, dos diferentes métodos de análise empregados. Segundo Elias (2008), os maiores valores foram observados na fase chumbinho, diminuindo nas fases seguintes (início e final do pintor e a maturação). Para esta confirmação

seria necessário realizar estas análises para a uva madura (MOTA et al., 2009; MOTA et al., 2010; REGINA et al., 2010).

O teor de flavonoides obtido no presente estudo foi de $3,24 \pm 0,254$ mg EQ/ g extrato. Sugere-se que esta quantidade pode ser devido a uva utilizada se encontrar na fase chumbinho. Neste estado ainda não há desenvolvimento completo de flavonoides, especialmente as antocianinas que são as subclasses principais presente na uva madura, apresentando uma coloração que varia de vermelha a roxa. Desta forma, pode-se ter um entendimento de que o teor de flavonoides presente em uma cultivar madura é superior ao da fase chumbinho (ABE et al., 2007; DAL'OSTO et al., 2012; FRAIGE, 2012; MOTA et al., 2010; REGINA et al., 2010).

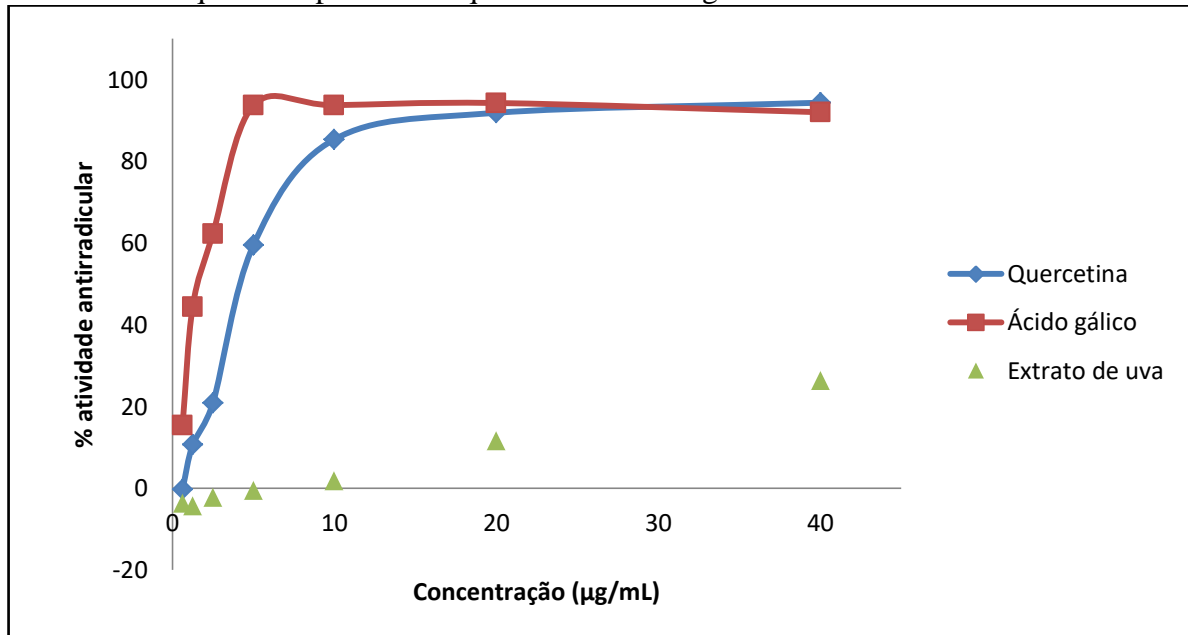
O teor de taninos condensados foi de $47,62 \pm 4,513$ mg EC/g extrato. De acordo com a pesquisa de Kennedy e colaboradores (2000), o maior teor de taninos encontrado foi antes da fase *veraison*, 2,2 mg/g de semente. Após esse estágio o teor se manteve constante por um curto período de tempo, obtendo em seguida um rápido declínio até chegar ao valor de 1,27 mg/g de semente na etapa final de maturação. Outros estudos também relatam que o teor de taninos condensados se acumula antes do *veraison* decrescendo em seguida. (DAL'OSTO, 2012; FOURNAND et al., 2006; VALVERDE et al., 2012;).

O teor de taninos condensados foi dado em equivalentes de catequina. As catequinas são compostos bioativos que tem propriedades antioxidantes e apresentam uma vasta aplicação na área biológica, bem como em atividades antitrombóticas, vasodilatadoras, anti-inflamatórias, antialérgicos, efeitos anticancerígenos, antiúlcera e funções antimicrobianas, tendo maior atividade contra bactérias gram positivas do que contra as gram negativas. Elas atuam como eliminadoras de radicais livres e quelantes de íons metálicos (GADKARI; BALARAMAN, 2015; PERES et al., 2011; RASHIDINEJAD; BIRCHA; EVERETT, 2016;). Assim, o extrato obtido se mostra propício para a finalidade proposta inicialmente de se elaborar um material que acelere a cicatrização de feridas cutâneas.

4.1.4 Atividade antirradicalar (DPPH)

Os resultados da análise de atividade sequestrante de radicais DPPH do extrato de uva Jacquez, pode ser observado na Figura 20.

Figura 20 – Comparação da atividade sequestrante de radicais DPPH entre o extrato de uva Jacquez e os padrões de quercetina e ácido gálico.



Fonte: Da autora.

Como pode ser observado, o extrato analisado apresentou um potencial de sequestro de radicais DPPH inferior aos padrões de quercetina e ácido gálico, considerados compostos que apresentam uma alta atividade antirradicalar. A máxima atividade obtida foi na concentração de 40 µg/mL, onde conseguiu atingir 26% de sequestro de radicais.

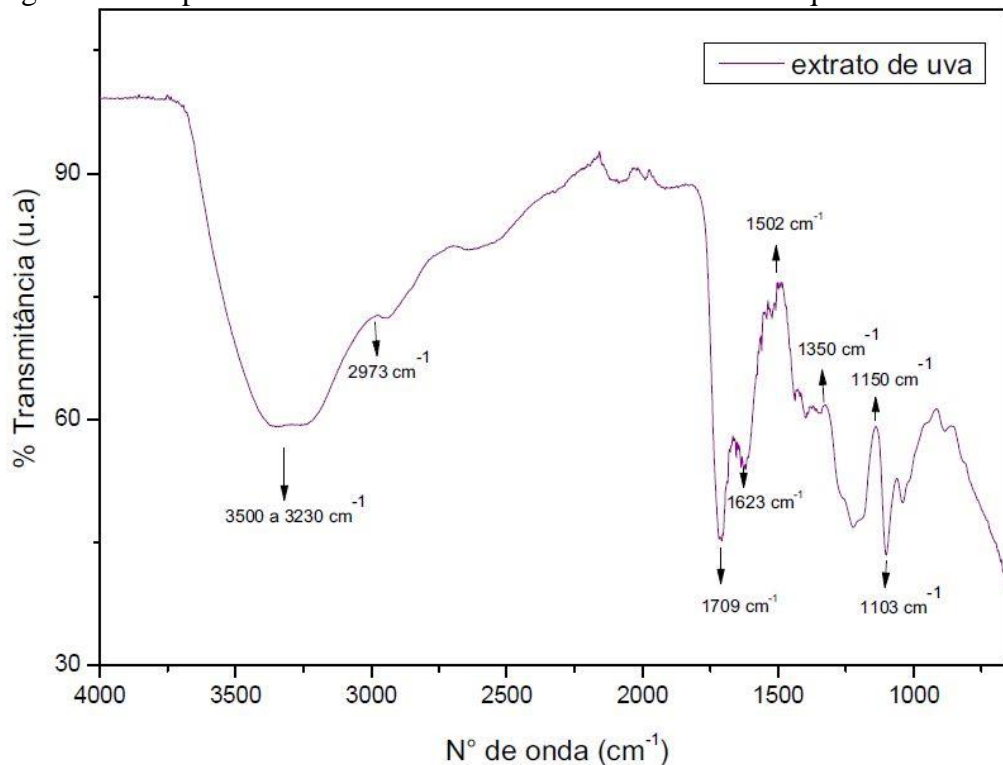
Para a amostra do extrato, Jacquez, obter 50% de atividade antirradicalar encontrou-se o valor de 70,24 µg/mL, concentração maior do que a solução mais concentrada utilizada no ensaio (40 µg/mL). Desta forma, o sequestro de radicais poderia ser aumentado se a concentração do extrato fosse maior, uma vez que a tendência da curva é o crescimento. Sugere-se que o baixo sequestro de radicais de DPPH é devido à ausência de antocianinas em razão da uva analisada estar na fase chumbinho.

Soares e colaboradores (2008) determinaram a atividade antioxidante de uvas da cultivar Niágara e Isabel. A média de valores encontrada está relacionada de forma positiva com a média dos valores de polifenóis e antocianinas. Kallithraka et al. (2005) não encontraram correlação entre antocianinas totais e a capacidade antioxidante em cultivares de uvas *Vitis vinífera*. Eles relatam a importância de outros constituintes da uva para se ter uma analogia. Desta forma, não há regras para esta correlação, uma vez que estes compostos podem combinar entre si ou com outros metabólitos secundários presentes no extrato. Assim, estas interações podem aumentar ou diminuir o potencial antirradicalar.

4.1.5 Análise de infravermelho (FTIR)

O espectro da amostra de extrato de uva verde é apresentado na Figura 21.

Figura 21 – Espectro de FTIR da amostra de extrato de uva Jacquez.



Fonte: Da autora.

Pelo espectro obtido, na região entre 3500 cm^{-1} a 3230 cm^{-1} são atribuídos grupos -OH , característicos dos polifenóis e água. A banda 2973 cm^{-1} ocorre devido aos estiramentos C-H, C-H_2 e C-H_3 atribuída a carboidratos como os açúcares. A banda 1709 cm^{-1} está relacionada com a presença do alongamento C=O de ésteres, derivados de ácido gálico. As bandas entre 1623 e 1502 cm^{-1} são atribuídas a ligações C=C-C aromáticas e ligações C-O a $1350\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ (CHUPIN et. al., 2013; GRASEL et al., 2015; RICCI et al., 2016; SILVA et. al, 2014; ZHAO et. al., 2015). Segundo Chupin et. al (2013), as bandas entre 1400 e 2000 cm^{-1} mostram a natureza aromática da estrutura.

Saad e colaboradores (2014) relatam que bandas entre 1222 a 1062 cm^{-1} são geralmente atribuídos à vibração de alongamento assimétrico de C-O estéreo resultante da estrutura de anel derivada de pirano de taninos condensados. Grasel e colaboradores (2015), também identificaram, em amostra da planta Quebracho, estes alongamentos na região entre 1037 a

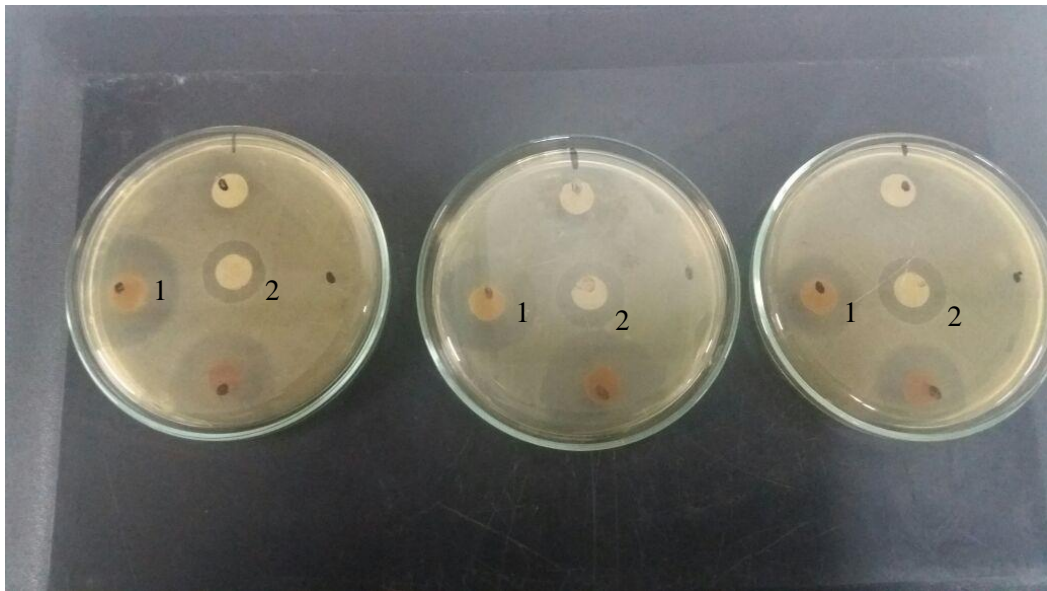
1368 cm^{-1} . O espectro obtido mostra bandas em 1103 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} , confirmando assim a presença de taninos condensados.

Estes comprimentos de onda fazem parte da região conhecida como *fingerprint* de uvas e vinhos e incluem a absorção típica por infravermelhos de moléculas fenólicas tal como a banda de estiramento dos grupos carbonilo (1712-1704 cm^{-1}). Além disso, o sinal dos fenóis pode ser encontrado na região 1680-900 cm^{-1} (CHUPIN et. al., 2013; GRASEL et al., 2015; RICCI et al., 2016; SILVA et. al, 2014; ZHAO et. al., 2015).

4.1.6 Atividade antibacteriana

O resultado antimicrobiano para o extrato concentrado pode ser observado na Figura 22. Como pode ser observado houve formação de halo de inibição para o extrato (1) com uma média de $7,2 \pm 1,7$ mm, indicando assim atividade inibitória para *Staphylococcus aureus*. Este valor foi maior do que para o controle positivo (2), sendo de $4,1 \pm 0,1$ mm.

Figura 22 – Resultado da atividade antimicrobiana para o extrato de uva Jacquez concentrado (1) e controle positivo (2) para a bactéria *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Da autora.

O extrato de uva na concentração de 5mg/mL não obteve atividade antimicrobiana para os microrganismos analisados, pois não houve formação de halo de inibição.

Esses resultados mostram que o extrato de uva Jacquez contém atividade antimicrobiana. Só resta saber a Concentração Mínima Inibitória para as bactérias que devem ser inibidas no processo de cicatrização de feridas cutâneas como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Katalinic e colaboradores (2009) relacionaram a atividade antimicrobiana em cascas de uva *Vitis vinifera* com a presença de compostos fenólicos. Eles confirmaram a inibição para as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e para as Gram-negativas (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella infantis* e *Campylobacter coli*). Jayaprakasha, Selvi e Sakariah (2002) analisaram a atividade antimicrobiana de sementes de uva *Vitis vinifera*. Foram testadas as bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As bactérias Gram-positivas foram inibidas completamente em 850-1000 ppm, já as Gram-negativas foram inibidas na concentração de 1250-1500 ppm.

Segundo Vaquero, Alberto e Nadra (2007), o ácido cafeico não flavonoide e os flavonoides, como rutina e quercetina, apresentaram maiores atividades inibitórias sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes*. Rhodes e colaboradores, (2006) concluíram que as frações fenólicas poliméricas produziram a maior atividade de inibição para todas as espécies *Listeria*, mas não para outras bactérias como *Bacillus cereus*, *Salmonella menston*, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* ou *Yersinia enterocolitica*. Sivarooban, Hettiarachchy e Johnson (2008), avaliaram a ação antibacteriana do extrato de semente de uva sobre as bactérias *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *S. typhmurium*. O extrato reduziu a população de *L. monocytogenes* em 1 logUFC/mL após 1h de incubação a 25°C. Contudo *E.coli* e *S. typhimurium* apresentaram apenas reduções de 0,1 e 0,2 log UFC/mL, respectivamente.

O efeito inibitório de compostos fenólicos a partir de extratos naturais são mais potentes para bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas que possuem a camada lipopolissacarídeo, o que pode estar relacionado com a redução da sensibilidade contra extratos naturais (SIVAROOBAN; HETTIARACHCHY; JOHNSON, 2008).

Deve-se considerar a cultivar analisada, bem como a concentração utilizada na análise e suas condições de cultivo para então associar as propriedades antimicrobianas ao extrato caracterizado.

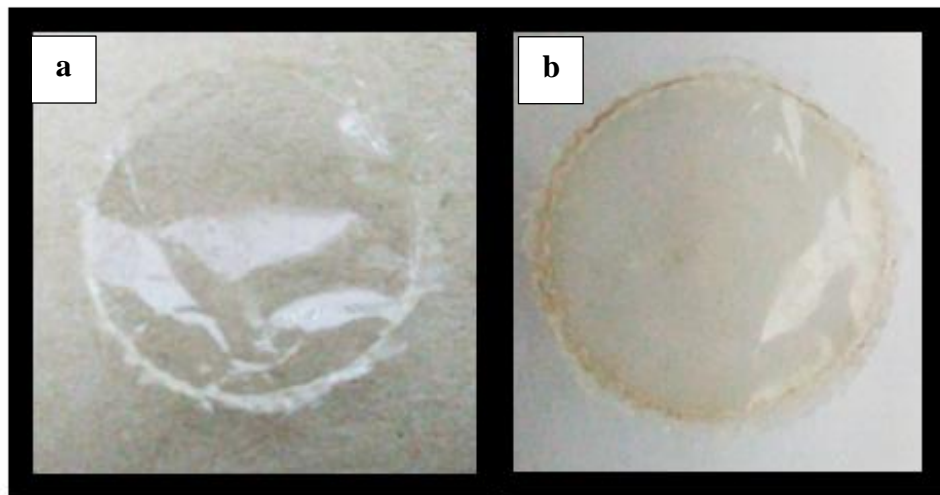
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

Os resultados da caracterização das membranas estão descritos nos tópicos a seguir.

4.2.1 Análise macroscópica e morfológica

As membranas sintetizadas com quitosana (QUIT) e com a combinação quitosana e extrato de uva (QE) apresentaram flexibilidade e transparência, segundo análise macroscópica. Franco (2014), relatou que estas são algumas características essenciais para se ter um bom material para o tratamento de feridas cutâneas. As membranas podem ser observadas na Figura 23.

Figura 23 - Membranas sintetizadas : a- membrana de quitosana (QUIT); b- membrana quitosana/extrato de uva (QE).



Fonte: Da autora.

As espessuras das membranas estão apresentadas na Tabela 4. Pode-se notar que a espessura de QE é quase o dobro da espessura de QUIT. Esse aumento é em razão ao caráter hidrofílico do extrato e conseqüentemente sua maior absorção de umidade, alterando assim a espessura da membrana. A obtenção de uma uniformidade da espessura indica que os componentes da membrana estão distribuídos igualmente. Pode-se observar que o desvio padrão é relativamente baixo, comprovando assim a uniformidade destas.

Peng e colaboradores (2013), relataram um aumento da espessura com incorporação de extrato de chá verde em filmes de quitosana. Rubilar e colaboradores (2013) também

verificaram um aumento na espessura após incorporação de extrato de semente de uva e carvacrol em filmes de quitosana.

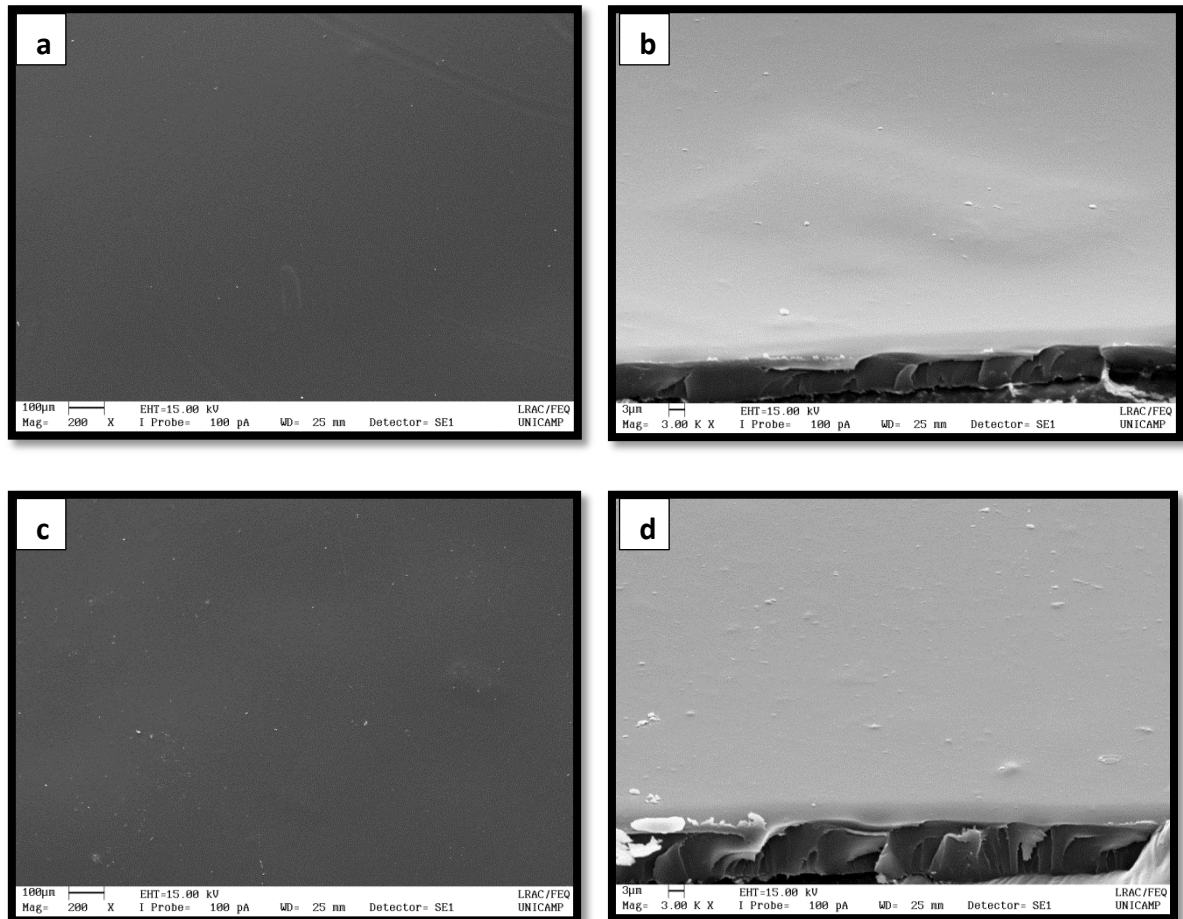
Tabela 4 - Espessuras das membranas de quitosana (QUIT) e quitosana com extrato de uva (QE)

Amostra	Espessura (mm)
QUIT	0,031 ±0,001
QE	0,051±0,001

Fonte: Da autora.

As micrografias obtidas na análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as amostras das membranas QUIT e QE são observadas na Figura 24. Comparando as micrografias (a) e (c), percebe-se que não houve diferença entre as amostras, no qual ambas apresentaram uma superfície lisa e homogênea o que indica a compatibilidade e miscibilidade da quitosana com o extrato de uva. Com relação às micrografias (b) e (d), que equivalem ao interior das membranas QUIT e QE, respectivamente, é possível notar a estrutura densa e uma homogeneidade das camadas formadas. Resultados similares foram observados por Bof e colaboradores (2016) e Rubilar e colaboradores, (2013).

Figura 24 – Comparação das micrografias: membrana QUIT (a) e (b) a 100 μ m (superfície) e 3 μ m (interior), respectivamente; e membrana QE (c) e (d) a 100 μ m (superfície) e 3 μ m (interior), respectivamente.



Fonte: Da autora.

4.2.2 Determinação da umidade, intumescimento, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água

A Tabela 5 mostra os parâmetros que foram averiguados para as membranas sintetizadas.

Tabela 5 – Umidade e intumescimento das membranas QUIT e QE.

Amostras	Umidade (%)	Intumescimento (%)
QUIT	13,98 \pm 0,1169	85,42 \pm 5,861
QE	21,28 \pm 0,9181	98,69 \pm 0,4104

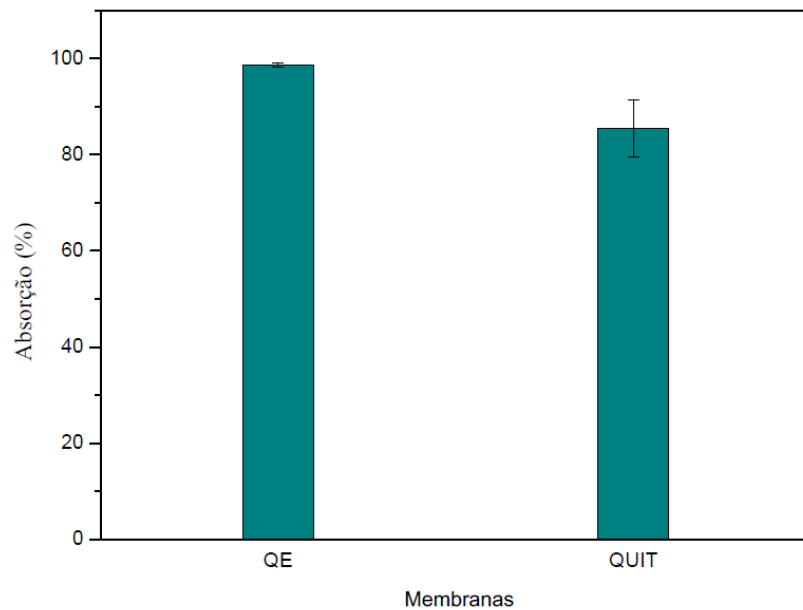
Fonte: Da autora.

A umidade da membrana QE encontrada foi superior à membrana QUIT, isso mostra que o caráter hidrofílico dos compostos fenólicos é maior quando comparada à quitosana. Segundo Espinoza e Villeneuve (2005), ácidos fenólicos são antioxidantes naturais com caráter hidrofílico (receptivos à umidade), dentre eles estão os derivados de ácido benzóico como o ácido gálico que foi encontrado no presente estudo. A membrana QUIT apresentou resultado semelhante ao encontrado por Campos et al. (2007), Franco (2014) e Brianezi (2016). Uma porcentagem elevada de umidade pode acarretar em desvantagens, como por exemplo, proporcionar um meio favorável para proliferação de microrganismos e consequentemente degradar as membranas.

Com relação ao comportamento hídrico, a membrana QE obteve maior absorção comparada à membrana QUIT. Isso pode ser em razão da membrana QE conter mais grupos com caráter hidrofílico do que a quitosana, aumentando assim seu comportamento hídrico (ESPINOZA; VILLENEUVE, 2005). Quando imersas, as membranas QE incharam adquirindo consistência de gel e, após o período de 24h praticamente toda água inicialmente adicionada foi absorvida, facilitando assim a retirada dos filmes para pesagem final. Por outro lado, as membranas QUIT quando imersas também incharam adquirindo consistência de gel, mas, após o período de 24h, não absorveram toda água inicialmente adicionada, sendo que em algumas amostras as membranas se dissolveram o que dificultou a retirada de água adsorvida na superfície. Isto pode explicar o desvio padrão maior obtido quando comparado à membrana QE. Este caráter hidrofílico justifica o aumento da espessura uma vez observado.

A Figura 25 mostra a comparação da absorção de água entre as membranas de QUIT e QE.

Figura 25 – Comparação da porcentagem de absorção de água entre as membranas QE e QUIT.



Fonte: Da autora.

Na Tabela 6 é possível visualizar os resultados obtidos para a solubilidade e permeabilidade ao vapor de água para as membranas sintetizadas.

Tabela 6 – Solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) das membranas QUIT e QE

Amostras	Solubilidade (%)	PVA [g.mm/m ² .dia.Kpa]
QUIT	53,56 ± 2,788	3,02 ± 0,293
QE	14,34 ± 0,4764	1,18 ± 0,228

Fonte: Da autora.

Com relação à solubilidade e à permeabilidade ao vapor de água, a membrana QUIT apresentou maiores valores em relação à membrana QE. As moléculas de quitosana no filme não estão ligadas entre si o que torna mais fácil a solubilização em água e também permitem mais facilmente a passagem de vapor de água pelo filme. Já nas membranas com incorporação de extrato houve uma forte interação entre as moléculas do extrato e a quitosana as aproximando. Por esta razão, esta interação dificulta a solubilização assim como a passagem do vapor de água em razão da diminuição dos espaços vazios.

Rubilar et al. 2013, também encontraram uma redução na solubilidade em filmes com incorporação de extrato de uva e quitosana, onde para filmes com quitosana obteve-se $22,74 \pm 1,82\%$ e para filmes com incorporação do extrato $20,53 \pm 4,96\%$. O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA) encontrado para a membrana de quitosana também foi maior comparado à membrana de quitosana com extratos contendo compostos fenólicos em sua composição nas pesquisas de Peng et al. (2013), Siripatrawan e Harte (2010), Wang et al. (2012). Siripatrawan e Harte (2010) analisaram filmes de quitosana com incorporação de chá verde com diferentes concentrações. À medida que as concentrações aumentaram houve redução na permeabilidade ao vapor de água passando de $0,256 \pm 0,023$ para $0,087 \pm 0,012$ g mm m⁻² d⁻¹ kPA⁻¹ com concentrações de 2% e 20%, respectivamente.

Essas propriedades (umidade, intumescimento, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água) são interessantes devido à conservação da integridade da membrana principalmente em ambientes úmidos, como no processo de cicatrização (PENG et al., 2013). A troca de gases com o ambiente é propícia para se ter um adequado tratamento de feridas, uma vez que a pele exerce essa função. Um bom curativo deve ao mesmo tempo manter o local da ferida úmido e absorver o exsudato excretado da lesão para evitar o acúmulo de líquido entre a ferida e o curativo e conseqüentemente a contaminação por microrganismos (CAMPOS et al., 2007).

4.2.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Com base nas curvas pôde-se obter os valores da temperatura de fusão (T_m) e entalpia (ΔH) para cada amostra analisada e conseqüentemente calcular o grau de cristalinidade. Na Tabela 7 é possível visualizar tais resultados e a Figura 26 mostra a comparação das curvas referentes às amostras.

O aumento da temperatura de fusão da membrana QE em relação à temperatura da membrana QUIT confirma a interação entre o extrato e a quitosana por meio da formação de ligações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, através das hidroxilas livres da quitosana, e também ligações covalentes. Desta forma, a estabilidade térmica da membrana QE é maior quando comparada à membrana QUIT. Resultados similares foram encontrados por SOUSA e colaboradores (2016) ao analisarem filmes de quitosana com extrato aquoso de

Combretum duarceanum e também por Peng, Wu e Li (2013), ao analisarem filmes de quitosana e extrato de chá verde.

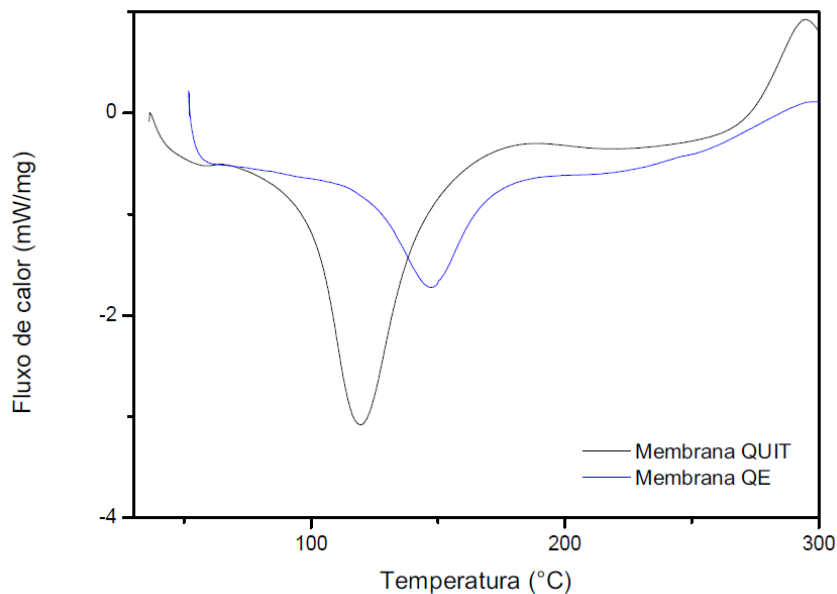
Apesar deste aumento na temperatura de fusão houve uma redução na entalpia e consequentemente na cristalinidade da membrana QE comparada à membrana QUIT. Possivelmente a presença de polifenóis na estrutura da membrana dificulta a organização do polímero, pois agem como plastificantes, causando também dobramentos na estrutura.

Tabela 7 – Resultados obtidos do ensaio de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Amostra	T _m (°C)	ΔH (J/g)	Grau de cristalinidade (%)
Membrana QUIT	119,5	482,7	51,02
Membrana QE	147,5	331,5	35,04

Fonte: Da autora.

Figura 26 – Deslocamento da temperatura de fusão e redução da área para a membrana QE em comparação à membrana QUIT.



Fonte: Da autora.

4.2.4 Análise de Infravermelho (FTIR)

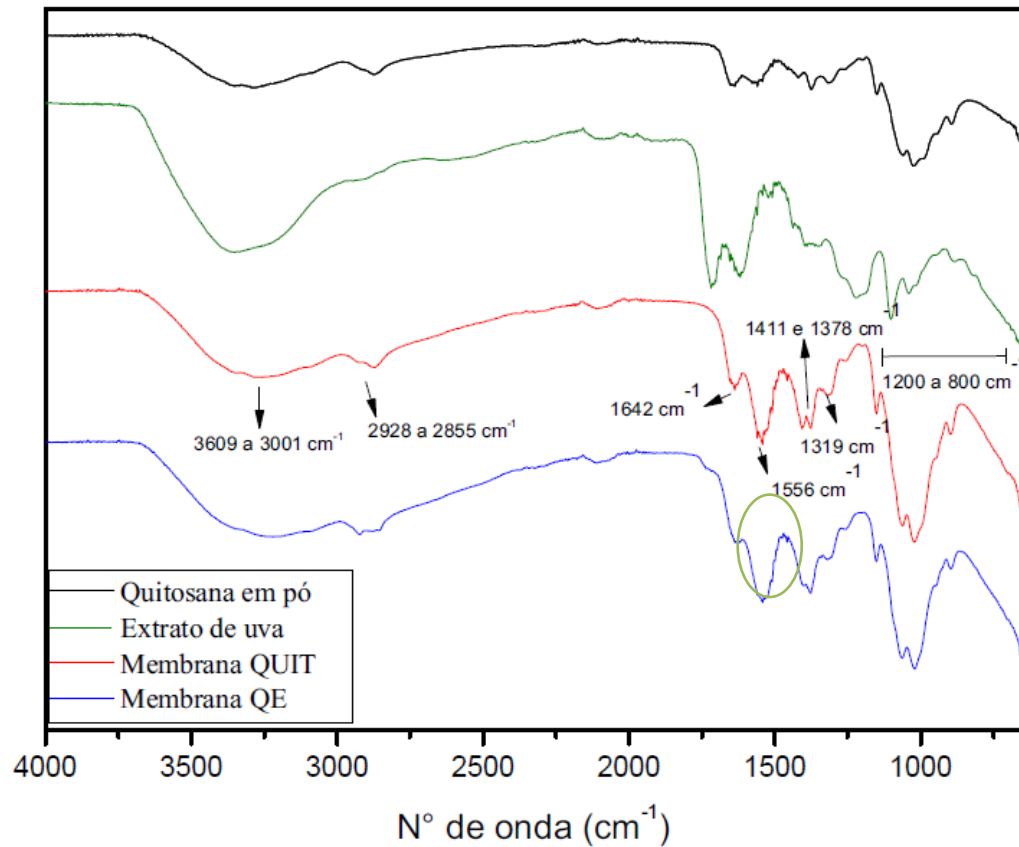
Na Figura 27 é possível visualizar os espectros obtidos para as amostras de quitosana em pó, extrato de uva, membrana QUIT e membrana QE.

O espectro da membrana QUIT mostra que na região entre 3609 cm^{-1} a 3001 cm^{-1} são atribuídas vibrações de estiramento -OH livre e estiramento assimétrico e simétrico das ligações -NH em grupo amino, respectivamente. As bandas entre 3928 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento C-H. As bandas 1642 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} e 1319 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O (amida I), flexão de N-H (amida II) e alongamento C-N (amida III), respectivamente. A banda em 1411 cm^{-1} refere-se a grupos carboxilados possivelmente devido à presença de ácido acético residual utilizado na preparação das membranas. Já a banda 1378 cm^{-1} é atribuída a grupos acetamidas, o que indica que a quitosana não era totalmente desacetilada (grau de desacetilação utilizado >75%). As bandas entre 1200 cm^{-1} a 800 cm^{-1} estão relacionadas a grupos C-O e C-C que correspondem às vibrações originado de estruturas de sacarídeos, como a dextrose (FERREIRA et al., 2014; RUBILAR et al., 2013; WANG et al., 2012).

Comparando as membranas percebe-se que a incorporação do extrato mostrou o mesmo padrão da a membrana QUIT, sem alteração visível no deslocamento do número de onda. Há uma pequena diferença na região circulada em verde correspondente à 1500 cm^{-1} , o que provavelmente indica a interação quitosana/extrato já verificada nos ensaios de solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e análise térmica realizados. Segundo Olejar et al. (2014), a região espectral $1617\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ está relacionada às frequências vibratórias típicas das ligações C=C nos anéis aromáticos e heterocíclicos. Nessa região encontra-se também procianidina não-galatada, devido à ausência do gotejamento típico para compostos de galato de flavonol.

Desta forma, pode-se inferir que não ocorreram alterações relevantes nas membranas. O mesmo caso foi observado por Ferreira et al. (2014) ao analisar membranas de quitosana com a incorporação de extrato de uva para utilização em embalagens alimentícias.

Figura 27 – Comparação dos espectros de FTIR das amostras de quitosana em pó, extrato de uva Jacquez, membrana QUIT e membrana QE.



Fonte: Da autora.

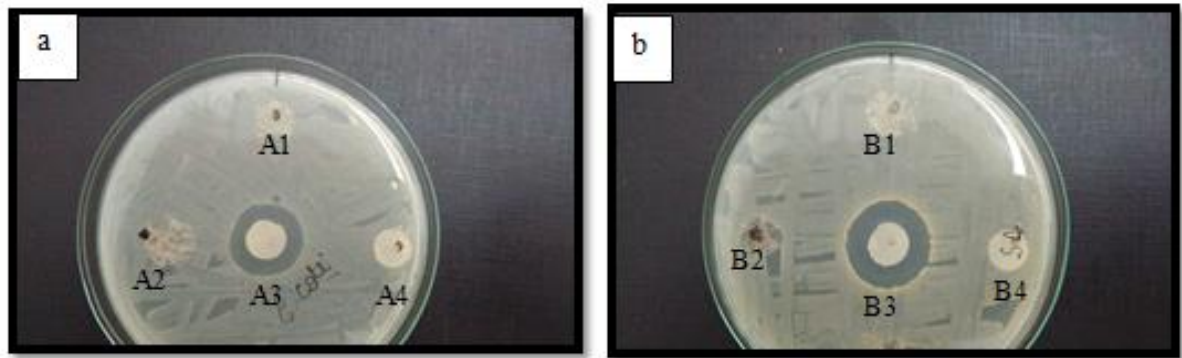
4.2.5 Análise antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana podem ser observados na Figura 28. Conforme observado, as membranas de QE obtiveram resultado negativo contra a inibição de crescimento de *E.coli* e *S. Aureus*, sendo necessário identificar qual a Concentração Mínima Inibitória do extrato que satisfaça tais inibições.

A membrana QUIT também não mostrou a presença de halo de inibição para as bactérias analisadas. Pesquisas descrevem que a massa molecular da quitosana influencia a atividade antibacteriana. Segundo Zheng e Zhu (2003) para bactérias gram-positivas quanto maior a massa molecular de quitosana maior será a atividade antimicrobiana. Por outro lado, para bactérias gram-negativas, quanto menor a massa da molécula maior será sua atividade antimicrobiana. Neste estudo foi utilizada a quitosana de médio peso molecular o que,

possivelmente, influenciou nos resultados obtidos. A finalidade da quitosana neste estudo é sintetizar um meio mais propício, no caso as membranas, para ocorrer a liberação do extrato no tratamento de feridas cutâneas.

Figura 28 - Resultados da atividade bacteriana. Em a: *Escherichia coli*, para as amostras A1 (QUIT), A2 (QE), A3 (controle positivo) e A4 (controle negativo). Em b: *Staphylococcus aureus*, para as amostras B1 (QUIT), B2 (QE), B3 (controle positivo) e B4 (controle negativo).



Fonte: Da autora.

5 CONCLUSÃO

- A etapa de obtenção e caracterização do extrato de uva do cultivar Jacques, *Vitis bourquina*, mostrou-se satisfatória sendo possível identificar a presença de compostos fenólicos que incluem os flavonoides e os taninos condensados.
- As membrans desenvolvidas mostraram-se uniformes, garantindo a completa distribuição dos compostos pela membrana, e transparentes, onde se torna possível a visualização da ferida para sua manutenção. A membrana QE obteve resultados que comprovam a interação formada entre a quitosana e o extrato de uva. Os filmes também apresentaram boa umidade, capacidade de absorção de fluidos, permitiram a passagem de vapores de água, mantiveram a integridade no teste de solubilidade, e ainda, mostraram resistência térmica acima da temperatura corpórea. A atividade antimicrobiana com o extrato concentrado inibiu o crescimento bacteriano. Contudo, a na concentração de 5mg/mL este comportamento não foi observado.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificar o teor de compostos fenólicos, flavonoides e taninos em variedades de uvas no estágio de maturação;
- aumentar a concentração do extrato de uva na formulação das membranas para averiguar a presença de atividade antimicrobiana;
- realizar outros testes *in vitro*, como atividade anti-inflamatória e testes *in vivo* para comprovação da eficácia do poder cicatrizante das membranas elaboradas.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. tecnol. aliment**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ADAMS, D. O. Phenolics and ripening in grape berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 3, p. 249-256, 2006.
- ALVES, H.; MACHADO, M.T.; NORONHA, A.N.W. Análise quantitativa do Processo de reparo em Cicatriz Cirúrgica de ratos Tratados com Extrato de Musa sapientum, Aloe Vera, Colagenase e Placebo. **Revista Ciências em Saúde**, v.1, n. 2, jul. 2011.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- ASSIS, O. B. G.; VALMIR L.S. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, São Carlos , v. 13, n. 4, p. 223-228, Dez. 2003
- ASTM. **Standard test methods of water vapor transmission of material, E96-95**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1995.
- BASTOS, R. G. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas de Eugenia florida DC. (Myrtaceae)**. 2015. 160f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Alfenas, 2015.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e Tanases em alimentos. **Alim. Nutr**, Araraquara, v. 15, n.1, p. 63-72, 2004.
- BAYDAR, N. G. et al. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, n. 5, p. 335-339, 2004.
- BEELEN, P. M. G.; PEREIRA FILHO, J. M.; BEELEN, R. N. Avaliação de Taninos Condensados em Plantas Forrageiras. In: ZOOTEC, 45, 2008. João Pessoa. **Anais...João Pessoa: Zootec**, 2008. p.1-15.
- BOF, M. J. et al. Grapefruit Seed Extract and Lemon Essential Oil as Active Agents in Corn Starch–Chitosan Blend Films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 9, p. 2033-2045, 2016.
- BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biociência & Desenvolvimento**, ano 2, n. 7 p. 16-18, jan./fev. 1999.

BRIANEZI, S. F. S. **Preparação e caracterização de membranas de quitosana e mPEG-PCL para recobrimento de feridas e liberação controlada de gentamicina.** 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Poços de Caldas, 2016.

BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 2, p. 171-183, 2015.

CABRAL FILHO, S. L. S. C. **Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais dos ovinos.** 2004. 64f. Tese (Doutorado em ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2004.

CAMARGO, U. A. Embrapa. Cadastro vitícola. **Jacquez.** 2007. Disponível em <www.cnpuv.embrapa.br/cadastro-viticola/rs-2005-2007/html/cult_jacquez.html>. Acesso em: 10 de agosto 2017.

CAMPOS, M. G. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos.** 2007. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, 2007.

COLTRO, P. S. et al. Role of plastic surgery on the treatment complex wounds. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 38, n. 6, p. 381-386, 2011.

CHUPIN, L. et al. Characterization of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC. **Industrial Crops and Products**, n. 49, p. 897-903, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard-Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CRUZ, B. de F. et al. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Rev Bras Queimaduras**, v. 11, n. 4, p. 246-50, 2012.

DA PUREZA, D. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, p. 68-73, jul./dez. 2003.

DAL'OSTO, M.C. **Emprego da maceração a frio na extração e estabilização de compostos fenólicos em vinhos de Syrah cultivada em ciclo de outono-inverno.** 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2012.

DA SILVA, M. A.; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Influence of drying conditions on physical properties of alginate films. **Drying Technology: An International Journal**, v. 30, p. 72-79, 2012.

DOWNEY, M.O.; HANLIN, R.L. Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. **South African Journal for Enology & Viticulture**, v.2, n. 31, p.154, 2010.

ELIAS, H. H de S. **Caracterização física, química e bioquímica de cultivares de videira durante a maturação**. 2008. 74f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2008.

ESPINOZA, M. C.; VILLENEUVE, P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2779-2787, 2005.

FERREIRA, A. S. et al. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carbohydrate polymers**, v. 113, p. 490-499, 2014.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, n. 61, p. 8987-9003, 2013.

FOURNAND, D. et al. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 19, n. 54, p.7331-7338, 2006.

FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas**. 2012. 210f. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, 2012.

FRANÇA, E. A. Desinformação de terceiro grau. **Revista Problemas Brasileiros**. ano 48, n. 400, jul./ago. 2010.

FRANCO, P. B. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana e casca de banana verde para cicatrização de feridas cutâneas**. 2014. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Poços de Caldas, 2014.

GADKARI, P.V.; BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, n. 93, p. 122-138, 2015.

GALET, P.; GRISARD, M. **Dictionnaire encyclopédique des cépages et de leurs synonymes**. Paris: Medial, 2015.

GIOVANNINI, E. **Manual de viticultura**. Porto Alegre: Bookman, 2014.

GRASEL, F. S., et al. Characterization of Natural Tanning Extracts by FTIR and Multivariate Analysis. **Revista Abotic**. n. 67, p. 1-8, 2015.

- GRASES, F. et al. Effect of consuming a grape seed supplement with abundant phenolic compounds on the oxidative status of healthy human volunteers. **Nutrition journal**, v. 14, n. 1, p. 94, 2015.
- GODEIRO J. R. G., MONTENEGRO R, FAGUNDES S. D. Evaluation of the cicatrizing activity of a chitosan based spray for the treatment of burn wounds in a horse a case study. **IBEROAMERICAN CHITIN SYMPOSIUM**, 6; **INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHITIN AND CHITOSAN**, 12, 2012; Fortaleza, Brazil. **Anais...** São Paulo: Instituto de Química de São Carlos, 2012. p. 1-2.
- HARRIS, M. I. N. de C. **Pele-estrutura, propriedades e envelhecimento**. São Paulo: Senac, 2003.
- HARPER, D; YOUNG, A; MCNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 32, n. 9, p. 445-450, 2014.
- HASSIMOTO, N. M .A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.
- HUANG, S. et al. Analgesis and wound healing effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on scalded rats. **Journal of Ocean University of China**, v. 13, n. 5, p. 837-841, 2014.
- JAITAK, V.; BANDNA; SINGH, B.; KAUL, V. K. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Phytochemical Analysis**, v. 20, p. 240-245. 2009.
- JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, Tamil; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food research international**, v. 36, n. 2, p. 117-122, 2003.
- JESUS, W.M.D.M.; CUNHA, T.N.D. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 2, n. 1, p. 20-46, 2012.
- JORDÃO, A. M. Estrutura e composição das proantocianidinas da uva: evolução ao longo da maturação. **Millenium**, v. 17, n. 19, p. 12, 2000.
- KHALIL, E. A.; AFIFI, Fatma U.; AL-HUSSAINI, Maysa. Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 104-112, 2007.
- KALLITHRAKA, S. et al. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. **Journal Food Comp. Anal.**, v. 18, p. 375-386, 2005.

- KENNEDY, J.A. et al. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, n. 6, p.244-254, 2000.
- KENNEDY, J. A.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Grape and wine phenolics: history and perspective. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 3, p. 239-248, 2006.
- KUMAR, S. et al. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. **Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.**, v. 63, p. 173-177, 2014.
- LAGE, F. F. **Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageiras**. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2009.
- LAGHI, L., et al. Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach. **Food chemistry**, v. 3, n. 121, p. 783-788, 2010.
- MAYOL, L. et al. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1483-1493, 2014.
- MITCHELL, R. N. et al. **Fundamentos de patologia: Robbins & Cotran**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- MONTAGNA, W.; EBLING, F. J. G. W. Encyclopædia Britannica. **Human Skin – anatomy**. 2016. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/human-skin>>. Acesso em: 31 maio. 2017.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p.892-896, 2005.
- MOREIRA, L. Vitis - o mundo das uvas. **Uvas de mesa x uvas de vinho**. 2015. Disponível em: <<http://www.vittis.com.br/2015/12/24/uvas-de-mesa-x-uvas-de-vinho>>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- MOTA, R.V. et al. Composição físico-química de uvas para vinho fino em ciclos de verão e inverno. **Rev Bras Frutic**, n. 32, p.1127-1137, 2010.
- MOTA, R.V. et al. Produtividade e composição físico-química de bagas de cultivares de uva em distintos porta-enxertos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 6, n. 44, p. 576-582, 2009.
- NAIR, L. S; LAURENCIN, C.T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**. p. 47-90, out. 2005.

NASCIMENTO, A. P. R. **Quantificação dos taninos dos vinhos por transformada de fourier dos espectros no infravermelho médio (FTIR)**. 2011. 59f. Dissertação (Mestrado em Viticultura e Enologia) – Universidade técnica de Lisboa, ULISBOA, Lisboa, 2011.

NASCIMENTO, E. G. et al. Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as alternative for burn wound treatment in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 24, n. 6, p. 460-465, nov./dez. 2009.

OKAMOTO, Y. et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 3, p. 337-342, 2003.

OLEJAR, K. J. et al. Superior antioxidant polymer films created through the incorporation of grape tannins in ethyl cellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4545-4556, 2014.

OLIVEIRA, D. A. de et al. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (Vitis vinifera) das variedades merlot e syrah**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. D. M.; DIAS, R. V. D. C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

OLIVEIRA, K. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 211-222, jul./dez. 2012.

PATRULEA, V. et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417-426, 2015.

PENG, Yong; WU, Yan; LI, Yunfei. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. **International journal of biological macromolecules**, v. 59, p. 282-289, 2013.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (Musa spp)**. 2010. 138f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2010.

PERES, I. Et al. Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 1, n. 86, p.147-153, 2011.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, Navam S. Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, 2011.

PIMPÃO, R. C. S. **Compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em espécies de Juniperus: análise da produção sazonal e sob condições de stresse**. 2009. 54f. Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Universidade de Lisboa, ULISBOA, Lisboa, 2009.

PIRIZ, M. A. et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 3, p. 628-636, 2014.

POWERS, Jennifer Gloeckner; MORTON, Laurel M.; PHILLIPS, Tania J. Dressings for chronic wounds. **Dermatologic therapy**, v. 26, n. 3, p. 197-206, 2013.

PROTAS, J. F. da S. Balanço da vitivinicultura mundial em 2014. **Informativo da Associação Gaúcha de Produtores de maçã**, Rio Grande do Sul, set. 2015. Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br/pdf/Balan%C3%A7oDaVitiviniculturaMundialEm2014-rotas.pdf>> Acesso em: 16 ago. 2017.

QIN, Caiqin et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate polymers**, v. 63, n. 3, p. 367-374, 2006.

QUEIROZ, C. R. A. dos A; MORAIS, S. A. L; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*myracrodruon urundeuva*). **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RAY, M. et al. Development and Characterization of Chitosan based Polymeric Hydrogel Membranes. **Designed Monomers & Polymers**, v. 13, n. 3, p. 193- 206, 2010.

RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E.J.; EVERETT, D.W. Antioxidant activity and recovery of green tea catechins in full-fat cheese following gastrointestinal simulated digestion. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 48, p.13-24, 2016.

RASHIDINEJAD, A. et al. Effects of catechin on the phenolic content and antioxidant properties of low-fat cheese. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 12, n. 48, p. 2448-2455, 2013.

REGINA, M.D.A. et al. Influência da altitude na qualidade das uvas ‘Chardonnay’ e ‘Pinot Noir’ em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 1, n. 32, p. 143-150, 2010.

RICCI, A. et al. Spectroscopy analysis of phenolic and sugar patterns in a food grade chestnut tannin. **Food chemistry**, n 203, p.425-429, 2016.

RICCI, A. et al. Analytical profiling of food-grade extracts from grape (*Vitis vinifera* sp.) seeds and skins, green tea (*Camellia sinensis*) leaves and Limousin oak (*Quercus robur*) heartwood using MALDI-TOF-MS, ICP-MS and spectrophotometric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, n 59, p.95-104, 2017.

RHODES, P. L. et al. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. **International journal of food microbiology**, v. 107, n. 3, p. 281-286, 2006.

- ROCKENBACH, I.I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.1, p.238-244, 2008.
- RODRIGUES, A. **Desenvolvimento da videira 'Itália' em clima tropical de altitude**. 2009. 97f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2009.
- RODRIGUES, C. G. **Atividade antibacteriana de taninos extraídos de folhas de Psidium guineense Sw. (MYRTACEAE)**. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Montes Claros, UNIMONTES, Montes Claros, 2008.
- ROSASCO, F. V. **Estudo Sazonal e caracterização do Aerosol Black Carbon medido no INPE de São José dos Campos**. 2009. 160 f. Dissertação (Mestrado em Meteorologia) - Instituto Nacional de Pesquisa Espacial, INPE, São José dos Campos, 2009.
- RUBILAR, Javiera F. et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 466-474, 2013.
- SAAD et al. Characterization of Tunisian Aleppo pine tannins for a potential use in wood adhesive formulation. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p.517-525, 2014.
- SANTOS, J. M. et al. Avaliação da atividade biológica da *musa* spp (bananeira): revisão integrativa da literatura. **Rev. enferm UFPE on line**, Maceió, v. 6, n. 8, p. 1948-1957, set./out. 2012.
- SANTOS, T. C. C. dos. **Spray de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas**. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade federal de Goiás, UFG, Goiânia, 2016.
- SATO, A. J. et al. Comportamento fenológico e produtivo da videira 'Jacquez' (*Vitis bourquina*) no norte do Paraná. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 231-237, 2008.
- SCHOLZ, B., LIEBEZEIT, G. Chemical screening for bioactive substances in culture media of microalgae and cyanobacteria from marine and brackish water habitats: first results. **Pharmaceutical biology**, v. 44, n. 7, p. 544-549, 2006.
- PARANÁ (Estado). Secretaria da agricultura e do abastecimento. **Fruticultura – safra 2016/17**. Paraná, 2017.
- SILVA, H. S. R. C. et. al. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- SILVA, J. M. et. al. Caracterização dos taninos condensados da maniçoba e de duas espécies afins. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 4, 2009, Belém. **Anais...** Belém: Pesquisa e inovação da rede norte e nordeste de educação tecnológica, 2009. p. 1-6.

- SILVA, L. C da et al. Níveis de produção em vinhedos de altitude da cv. Malbec e seus efeitos sobre os compostos fenólicos. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 675-680, 2008.
- SILVA, L. L. et al. Importância do uso de plantas medicinais nos processos de xerose, fissuras e cicatrização na diabetes mellitus. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 827-835, 2015.
- SILVA, S.D. et al. Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. **Food chemistry**, v. 150, p. 489-493, 2014.
- SIRIPATRAWAN, Ubonrat; HARTE, Bruce R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 770-775, 2010.
- SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. **Food Research International**, v. 41, n. 8, p. 781-785, 2008.
- SOARES, Marcia et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.
- SOUSA, F. M. S. et al. Caracterização de membranas de quitosana com extrato foliar aquoso de *combretum duarteanum* cambess. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 22, 2016, Natal. **Anais**. Natal: congresso brasileiro de engenharia e ciência dos materiais, 2016. p. 3768-3777.
- SÜNTAR, I. et al. Assessment of wound healing activity of the aqueous extracts of *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. fruits and leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-7, 2009.
- TAVARES, C. S.; HORA, E. C. Caracterização das vítimas de queimaduras em seguimento ambulatorial. **Rev Bras Queimaduras**, v. 10, n. 4, p. 119-23, 2011.
- TURI, E.A. **Thermal characterization of polymeric materials**. Florida: Academic Press, 1981.
- VALVERDE, N. et al. Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. **European Food Research and Technology**, v. 6, n. 235, p. 1117-1123, 2012.
- VAQUERO, MJ Rodríguez; ALBERTO, M. R.; DE NADRA, MC Manca. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, n. 2, p. 93-101, 2007.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERGARA-SALINAS, J.R., et al. Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 28, p. 6929-6936, 2013.

VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

WANG, L. et al. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2012.

YOUNG, A; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 475-479, 2011.

YOUNG T. Choosing a wound dressing. **Practice Nurse**, v. 27. n. 3, p. 24-29, 2015.

ZHAO, X. Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. **Powder Technology**, v. 286, p. 838-844, 2015.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.