

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBiotec

**INVESTIGAÇÃO DAS POTENCIALIDADES DE *Rubus sellowii* CHAM. & SCHLTDL.
(ROSACEAE)**

Marelise Teixeira

Lajeado, fevereiro de 2017

Marelise Teixeira

**INVESTIGAÇÃO DAS POTENCIALIDADES DE *Rubus sellowii* CHAM. & SCHLTDL.
(ROSACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, com parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa em produção primária de alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisete Maria de Freitas

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Clélia Paulete Correia Neves Afonso

Lajeado, fevereiro de 2017

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

Marelise Teixeira

**INVESTIGAÇÃO DAS POTENCIALIDADES DE *Rubus sellowii* CHAM. & SCHLTDL.
(ROSACEAE)**

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa em Produção Primária de Alimentos.

Prof^a. Dr^a. Elisete Maria de Freitas – Orientadora
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Clélia Paulete Correia Neves Afonso – Coorientadora
Instituto Politécnico de Leiria

Prof^a. Dr^a. Lucélia Hoehne
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Mônica Jacheti Maciel
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Teresa Margarida Lopes da Silva Mouga
Instituto Politécnico de Leiria

Lajeado, fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado me iluminando em todos os momentos difíceis desta jornada;

A minha família, que esteve e sempre vai estar do meu lado em todas as etapas da minha vida.

Ao meu namorado Rafael que além de fazer parte de toda esta trajetória, sempre me apoiou, incentivou e pelo seu amor e dedicação;

A minha orientadora, amiga e chefe Elisete Maria de Freitas pelo exemplo de pessoa e professora, sempre me orientando, me incentivando e puxando a orelha quando necessário, sempre com a mesma paciência, confiança e amizade;

A minha coorientadora Dra. Clélia Neves Afonso que mesmo longe sempre contribui para o desenvolvimento das atividades pertinentes ao meu projeto.

Ao Centro Universitário UNIVATES pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação;

Aos bolsistas do Laboratório de Botânica, em especial à Fernanda, Carla, Letícia e Daniele que auxiliaram nas coletas de amora-preta e na montagem dos experimentos;

A professora Dra. Lucélia Hoehne e suas bolsistas Taciélen e Débora que me auxiliaram com as análises físico-químicas;

Ao professor Dr. Eduardo Mirando Ethur e suas bolsistas Bárbara, Bruna e Talissa pela ajuda e paciência nas análises microbiológicas;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho;

E por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!!!

Sumário

1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	8
1.1. Objetivo geral	10
1.2. Objetivos específicos.....	10
2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	11
3 – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	12
3.1 Coleta do material botânico.....	12
3.2. Caracterização físico-química de frutos	12
3.2.1 Determinação de umidade (U).....	12
3.2.2 Determinação de cinzas (C).....	13
3.2.3 Determinação de proteínas totais (PT)	13
3.2.4 Determinação de lipídios totais (LT)	13
3.2.5 Determinação de carboidratos totais (CT)	13
3.2.6 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	13
3.2.7 Determinação da acidez titulável (AT)	14
3.2.8 Determinação de fibras (F).....	14
3.2.9 Aminograma.....	14
3.2.10 Determinação de ácido L-ascórbico (vitaminas C) (AA)	15
3.2.11 Determinação de carotenoides e Licopeno	15
3.2.12 Teste de digestibilidade (D).....	16
3.3 Estudo fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos	16
3.3.1. Preparo dos extratos.....	16
3.3.2 Quantificação total de polifenóis	17
3.3.3 Quantificação total de flavonoides	18
3.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante (redução do radical DPPH).....	18
3.3.5 Atividade antimicrobiana	19
3.3.5.1 Meios de cultura, microrganismos e antibiótico.....	19
3.3.5.2 Preparo do inóculo.....	19
3.3.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima	20
3.3.5.4 Confirmação da concentração inibitória mínima	20
3.3.5.5 Concentração bactericida mínima (CBM)	21
3.4 Avaliação da atividade Alelopática.....	21
3.4.1 Preparo dos extratos.....	21
3.4.2 Bioensaio de germinação	22

3.4.3 Bioensaios de crescimento.....	22
4. RESULTADOS	24
CAPITULO 1	25
<i>Rubus sellowii</i> Cham. & Schltdl. (Rosaceae) Fruit Nutritional Potential Characterization.....	25
CAPITULO 2	38
Estudo fitoquímico, atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas e frutos de <i>Rubus sellowii</i> Cham. & Schltdl. (Rosaceae)	38
CAPÍTULO 3	55
AÇÃO ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E FRUTOS DE <i>Rubus sellowii</i> Cham. & Schltdl. (ROSACEAE)	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS	86

1 - INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil abriga em seu território a maior diversidade biológica do Planeta (Ganem, 2010), apresentando, por esta razão, alto potencial para a criação de novas opções para a produção de medicamentos, cosméticos e alimentos (Ridgen e Cavalcanti, 2002; Scariot, 2010), constituindo numa importante alternativa de renda. No entanto, para que a sua exploração seja possível, viabilizando o desenvolvimento de novos produtos, é preciso garantir a preservação do ambiente, mantendo o equilíbrio entre as populações das diferentes espécies. Assim, além de ganhos econômicos com a implantação de novas culturas, é preciso garantir a manutenção da biodiversidade.

A exploração do potencial das espécies vegetais nativas só é possível com maior conhecimento sobre as espécies, de estratégias para difusão deste conhecimento e de estímulo para o uso da flora nativa pela indústria e pela sociedade (Leite e Coradin, 2011). Também é indispensável que existam investimentos para obtenção de tecnologias sustentáveis, disponibilidade de matéria-prima, capacitação técnica e criação de mercados que proporcionem a comercialização desses recursos. Porém, é necessária a adoção de políticas voltadas à valorização das espécies nativas nos diversos segmentos produtivos (Leite e Coradin, 2011). É o que também sugere a Organização Mundial de Saúde ao estimular o resgate dos usos tradicionais e populares das plantas medicinais e fitoterápicas como elemento indispensável para a promoção da saúde (BRASIL, 2007). Em resposta a isso, em 2006 o Brasil aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (PNPMF) com o propósito de incentivar o uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006).

Apesar da aprovação da PNPMF e de o Brasil apresentar alta diversidade de espécies, dentre estas muitas com potencial para a produção de alimentos, o país é totalmente dependente de plantas exóticas, pois poucas dessas espécies são conhecidas ou estão disponíveis no mercado (Coradin, 2011). O estudo das potencialidades das espécies nativas e a sua domesticação são excelentes oportunidades para os países ricos em recursos genéticos, pois pode influenciar no desenvolvimento e na qualidade de vida da população (Myers et al., 2000). A procura por alimentos que satisfaçam as exigências nutricionais para a manutenção da saúde tem aumentado a demanda para a produção de frutas (Antunes, 2004).

Diante do exposto, foi selecionada a espécie frutífera *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae), conhecida como amora-do-mato ou amora-preta, nativa e endêmica do Brasil com boas perspectivas de comercialização (Antunes, 2004). Também faz parte do grupo das espécies conhecidas como pequenas frutas

(Barbieri e Vizzoto, 2012). Além disso, frutas de coloração vermelho intenso são excelentes fontes de compostos bioativos (Carlsen et al., 2010; Vizzotto, 2012), como os compostos fenólicos e os carotenoides (Munhoz et al., 2014). Entre estes compostos estão as antocioninas que possuem propriedades terapêuticas e atuam contra doenças cardiovasculares, são protetoras do DNA e apresentam atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (Vizzotto, 2012). A espécie também está entre as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) (Kinupp, 2007).

Vários estudos sobre espécies do gênero *Rubus*, incluindo cultivares (híbridos), indicam a presença de uma série de constituintes químicos e de funções relacionadas às qualidades da amora-preta (Jacques e Zambiasi, 2011). Segundo Shin et al. (2014). A espécie *Rubus coreanus* Miquel, por exemplo, é utilizada popularmente para o combate do câncer de próstata e doenças do fígado, além de conter vários antioxidantes. Além disso, os frutos da amora-preta (*Rubus* spp.) apresentam alta qualidade nutricional e valor econômico (Antunes, 2002), sendo fonte de carboidratos, vitaminas do complexo B, vitamina A, minerais e cálcio (Antunes, 2002; Antunes, 2004; Jacques e Zambiasi, 2011), além de ser fonte de antioxidante natural (Koca e Karadeniz, 2009), fibras, metabólitos secundários e compostos fenólicos (Jaakkola et al., 2012). Eles também apresentam ácidos graxos essenciais como o linoléico, o linolênio e seus derivados que regulam várias funções do corpo, incluindo pressão arterial, imunidade, resposta inflamatória e viscosidade sanguínea (Simopoulos e Salem, 1996; Pawlosky et al., 1996).

O consumo dos frutos frescos ou processados (*Rubus* spp.) está associado a várias atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana e anti-cancerígena (Bobinaitė et al., 2012), reduzindo o risco de acidentes cardiovasculares e de doenças neurodegenerativas (Kusznierewicz et al., 2012). Na China, os frutos de *Rubus chingii* H.H. Hu são utilizados na medicina para o tratamento de ejaculação precoce, impotência e incontinência urinária (Zhong et al., 2015).

Bobinaitė et al. (2012) identificaram a presença de antocianinas, elagitaninos e monômeros como classes principais de compostos fenólicos nas frutas do gênero *Rubus*. Os compostos fenólicos incluem ácidos (hidroxicinâmico e hidroxibenzóico) e flavonóides livres, como as agliconas glicosiladas (catequina, epicatequina, quercetina e campferol). Sua ocorrência, tipo e quantidade podem variar devido a fatores genéticos, ambientais e/ou tratamento, colheita, armazenamento e análise. Segundo Antunes (2004), entre todos os compostos da amora-preta encontra-se o ácido elágico, um potente inibidor da indução química do câncer pelas funções anti-mutagênicas, anticancerígenas (Antunes, 2004), e propriedades inibidoras contra a replicação do vírus HIV (Maas et al., 1991).

O estudo realizado por Hummer (2010) sobre a farmacologia de *Rubus* sugere que os frutos serviram de alimento e fonte medicinal para os povos nativos logo após o período glacial, traz também um relatório sobre o histórico de usos medicinais de *Rubus*. Segundo o mesmo autor, são inúmeras as aplicações de *Rubus*, sendo

utilizadas todas as partes da planta (hastes, ramos, raízes, folhas, frutos e flores). O chá dos ramos era utilizado para cessar diarreia, tingir o cabelo, evitar o corrimento vaginal e como antígeno contra picada de cobra. As folhas eram mastigadas para fortalecer a gengiva e para hemorroidas. As flores trituradas com óleo reduziam inflamações dos olhos, erupções cutâneas e, em infusões com água ou vinho, auxiliavam no combate às doenças do estômago. Extratos de frutos têm sido utilizados como corantes e estão agora sendo testados como anti-carcinogênico, antiviral, antialérgico e como hidratante (cosméticos) (Hummer, 2010). Desta forma, o estudo da espécie selecionada se faz necessário frente aos benefícios que pode trazer à população, viabilizando a elaboração de novos produtos e garantindo a exploração sustentável.

1.1. Objetivo geral

Indicar as potencialidades de *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl., favorecendo a exploração adequada da espécie.

1.2. Objetivos específicos

- Conhecer as características físico-químicas e nutricionais de frutos de *Rubus sellowii*, visando estimular a sua utilização no desenvolvimento de novos produtos alimentícios.
- Avaliar os principais grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos aquoso, hidroetanólicos e etanólicos de folhas e frutos de *Rubus sellowii*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos aquoso, hidroetanólicos e etanólicos de folhas e frutos de *Rubus sellowii*.
- Verificar se o extrato aquoso de folhas e frutos de *Rubus sellowii* apresenta efeito fitotóxico sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa*.

2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A estrutura da dissertação está em forma de três capítulos, os quais contêm os resultados dos estudos realizados e redigidos na forma de artigos. Os capítulos estão formatados de acordo com as normas definidas pelo corpo editorial das revistas a que se pretende a submissão. Inicialmente é apresentada a metodologia de todos os estudos realizados com a espécie e, em seguida constam os resultados estruturados em capítulos, conforme descrito a seguir.

No capítulo 1 está exposta a caracterização físico-química dos frutos de amora-preta através do artigo ***Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae) Fruit Nutritional Potential Characterization**. O capítulo apresenta as análises físico-químicas dos frutos com a finalidade de caracterizar os teores nutricionais presentes em três populações da espécie. O referido artigo encontra-se nas normas da revista Journal of Functional Foods para onde foi enviado. As normas da revista encontram-se em anexo (Anexo 1).

O capítulo 2, intitulado **Estudo fitoquímico, atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae)**, apresenta a caracterização dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos aquosos, hidroetanólicos e etanólicos de folhas e frutos da espécie. O capítulo está estruturado na forma de artigo científico a ser submetido na revista Journal Medicinal Plants Research após considerações da banca e tradução para a língua inglesa. As normas da revista encontram-se no anexo (Anexo 2).

O capítulo 3, **Ação alelopática dos extratos aquosos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schktdk. (Rosaceae)**, apresenta o estudo sobre o efeito dos extratos aquosos de folhas e frutos da espécie sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* (alface). O capítulo está estruturado na forma de artigo científico a ser submetido para a Brazilian Journal of Botany após considerações da banca e tradução para a língua inglesa. As normas da revista encontram-se no anexo (Anexo 3).

Na sequência são apresentadas as considerações finais, considerando todos os estudos realizados com a espécie, a lista total de referências e os anexos.

3 – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Coleta do material botânico

As plantas selecionadas para coleta dos frutos e folhas *Rubus sellowii* (Figura 1A-B) estão localizadas nos municípios de Lajeado (29°26'40.80" S e 51°56'19.93" W), Sério (29°23'19.68" S e 52°17'28.61" W), Canudos do Vale (29°19'52.57" S e 52°16'08.27" W), Arroio do Meio (29°19'26.37" S e 51°59'54.09" W) e Progresso (29°15'09.94" S e 52°22'34.39" W), distantes de moradias, rodovias e lavouras a fim de evitar contaminações. O período de coleta ocorreu sempre no período da manhã, entre as 7:00 e 12:00, durante os meses de Fevereiro, Março e Abril.



Figura 1: A – frutos em vários estágios de maturação; B – inflorescência; C – estágio inicial de desenvolvimento dos frutos.

3.2. Caracterização físico-química de frutos

Os frutos coletados foram levados para o laboratório de Química e de Nutrição e separados para cada uma das avaliações quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos, pH, acidez, e fibras.

3.2.1 Determinação de umidade (U)

Foram pesadas 5,0 g de amostra em triplicata, as quais foram secas individualmente até atingir peso constante em estufa a 105 °C (Instituto Adolf Lutz, 2008). A fórmula aplicada foi $U = \frac{100 \cdot N}{P}$, onde N corresponde

ao número de gramas de umidade (perda de massa em gramas) e P corresponde à quantidade inicial da amostra em gramas.

3.2.2 Determinação de cinzas (C)

Foram pesadas 5,0 g de amostra em cápsula de porcelana descontaminada. Estas foram mantidos por quatro horas em mufla a 550 °C. Posteriormente ao tempo de aquecimento, a amostra foi novamente pesada (Instituto Adolf Lutz, 2008). A fórmula aplicada foi $C = \frac{100*N}{P}$, onde N corresponde à quantidade de massa perdida com o aquecimento e P corresponde à quantidade inicial da amostra em gramas.

3.2.3 Determinação de proteínas totais (PT)

O método empregado foi de Kjeldahl, o qual se divide em três etapas: digestão, destilação e titulação (Instituto Adolf Lutz, 2008). A fórmula aplicada foi $PT = \frac{V*0,14*f}{P}$, onde V corresponde ao volume de ácido sulfúrico 0,1M gastos na titulação, P corresponde ao número de gramas da amostra e f corresponde ao fator de correção da solução de ácido sulfúrico (6,25) e 0,14 é a massa do nitrogênio dividida por 100.

3.2.4 Determinação de lipídios totais (LT)

A quantificação dos lipídios foi realizada no laboratório UNIANÁLISES Laboratório de análises e prestação de serviços UNIVATES realizada em AOAC. Official Methods of Analysis (2012). Method 920.177, Cap. 44, p. 24. (Anexo 4).

3.2.5 Determinação de carboidratos totais (CT)

A determinação foi feita através do cálculo por diferença de 100 gramas de amostra e a soma total dos valores encontrados para umidade, proteína, lipídios e cinzas (Instituto Adolf Lutz, 2008), ou seja, 100g (amostra) menos a soma total dos componentes.

3.2.6 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Foram utilizados 10 g de amostra diluída em 100 mL de água, usando um pHmetro Digimed (Instituto Adolf Lutz, 2008).

3.2.7 Determinação da acidez titulável (AT)

Foram pesadas 5,0 g de amostra úmida dos frutos, a qual foi acrescentado 50 mL de água e duas gotas da solução fenolftaleína 1% e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até atingir coloração rósea (Instituto Adolf Lutz, 2008). A fórmula aplicada foi $AT = \frac{V * f * 100}{P * c}$, onde V corresponde ao volume (em mL) da solução de hidróxido de sódio 0,1M gasto na titulação, f corresponde ao fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 M, P corresponde à quantidade inicial da amostra usada na titulação e c corresponde à correção para solução de NaOH 1 M, 10 para solução NaOH 0,1 M e 100 para solução NaOH 0,01 M.

3.2.8 Determinação de fibras (F)

A quantificação de fibra alimentar total dos frutos foi realizada no laboratório do Grupo Eurofins. Sendo que para a determinação das fibras alimentares o método utilizado foi AOAC 991.43 – Fibra Alimentar Total. (Anexo 5).

3.2.9 Aminograma

A polpa dos frutos utilizada para a análise foi uma mistura homogênea dos frutos dos três municípios devido o amadurecimento e baixa quantidade encontrada. O preparo da amostra passou por um processo de hidrólise ácida, sendo utilizado 120 mg da amostra em triplicata adicionado 30 mL de ácido clorídrico 6 molar, e colocados em estufa a 110 °C por 24 horas. Após foi realizada a etapa de evaporação em fluxo de nitrogênio e a temperatura da amostra a 65°C. O evaporado foi recuperado através da utilização de 5 mL de fase móvel A e filtrada com filtro para seringa de acetato celulose 0,45 um e analisada no HPLC. As soluções padrão utilizadas foram solução padrão AA-MA Shimadzu: citrato de sódio 0,20 N (ajustado para pH 3,2 com ácido perclórico) e 7 % de etanol; solução padrão AA-MB Shimadzu: citrato de sódio 0,60 N e ácido bórico 0,20 M (ajustado para pH 10,0 com hidróxido de sódio 4 M). Solução padrão AA-MC Shimadzu: hidróxido de sódio 0,20 M. Solução tampão AA-RA Shimadzu: solução de ácido bórico – ácido carbônico (pH 10,0). Solução padrão AA-RB Shimadzu (Solução reagente de orto-ftaldeído - OPA): solução de ácido bórico – ácido carbônico (pH 10,0), 0,08 % de OPA, 1,40 % de etanol, 0,10 % de n-acetil-l-cisteína e 0,04% de hipoclorito de sódio. Os aminoácidos analisados foram Asp – ácido aspártico, Thr – treonina, Ser – Serina, Glu – ácido glutâmico, Pro – prolina, Gly –

glicina, Ala – alanina, Cys – cisteína, Val – valina, Met – metionina, Lle – isoleucina, Leu – Leucina, Tyr – tirosina, Phe – fenilalanina, His – histidina e Lys – lisina.

A análise quantitativa dos aminoácidos foi realizada em HPLC da marca Shimadzu, a bomba da fase móvel LC-20AT e a bomba reagentes LC-20AD, coluna Shim-parck Amino-Na 6,0mm id x 100mm e Trap ISC-30/S 0504 (Na) 4,0mm id x 50mm. Na fase móvel A, a temperatura da coluna é 60 °C com fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção de amostra foi de 10. Este método foi desenvolvido pela Shimadzu (2008).

3.2.10 Determinação de ácido L-ascórbico (vitaminas C) (AA)

Para a análise foram pesadas 0,5 g de amostra em triplicata e se adicionou 50 mL de solução de ácido oxálico 1% (m/v) no erlenmeyer. Após as amostras foram tituladas com solução de 2,6-diclorofenolindofenol-sódio até a coloração rosa persistente. Para a solução padrão de ácido ascórbico foram pesados 0,05g de ácido ascórbico p.a. e diluído em 100 ML de solução de ácido oxálico 1%. E para a solução padrão utilizada para a titulação foram pipetados 10 mL da solução padrão de ácido ascórbico (triplicata) em erlenmeyer contendo 50 mL de solução de ácido oxálico e em seguida, foram titulados com solução de 2,6-diclorofenolindofenol-sódio até a coloração rosa persistente (MAPA/SDA/CGAL, 2013).

3.2.11 Determinação de carotenoides e Licopeno

Para a determinação dos teores de carotenoides foram pesadas 3 g de polpa de fruta em triplicata, ao quais foram acrescidas 3 g de celite para formação de uma pasta. Em seguida foram adicionados 20 mL de acetona, deixando-se decantar para posterior retirada do sobrenadante e realização da filtração. Na parte decantada adicionou-se mais acetona até a mesma ficar esbranquiçada. Os filtrados foram colocados num funil de separação junto com 30 mL de éter de petróleo, agitou-se vagarosamente e acrescentando 100 mL de água destilada pelas paredes do balão, evitando a formação de emulsão. Observou-se a formação de duas fases uma com éter de petróleo mais carotenoides e a outra com água e acetona. A fase com água e acetona foi descartada, adicionando mais água no balão até a remoção da acetona. Em seguida, a fase com éter de petróleo mais carotenoides foi filtrada através da adição de um pouco de sulfato de sódio anidro para remoção da água. O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL âmbar completando o volume com éter de petróleo. O teor de carotenoides totais e licopeno foram determinados em um espectrofotômetro em 450 e 470 nm respectivamente. Esta análise foi realizada de acordo com Rodriguez-Amaya e Kimura (2004).

3.2.12 Teste de digestibilidade (D)

A determinação da digestibilidade *in vitro* foi baseada no trabalho de Schmidt (2008), adaptando as condições da amostra desse estudo. Inicialmente foi pesada uma quantidade de amostra que corresponda ao equivalente a 0,5 g de proteína. Após, foi adicionado 15 mL de uma solução de 1,5 mg de pepsina por mL de HCl 0,1 N e 0,5 mL de solução de digluconato de clorexidina (10 mg/mL), homogeneizando e levada a banho-maria a 37°C por três horas, com agitação periódica. Posteriormente ao tempo, os tubos contendo as amostras foram resfriados e a solução foi ajustada a pH 8,0 com uma solução de NaOH 0,2 N.

Ao produto hidrolisado pela pepsina, foi adicionado 10 mL de uma solução de pancreatina (0,5 mg de pancreatina por mL de tampão fosfato pH 8,0) a qual foi deixada em banho-maria a 37°C, por 24 horas com agitação periódica. Decorrido o tempo de hidrólise foi adicionado 5 mL de uma solução de TCA 5% à amostra. A mesma foi centrifugada por 15 minutos para separação do material insolúvel, de forma que o filtrado resultante foi recolhido para posterior determinação do nitrogênio digerido pelo método de Kjeldhal. A digestibilidade *in vitro* foi expressa como a porcentagem de nitrogênio digerido em relação ao nitrogênio total na amostra inicial. A fórmula utilizada para calcular foi $D(\%) = (Nd * 100) / Nt$, onde Nd corresponde ao nitrogênio digerido e Nt ao nitrogênio total.

3.3 Estudo fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos

3.3.1. Preparo dos extratos

O preparo dos extratos de folhas e frutos seguiu o método adaptado de Mayachiew e Devahastin, (2008). Após a coleta, folhas e frutos foram lavados, selecionados considerando o estado fitossanitário e congelados a -80 °C. As amostras em estudo foram liofilizadas e trituradas e então mantidas sob refrigeração a -80 °C até posterior utilização. No caso dos frutos, as sementes foram retiradas durante o processo de trituração. As amostras em pó de frutos e folhas serviram de base para o preparo dos extratos aquoso etanólico e hidroetanólico com a utilização dos solventes água destilada, etanol 99,8% vol (solvente orgânico polar) e mistura de água destilada e etanol (1:1), respectivamente, totalizando seis extratos (Tabela 1). Para o preparo de cada um dos extratos, todos em triplicata, foram retiradas 5,0 g de pó seco de folhas e de frutos e transferidas para vidros âmbar de 500 mL. Sobre o pó foi adicionado 200 mL dos respectivos solventes, resultando 18 amostras para o estudo. Os extratos foram mantidos em agitação a 125 rpm por 12 horas no escuro (Figura 2a). No final do processo, as soluções foram filtradas em papel filtro e a parte líquida foi armazenada no escuro à temperatura ambiente para posterior utilização (Figura 2b). Os extratos obtidos foram colocados em rotaevaporador em banho termostatizado a 40 °C para evaporação da parte líquida (Figura 2c) (Simões et al., 2004) e então armazenados a 4 °C até a utilização para as análises de polifenóis, flavonoides e atividades antioxidante e antimicrobiana.

Tabela 1 – Extratos preparados a partir de folhas e frutos de *Rubus sellowii* liofilizados com o respectivo solvente utilizado e a identificação de cada um (EtOH – etanol).

Material vegetal	Concentração/Solvente	Código do extrato obtido
FOLHAS (5g em pó)	100 % EtOH	Extrato 1
	50 % EtOH / 50 % H ₂ O (destilada)	Extrato 2
	100 % H ₂ O (destilada)	Extrato 3
FRUTOS (5g em pó)	100 % EtOH	Extrato 4
	50 % EtOH / 50 % H ₂ O (destilada)	Extrato 5
	100 % H ₂ O (destilada)	Extrato 6

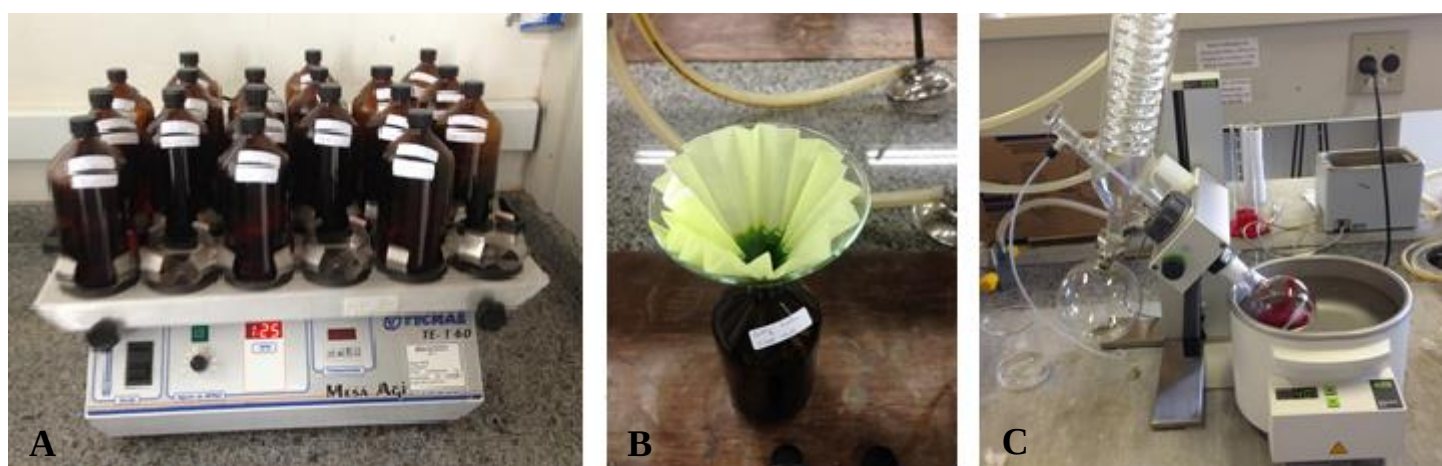


Figura 2: A – Extratos na mesa agitadora; B – Extrato sendo filtrado; C – Extrato no rotaevaporador.

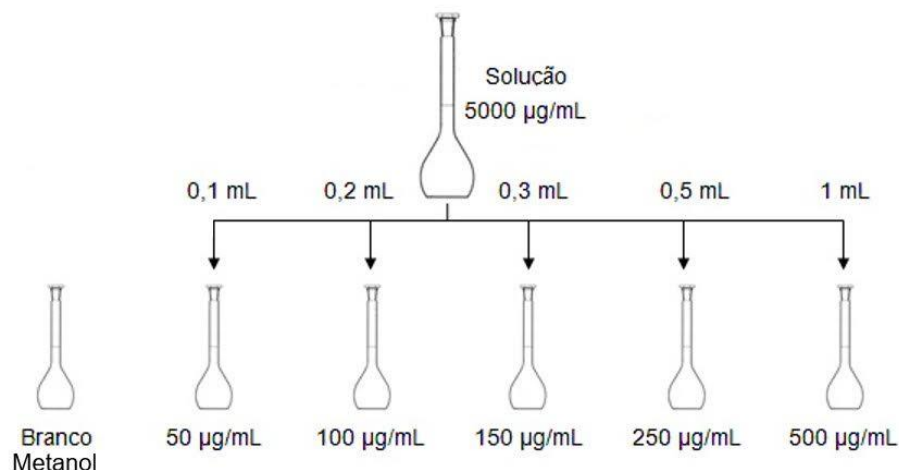
3.3.2 Quantificação total de polifenóis

A quantificação total de polifenóis (QTP) nos extratos de folhas e frutos será avaliada através do método de Folin-Ciocalteu, conforme Souza et al. (2007) e Singleton e Rossi (1965). Este método consiste essencialmente na utilização do ácido gálico como padrão. Para a determinação da concentração do composto foi utilizado 3,16 mL de água destilada, 600 µL de solução carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 15%, 200 µL de solução Folin-Ciocalteu 1 N e 40 µL solução metanólica de ácido gálico na concentração de 5000 µg/mL.

Para a solução padrão foi construída uma curva de calibração de 50, 100, 150, 250 e 500 µg/mL (Figura 3). A avaliação dos extratos foi feita com a substituição da solução metanólica de ácido gálico pelas amostras de folhas e frutos na concentração de 1 mg/mL. Após o preparo das soluções, as mesmas foram agitadas em vórtex por 15 segundos, em seguida colocados em banho-maria a 40 °C por 30 minutos. Passado o tempo de banho foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 765 nm.

A QTP será expressa em mg equivalentes do ácido gálico por grama de extrato de folhas e frutas (mg EAQ/g). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Figura 3 – Modo de preparo da curva padrão de ácido gálico



Fonte: da Autora

3.3.3 Quantificação total de flavonoides

A quantificação total de flavonoides foi determinada pelo método espectroscopia segundo descrito por Woisky e Salatino (1998). Primeiramente foi construída uma curva padrão com solução metanólica de rutina nas concentrações de 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Preparou-se uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) 5%. Após foram adicionados 1 mL de cada uma das diferentes concentrações da curva em cubetas e adicionadas a cada uma delas 2 mL da solução de alumínio.

Para o branco da amostra se procedeu da mesma forma apenas substituindo o cloreto de alumínio por metanol. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta e mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos. Transcorrido o tempo, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro à 415 nm. Para a determinação dos extratos procedeu-se da mesma forma apenas substituindo a solução metanólica de rutina pelas amostras de folhas e frutos em triplicata na concentração de 500 µg/mL.

3.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante (redução do radical DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante foi determinada através da capacidade de redução do radical DPPH por espectrofotometria conforme metodologia descrita por Mensor et al. (2001), em triplicata. Como padrão foi

utilizado uma solução metanólica de ácido ascórbico na concentração de 0,01 %. Foi preparado previamente antes da análise uma solução metanólica de DPPH à 0,004 %. Posteriormente, foi realizada a curva padrão de ácido ascórbico nas seguintes concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µg/mL. Em seguida, foram separadas seis cubetas, em uma delas foi acrescentado 1,8 mL de metanol e nas demais foi adicionado apenas 1 mL. Na cubeta com 1,8 mL foi acrescentado mais 200 µL da solução metanólica de ácido ascórbico e a partir desta foram feitas diluições seriadas de 1 mL. Após foi adicionado mais 2 mL da solução metanólica de DPPH em cada uma das cubetas e homogeneizadas com o auxílio de uma micropipeta. Fazendo um intervalo de 40 segundos cronometrados entre cada uma das concentrações. A reação decorrerá no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância será medida em espectrofotômetro a 517 nm e o IC₅₀ foi calculado para cada uma dos extratos, de acordo com a equação $\%AA = 100\left\{\frac{[(Aa - Ab) * 100]}{Ac}\right\}$, onde: Aa corresponde à absorbância da amostra; Ab corresponde à absorbância do branco e Ac à absorbância do controle.

3.3.5 Atividade antimicrobiana

3.3.5.1 Meios de cultura, microrganismos e antibiótico

Para a avaliação da capacidade antimicrobiana foram utilizados dois meios de cultura distintos: o meio Mueller-Hinton para o crescimento das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram negativa) e para *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) (ATCC 25923) e o meio de cultura Sabouraud para o crescimento da levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) para a realização dos antibiogramas. Os meios foram preparados de acordo com as indicações do fabricante e esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. Para *E. coli* o antibiótico utilizado foi Gentamicina na concentração de 120 µg/mL, *S. aureus* foi Vancomicina na concentração de 64µg/mL e para *C. albicans* foi Fluconazol na concentração de 60 µg/mL.

3.3.5.2 Preparo do inóculo

A reidratação dos microrganismos foi realizada em ambiente estéril com o auxílio de alça estéril, transferindo os mesmos para placas contendo os meios adequados para cada microrganismo e incubados *E. coli* e *S. aureus* à 36 °C ± 2 por 24 horas e a *C. albicans* à 25 °C ± 2 por 48 horas. Decorrido o tempo de incubação procedeu-se para a preparação do inóculo diluindo-se o microrganismo em solução salina 0,8 % estéril para obtenção da turbidez pretendida. Para a verificação da turbidez foi realizada uma leitura em espectrofotômetro a 625 nm (NCCLS, 2003), até obtenção da absorbância entre 0,08 e 0,13 na escala de MacFarland segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). Após a obtenção da turbidez pretendida, foi retirado 200 µL do inóculo

e transferido para tubos de ensaio com 10 mL do meio, obtendo-se o meio com inóculo para a determinação da concentração inibitório mínima (CIM).

3.3.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM foi realizada em ambiente estéril pelo método de microdiluição usando placas de acrílico com 96 poços. Com o auxílio de uma micropipeta multicanal foi adicionado da linha A até a linha G 100 µL do meio com inóculo. Na linha A juntamente com o meio com inóculo foi adicionado 100 µL da solução dos extratos em triplicata, o antibiótico conforme o microrganismo em análise e o controle de DMSO e EtOH. Após foi realizada uma homogeneização dos poços da linha A e em seguida uma diluição seriada de 100 µL até a linha F. A linha G foi utilizada como controle positivo, onde só tem meio com inóculo. Já a linha H foi usada como controle negativo, na qual foi adicionado 100 µL de meio sem microrganismo. Ao término das diluições as placas foram incubados em temperatura e tempo adequado para cada microrganismo.

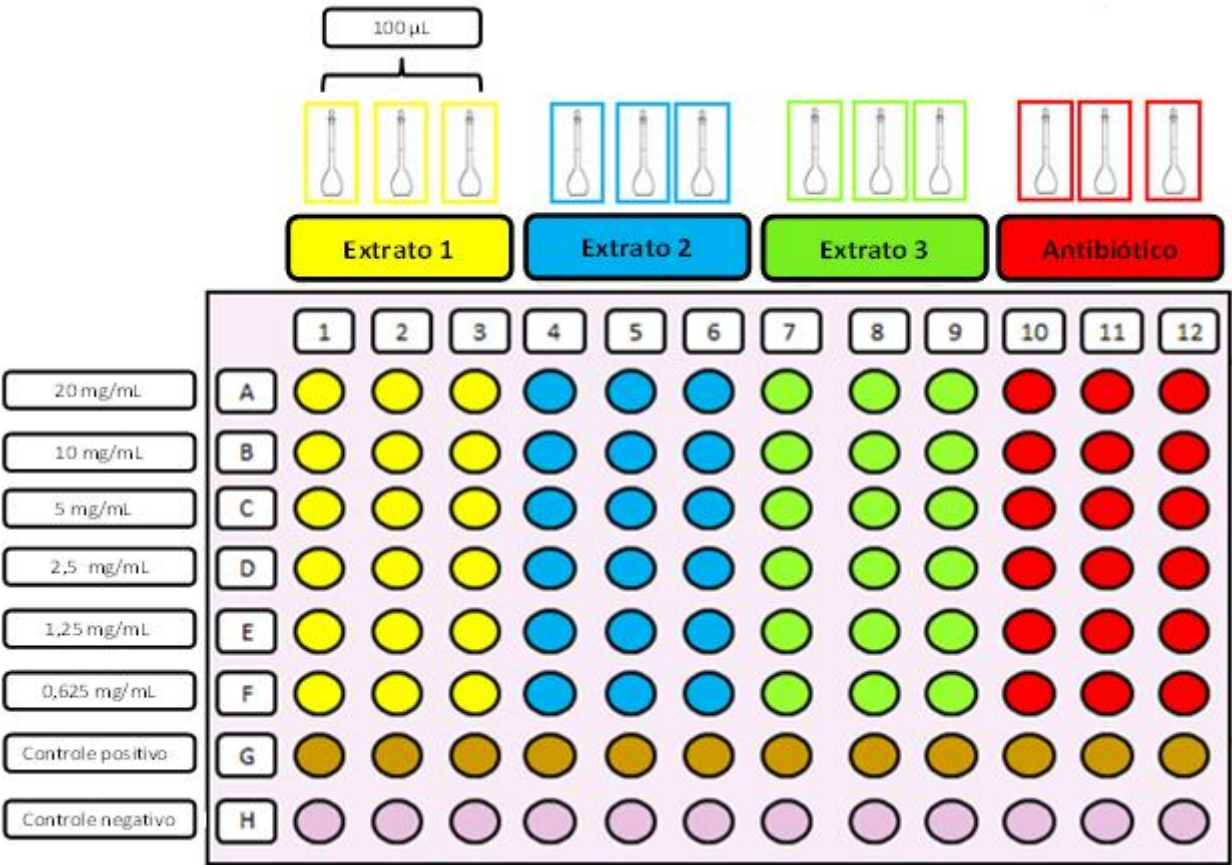


Figura 4: Preparo da placa de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima.

3.3.5.4 Confirmação da concentração inibitória mínima

Para a confirmação do CIM foi adicionado as placas 30 μ L de solução aquosa estéril de resazurina a 0,02 %. Essa solução revela crescimento do microrganismo através da mudança de coloração do azul para o rosa. Após a transferência da resazurina, as placas são mantidas por 30 minutos em temperatura compatível com cada microrganismo.



Figura 5a-b: Revelação das placas com o resazurina. A – Extrato de folhas em *E. coli* e B – Extrato de frutos em *S. aureus*.

3.3.5.5 Concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da CBM, se realizou a semeadura em placas de Petri com meio de cultura adequado de todos os poços onde não houve coloração com o corante utilizado. Em seguida as placas foram incubadas em estufa com tempo e temperatura adequada para cada um dos microrganismos. Decorrido o tempo as placas foram analisadas, onde houve o crescimento do microrganismo no meio de cultura significa ação bacteriostática e a ausência de crescimento significa ação bactericida.

3.4 Avaliação da atividade Alelopática

3.4.1 Preparo dos extratos

Folhas e frutos foram coletados, lavados, congelados e submetidos à liofilização. Após a liofilização, pesou-se 100g das amostras de folhas e frutos que foram macerados e submetidos à infusão em água de osmose reversa, aquecida a 90 °C, na proporção de 1:10 w:v. A seguir foram mantidos para resfriar em temperatura ambiente por uma hora. As infusões foram então filtradas em algodão e os extratos obtidos foram congelados para utilização nos ensaios de germinação e crescimento, realizados no Laboratório de Botânica do Tecnovates, Univates.

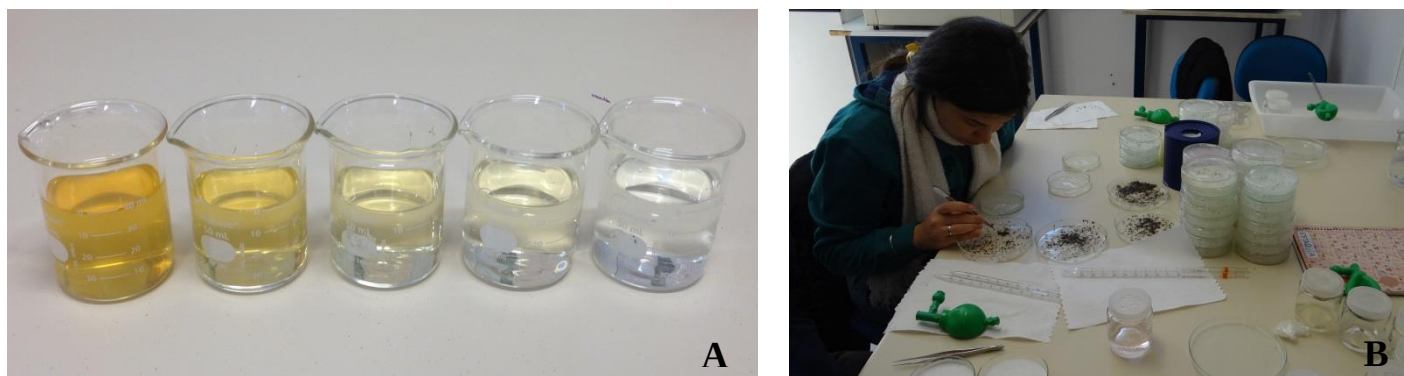


Figura 6: A – Diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas e B – Montagem do bioensaio de crescimento.

3.4.2 Bioensaio de germinação

Foram utilizadas cipselas de *Lactuca sativa* (Gran Rapids) como espécie receptora, distribuídas em placas de Petri (9,0 mm) sobre uma folha de papel germitest. Em cada placa de Petri foram estabelecidas 25 cipselas (uma repetição) de *L. sativa* e 8,0 mL de extrato nas diferentes concentrações (0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0%) e pH ajustado ao mesmo pH do extrato 100%, correspondendo a 14 tratamentos, cada um com quatro repetições com delineamento experimental casualizado valor do pH do extrato puro (2.7), verificado com pHmetro. Após para o tratamento de pH, foi ajustado o pH da água destilada para o mesmo pH do extrato puro.

As placas de Petri foram mantidas por seis dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/luz, temperatura de 25 °C (± 2 °C) e intensidade luminosa de 91 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. A avaliação da germinação foi realizada a cada 12 horas, sendo consideradas como germinadas as cipselas com protrusão radicular de 2,0 mm (Trezzi, 2002; Junttila, 1976). Foram determinados o percentual de germinação (PG) e índice de velocidade de germinação (IVG) para cada tratamento pela expressão $IVG = \left(\frac{G1}{N1}\right) + \left(\frac{G2}{N2}\right) + (...) + \left(\frac{Gn}{Nn}\right)$, onde: G1 = número de sementes germinadas na primeira contagem; N1 = número de horas decorridas até a primeira contagem; G2 = número de sementes germinadas na segunda contagem N2 = número de horas decorridas até a segunda contagem e n corresponde à última contagem (Maguire, 1962).

3.4.3 Bioensaio de crescimento

Para a avaliação dos bioensaio de crescimentos as cipselas passaram por um pré-tratamento, sendo mantidas por 36 horas em placa de Petri com papel germitest e água destilada, para o crescimento radicular e o aparecimento de folhas cotiledonares. Após as plântulas foram estabelecidas em placas de Petri contendo 8,0 mL de extrato nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de germinação, e acondicionadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C (± 2 °C) e intensidade luminosa de 91 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$.

¹. O delineamento experimental foi casualizado. Decorridos cinco dias em sala de crescimento as plântulas foram fotografadas e a medida do comprimento das raízes e da parte aérea foi realizada a partir do programa ImageJ. Todas as variáveis analisadas, tanto de germinação como de crescimento, foram submetidos a ANOVA seguida de comparação de médias por DMS em algumas foi realizada a regressão.

4. RESULTADOS

CAPÍTULO 1: *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae) Fruit Nutritional Potential Characterization

CAPÍTULO 2: Estudo fitoquímico, atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae)

CAPÍTULO 3: Ação alelopática dos extratos aquosos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schktdk. (ROSACEAE)

CAPITULO 1

***Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae) Fruit Nutritional Potential Characterization**



Fonte: autora

O artigo encontra-se nas normas da revista **Journal of Functional Foods**, submetido em 05/01/2017. As normas da revista encontram-se em anexo (Anexo 1).

***Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae) Fruit Nutritional Potential Characterization**

Marelise Teixeira^a, Taciélen Altmayer^b, Fernanda Bruxel^c, Carla Roberta Orlandi^d, Neusa Fernandes de Moura^e, Lucélia Hoehne^a, Clelia Neves Afonso^f, Elisete Maria de Freitas^g

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Talini, 171 – Universitário, Lajedo por RS, 95900-000. Brasil. mareliset01@gmail.com

^bCurso de Engenharia Química, Centro Universitário UNIVATES. tacielen95@hotmail.com

^cCurso de Ciências Biológicas Licenciatura, Centro Universitário UNIVATES. fbruxel1@univates.br

^dCurso de Ciências Biológicas Bacharelado, Centro Universitário UNIVATES. carla-orlandi@hotmail.com

^eUniversidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos. Rua Barão do Caí, 125 – Bairro Cidade alta, Santo Antônio da Patrulha por RS, 95500-000. Brasil. nfmfurg@gmail.com

^fMARE –Marine and Environmental Sciences Centre, ESTM, Instituto Politécnico de Leiria, Santuário Nossa Senhora dos Remédios, Apartado 126, 2520-641, Peniche, Portugal. clelia@ipleiria.pt

^gPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia e Programa de Pós-Graduação em Sistemas Ambientais Sustentáveis, Centro Universitário UNIVATES. elicauf@univates.br

ABSTRACT

Fruit of Rosaceae species are widely used as food, besides being popularly used in the treatment of numerous disorders. However, there are few studies on this plant. Thus, the aim of this study was to know the physicochemical and nutritional characteristics of *Rubus sellowii* (Rosaceae), native mainly to Rio Grande do Sul State (RS), Brazil. For this purpose, three populations of the species were selected in the central region of the State aforementioned and fruits were analyzed through moisture, ash, titratable acidity, pH, lipids, fibers, carbohydrates, proteins, carotenoids, lycopene, ascorbic acid, aminogram and *in vitro* digestibility. Fruits showed high acidity (3.28 percent), higher mineral salt and protein (1.02 and 0.93 percent) and higher ascorbic acid (38.43 mg per 100 g) compared to *Rubus* cultivars. Due to *Rubus sellowii* nutritional properties, they provide benefits to human health and can be used as a new consumption alternative, complementing the human diet and valuing native species.

KEYWORDS: Functional food, blackberry, healthy food consumption, beneficial health effects, native species, natural products

1. Introduction

Brazil's flora diversity has high potential for the development of new food products and for supplying raw material to the industry (Leite & Coradin, 2011). In addition, the demand for natural products with differentiated characteristics and properties that benefit consumers' health has grown (Dias, Schultz, Schuster, Talamini, & Révillion, 2015), not only for finished products, but also for ingredients to be included in more elaborated foods (Lima, Mélo, Maciel, & Lima, 2003). The demand is also a consequence of the incentive that has been given to the consumption of healthy foods (Levy-Costa, Sichieri, Pontes, & Monteiro, 2005; Neto, Denuzi, Rinaldi, & Staduto, 2010) that favor nutrient ingestion (Vizeu, Feijó, & Campos, 2005). In this context, fruits are important for providing vitamins, minerals, carbohydrates, fibers, proteins and lipids (Gomes, Silva, Radeke, & Oshiro, 2012). Fruit and other plant structures have vitamins and minerals that are essential for health maintenance, besides having protective effect against several serious diseases (Temple & Gladwin, 2003).

However, much of the information regarding popular and traditional use is not enough to determine fruit efficacy and safety (Souza-Moreira, Salgado, & Pietro, 2010). Thus, there is the need to research the species nutritional characterization and find beneficial health effects (Maihara, Silva, Baldini, Miguel, & Fávaro, 2006). In addition, fruit may contain toxic components that cause illnesses (Turolla & Nascimento, 2006).

The Rosaceae family has been widely used for the treatment of various disorders and has several of its species included in the Brazilian folk medicine plants list (Nogueira, Rosa, Haraguchi, & Vassilieff, 1998). Pharmacological studies show that *Rubus* genus (blackberry) species may be the source of important active principles (Nogueira et al., 1998), thus, it is essential to carry out studies on their species. In addition, the species is included in the List of Non-Conventional Plant Foods (NCPF) (Kinupp & Lorenzi, 2014). Therefore, the aim of the present study was to know the nutritional potential and physicochemical characteristics of *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae), popularly known as blackberry. It is a scandent shrub native to Brazil, occurring from the States of Minas Gerais to Rio Grande do Sul. It has composite leaves, often trifoliolate, flowers arranged in white-colored panicles and round, aggregate fruits of red to black coloration when ripe. It is a pioneer species, common in clearings and forest edges (Lorenzi, Bacher, Lacerda, & Sartori, 2006).

2. Material and Methods

2.1. Fruit Collection

Rubus sellowii (blackberry) fruits were collected from three populations located in municipalities from the central region of RS State, Brazil, and were named Population 1 (CV) (29°19'52.57" S and 52°16'08.27" W), Population 2 (PR) (29°15'09.94" S and 52°22'34.39" W) and Population 3 (SE) (29°23'19.68" S and 52°17'28.61" W). In order to avoid collecting contaminated fruits, the selected populations were located in distant areas from housing, roads and crops. Fruits were collected in the morning, between February, March and April 2015 and, at each collection, were duly identified and transferred to the Botanic Laboratory of Univates, where they were washed and frozen for further analysis.

2.2. Physicochemical Analysis

Samples from each population were grounded separately until the formation of a homogeneous pulp and frozen in suitable containers for subsequent ash, moisture, titratable acidity, protein and carbohydrates analysis, as proposed by Instituto Adolfo Lutz (2008), and *in vitro* digestibility analysis, as described by Schmidt (2008). As there were fewer fruits from two of the populations selected for the study, amino acid, lipid, fiber, ascorbic acid and carotenoid analyzes were performed with a single sample. The sample consisted of a fruit pulp mixture of the three populations, in equal proportions. All parameters were analyzed in triplicate.

2.3. Amino Acids

For amino acid analyzes, blackberry fruit pulp samples were sent to the Food Research and Production Technology Center (CTPPA), Univates Science and Technology Park, TECNOVATES. Amino acids were determined through the methodology proposed by Shimadzu High-Performance Liquid Chromatograph (2008).

2.4. Fibers

Total dietary fiber contents were obtained at the Eurofins Group Laboratory, following the method proposed by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC 991.43, 1995).

2.5. Ascorbic Acid Content

In order to determine the ascorbic acid content, 0.5 g of pulp was removed in triplicate and the analysis followed the methodology described by MAPA, SDA and CGAL (2013).

2.6. Carotenoids and Lycopene

In order to determine carotenoid and lycopene contents, 3.0 g of fruit pulp was analyzed in triplicate, following the methodology described by Rodriguez-Amaya, & Kimura (2004).

2.7. Lipids

Lipids quantification was obtained through analysis performed at the Laboratory of Analysis and Service Provision, UNIANÁLISES, Univates, following the Association of Official Analytical Chemists (AOAC - 920,177, 2012).

2.8. Statistical Analyzes

The results of parameters evaluated in *Rubus sellowii* fruits were expressed by mean and standard deviation, and submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test ($p < 0.05$ significance level), using InfoStat software.

3. Results and Discussion

Mean pH values found in the fruits of the three studied populations ranged from 3.06 (SE) to 3.11 (CV), with a significant difference of population 3 (SE) in relation to the others (Table 1). Considering the pH scale, ranging from 1.0 to 14 (Mardini & Mardidni, 2000), where 7.0 corresponds to neutral acidity, whereas below and above 7.0 correspond to acidic and alkaline pH, respectively, *Rubus* spp. fruits had high acidity, what was already expected due to their acid to sweet-acid flavor (Hirsch, Facco, Rodrigues, Vizzotto, & Emanuelli, 2012). Ripe fruits of the evaluated populations are favorable for industrialization, since pH values between 3.0 and 3.2 are considered optimal for gel formation (Lopes, 2007).

Fruit titratable acidity was high, ranging from 2.99 for population 3 (SE) to 3.28 for population 1 (CV), confirming the acid taste, since *Rubus* spp., according to Aroucha, Gois, Leite, Santos & Souza, has a higher titratable acidity value than fruits with low acidity, which range from 0.2 to 0.3 percent (Bonetti, Zanuzo, Machado, Constantino, Cacho, & Rieger, 2011). Values obtained for the three populations studied were higher than those reported by Hirsch et al. (2012) for blackberry (*Rubus* sp.) cultivars spread in Brazil's southern region (1.30 to 1.58). This favors sustainable exploitation of the native species in the present study, since high acidity content provides high dilution and, consequently, higher yield in the final product for the juice industry (Andrade, Aragão, & Ferreira, 1993).

In addition to high titratable acidity value, moisture determination results showed that fruits had high water content (PR - 82.56 to SE 83.02%), and there were no significant difference between the three populations (Table 1). Higher values were found by Mota (2006) for Tupy and Guarani blackberry cultivars (91.7 and 90.47 percent, respectively), which were found in the municipality of Caldas, Minas Gerais, Brazil, and by Hirsch et al. (2012), for Guarani, Tupy and Cherokee

cultivars (86.1, 89.0 and 90.3 percent, respectively) in Pelotas, RS State. Variations show that fruit characteristics may differ when they come from different climatic regions (Hassimotto, Mota, Cordenunsi, & Lajolo, 2008). In the present study, population locations did not interfere in water amount, probably because the populations are in municipalities of the same region, and with little climatic variation between them.

Mineral salts content, determined by ash analysis, ranged from 0.63 (SE) to 1.02 percent (PR), showing a significant difference between population 2 (PR) and the other two populations. Hirsch et al. (2012) recorded lower values (0.38 to 0.49 percent) for blackberry cultivars. Lower values were also recorded for *Annanas comosus* (pineapple) (0.31 percent) (Oliveira, Carvalho, Martins, & Moreira, 2012), *Citrus aurantium* (orange) (0.3 percent), *Cucumis melo* (melon) (0.5 percent), *Mangifera indica* (mango) (0.4 percent) and *Carica papaya* (papaya) (0.4 percent) (Storck, Nunes, Oliveira, & Basso, 2013). According to Antunes (2002), blackberry fruits have considerable mineral amounts, which play an important role in human health development and maintenance (Ercisli & Orhan, 2008). Therefore, they are considered important mineral sources (Hardisson, Rubio, Baez, Martin, Alvarez, & Diaz, 2001). Mineral salts in a higher level than that registered for fruits of cultivars of the same genus reinforces the importance of stimulating the consumption of fruits obtained from *Rubus* native species.

Differing from other studies with blackberry varieties, fruits of the species populations of the present study showed higher carbohydrate amounts (PR = 15.10 and SE = 15.31 percent), without significant differences between populations (Table 1). Antunes (2002) stated that blackberry fruits contain about 10 percent carbohydrates, corroborating with Jacques & Zambiasi (2011), who obtained values of 6 to 13 percent for blackberry (*Rubus* spp). This amount is also higher than values recorded for *Fragaria vesca* L. (strawberry) (6.8 percent), *Averrhoa carambola* L. (starfruit) (7.5 percent) and *Cucumis melo* L. (melon) (7.5 Percent) (NEPA by UNICAMP, 2011). As carbohydrates perform important cellular functions, especially regarding the nutrition of central nervous system cells and energy supply (Pinheiro, Porto, & Menezes, 2005), carbohydrates presence in higher amounts makes this fruit attractive for consumption, and it could be part of everyday food.

Table 1: Mean and standard deviation of fruit pulp physicochemical parameters of three *Rubus sellowii* Cham. & Schlitdl. (Rosaceae) populations.

Parameters (in percentage)	CV	PR	SE
pH	3.11 ± 0.01 (a)	3.10 ± 0.01 (a)	3.06 ± 0.005 (b)

Titrateable acidity	3.28 ± 0.04 (a)	3.20 ± 0.04 (a)	2.99 ± 0.03 (b)
Humidity	83.01 ± 0.72 (a)	82.56 ± 0.11 (a)	83.02 ± 0.40 (a)
Ashes	0.73 ± 0.13 (b)	1.02 ± 0.06 (a)	0.63 ± 0.08 (b)
Carbohydrates	15.30 ± 0.35 (a)	15.10 ± 0.11 (a)	15.31 ± 0.65 (a)
Proteins	0.92 ± 0.09 (a)	0.90 ± 0.08 (a)	0.93 ± 0.05 (a)
Digestibility	79.84 ± 4.18 (a)	83.31 ± 1.29 (a)	78.81 ± 6.25 (a)

Different letters on the same line show significant differences between populations (p <0.05).

CV - population 1; PR - population 2 and SE - population 3.

Values found for protein content ranged from 0.90 (PR) to 0.93 percent (SE), without significant difference between populations. Hirsch et al. (2012) reported lower protein values (0.09 to 0.14 percent) for blackberry cultivars. According to the Brazilian Food Composition Table (TACO), protein amount variation in fruits and by-products is 0.2 to 3.2 percent, corroborating with Tirapegui, Castro, & Rossi (2016), who mentioned that fruits and vegetables are low in protein, with these representing only 1 to 2 percent of their total weight. As a comparison parameter, Oliveira et al. (2012) reported that pineapple protein content is 0.72 percent, reinforcing the low protein amount recorded for fruits of the three populations studied. However, the values found in this study were higher than those indicated in studies on cultivars of the same plant group.

In addition to the low protein content, most foods of plant origin have specific essential amino acids deficiency. However, their consumption must be stimulated, since feed must be diversified, so that nutritional needs are met (Tirapegui et al. 2016). Amino acids found in the *Rubus selowii* populations studied were glutamic acid (Glu) and histidine (His), which only represented 3.75 and 0.89 µMol per mL, respectively. Amino acids composition or presence and digestibility are related to the protein nutritive value (Pires, Oliveira, Rosa, & Costa, 2006). Digestibility corresponds to the protein part that will be hydrolyzed by digestive enzymes and made available as amino acids to the organism (Gerhardt, Vincenzi, Silva, Souza, Lima, Ethur, et al., 2014). In the *in vitro* digestibility evaluation of *Rubus sellowii* fruits, values expressed were high (78.81 for SE, 79.84 for CV and 83.31 percent for PR), demonstrating that *Rubus sellowii* fruits are easily digested, since, according to Toledo, Brazaca, Arthur, & Piedade (2007), plant proteins have digestibility of 80 percent.

Fruit pulp analysis also showed high ascorbic acid content (38.43 mg per 100 g) when compared to other fruits of the same genus. Jacques, Pertuzatti, Barcia, Zambiasi, & Chim (2010), while studying *Rubus fruticosus* fruit bioactive and volatile compounds, registered 0.9 mg per 100g of ascorbic acid. Similarly, Barcia, Jacques, Pertuzatti, & Zambiasi (2010) recorded 0.75 mg per 100 g of ascorbic acid for Tupy cultivar blackberry fruits. However, when compared to other fruits, ascorbic acid content was relatively low. In kiwifruit, the amount ranged from 84.6 to 116.6 mg per 100g (Gomes et al., 2012), in acerola it was 183 mg per 100g (Araújo, Figueiredo, Alves, Maia, & Paiva, 2007), in mango it was 89 mg per 100 g, and in papaya, it was 86 mg per 100 g (Hernández, Lobo, & Gonzáles, 2006). Ascorbic acid amount difference in natural products can be influenced by climatic conditions, soil type, storage and cultivation forms (Silva, Silva, & Oliveira, 2004).

Pulp total dietary fiber content was 5.02 g per 100g, a value similar to that reported by Hirsch et al. (2012) (5.5 to 5.8 percent) when studying blackberry varieties, and by Souza, Rodrigues, Gomes, Gomes, & Vieites (2015), while characterizing blackberry fruits and jelly (4.12 to 9.13 percent). Fibers ingestion has innumerable benefits, such as reducing the risk of arterial hypertension and stroke, improving glycemic control in patients with diabetes mellitus, favoring the proper functioning of the immune system and helping in weight reduction (Bernaud & Rodrigues, 2013). Considering all the benefits that fiber ingestion provides, and that its daily intake should be of at least 30 g, *Rubus sellowii* fruits consumption should be stimulated.

The lipid content found in the blackberry pulp was 0.12 g per 100g, a low value when compared to other fruits. According to the Brazilian Food Composition Table (TACO), *in natura* strawberry, also of the Rosaceae family, contains 0.3 percent of lipids. Guimarães & Silva (2008) evaluated the chemical, physical and microbiological composition of nance fruits and the *in natura* lipids content was 3.02 g per 100g. Oliveira et al. (2012), in a study with pineapple concentrated pulp, registered 0.29 percent lipids. Fruits and vegetables have low lipid amounts and highly energetic molecules (Somerville, Browse, Jaworski, & Ohrologge, 2000) containing unsaturated fatty acids that are beneficial to the health. In addition, they are necessary for liposoluble vitamins absorption, since they act as substances and nutrients carriers and constitute the cell membranes (Pinheiro et al., 2005).

The total carotenoids content found in the blackberry pulp was 0.056 mg per g. Carotenoids are one of the most important pigment groups in nature (Oliver & Palou, 2000), responsible for fruit colors from yellow to red (Uenojo, Marostica Junior, & Pastore, 2007) and for performance of various functions, having structural diversity and wide distribution (Oliver & Palou, 2000). The value found in the fruit pulp was low in the present study compared to that recorded

by Jacques & Zambiasi (2011), who obtained 0.877 mg per g of total carotenoids in blackberry fruits (*Rubus* spp.). The same occurred with lycopene content, whose recorded value (9.09 µg per g) was low when compared to tomato (31 µg per g), papaya pulp (26 µg per g), red guava (53 µg per g) and surinam cherry pulp (73 µg per g) (Shami & Moreira, 2004). Lycopene synthesized by plants (Pelissari, Rona, & Matioli, 2008) has been attracting attention because it may provide protection against cancer and other degenerative diseases influenced by free radical reactions (Ellinger, Ellinger, & Stehle, 2006).

4. Conclusion

Rubus sellowii fruits are beneficial to human health for their nutritional properties. Thus, the importance of *Rubus sellowii* fruits and their by-products in the diet is emphasized, contributing to the valorization of regional foods in human feed. As it has high acidity, it is an important mineral and protein source when compared to same genus cultivars. In addition, it is a source of ascorbic acid and carotenoids, even though in small amounts, complementing the diet and contributing to protect cells from oxidative damage, reducing the risk of developing some diseases. Thus, this study contributes to the improvement of scientific knowledge on the native plants of the region.

Acknowledgment

Thanks to CNPq for the Prosup scholarship and to the scholarship holders of Univates Botany Laboratory, for helping in all activities. Thanks to the owners who allowed access to their properties for fruit collection. Clélia Neves Afonso has the support of the Science and Technology Foundation (FCT), through the strategic project UID by MAR, 04292, 2013, granted to MARE.

References:

- Andrade, J. S., Aragão, C. G., & Ferreira, S. A. N. (1993). Caracterização física e química dos frutos de Araçá-Pêra (*Psidium acutangulum* D. C.). *Acta Amazonica*, 23, 213-217.
- Antunes, L. E. C. (2002). Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural*, 32, 151-158.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists (2012). Official Methods of Analysis. Method 920.177, Cap. 44, p. 24.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists (1995). Official Method 991.43. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods, Chapter 32, p. 7.

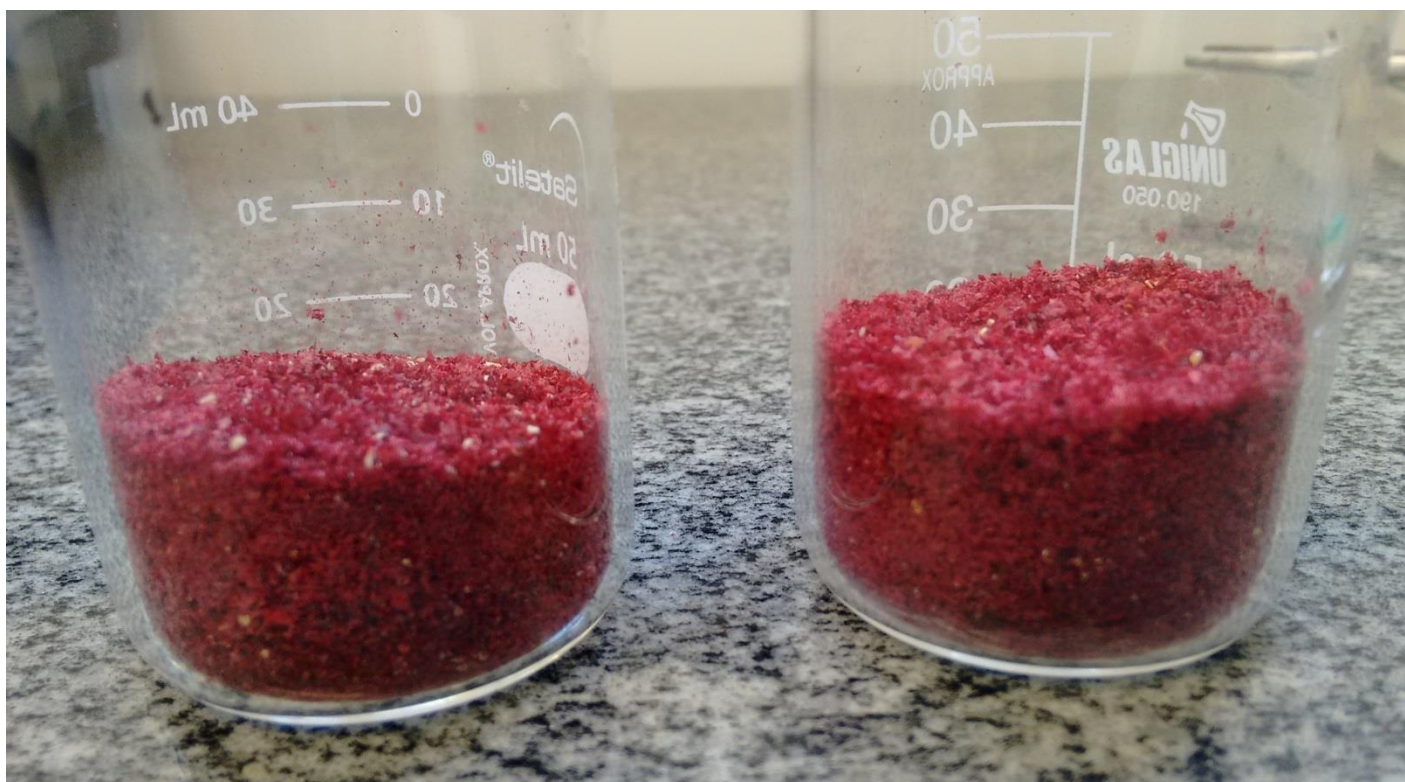
- Araújo, P. G. L., Figueiredo, R. W., Alves, R. E., Maia, G. A., & Paiva, J. R. (2007). β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 104-107.
- Aroucha, E. M. M., Gois, V. A., Leite, R. H. L., Santos, M. C. A., & Souza, M. S. (2010). Acidez em frutas e hortaliças. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 05, 01-04.
- Barcia, M. T., Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., & Zambiasi, R. C. (2010). Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 381-390.
- Bernaudo, F. S. R., & Rodrigues, T. C. (2013). Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 57, 397-405.
- Bonetti, J. A., Zanuzo, M. R., Machado, R. A. F., Constantino, E. J., Cacho, R. C., & Rieger, F. A. (2011). Influência do Parcelamento de Potássio (K) nas características do melão utilizando sistema tutorado em Sinop-MT. *Revista Uniara*, 14, 110-117.
- Dias, V. V., Schultz, G., Schuster, M. S., Talamini, E., & Révillion, J. P. (2015). O Mercado de Alimentos Orgânicos: Um panorama quantitativo e qualitativo das publicações internacionais. *Ambiente & Sociedade*, 18, 161-182.
- Ellinger, S., Ellinger, J., & Stehle, P. (2006). Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention and treatment of prostate cancer: do we have the evidence from intervention studies? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9, 722-727.
- Ercisli, S., & Orhan, E. (2008). Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 116, 41-46.
- Gerhardt, A., Vincenzi, A., Silva, B. P., Souza, C. F. V., Lima, C. V. S., Ethur, E. M., et al. (2014). Produção e Análise de Bioprodutos. In R. A. Sperotto (Org.), *Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana* (pp. 171-204). Lajeado: Editora da Univates.
- Gomes, A. P. E., Silva, K. E., Radeke, S. M., & Oshiro, A. M. (2012). Caracterização física e química de kiwi *in natura* e polpa provenientes da comercialização de Dourados-MS. *Revista de Ciências Exatas e da Terra UNIGRAN*, 1, 1-8.
- Guimarães, M. M., & Silva, M. S. (2008). Nutritional value and chemical and physical characteristics of dried murici fruits (*Byrsonima verbascifolia*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 817-821.

- Hardisson, A., Rubio, C., Baez, A., Martin, M., Alvarez, R., & Diaz, E. (2001). Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chemistry*, 73, 153-161.
- Hassimotto, N. M. A., Mota, R. V., Cordenunsi, B. R., & Lajolo, F. M. (2008). Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 702-708.
- Hernández, Y., Lobo, M. G., & Gonzáles, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96, 654-664.
- Hirsch, G. E., Facco, E. M. P., Rodrigues, D. B., Vizzotto, M., & Emanuelli, T. (2012). Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil. *Ciência Rural*, 42, 942-947.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. (2008). [http: por por www.ial.sp.gov.br por por index.php?option=com_remository&Itemid= 20&func=select&id=1&orderby=2 por](http://porporwww.ial.sp.gov.brporporindex.php?option=com_remository&Itemid=20&func=select&id=1&orderby=2porpor) Acessado 18.01.16.
- Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Zambiasi, R. C., & Chim, J. F. (2010). Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv.tupy. *Química Nova*, 33, 1720-1725.
- Jacques, A. C., & Zambiasi, R. C. (2011). Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp.) Phytochemicals in blackberry. *Semina: Ciências Agrárias*, 32, 245-260.
- Kinupp, V. F., & Lorenzi, H. (2014). Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Leite, L. L., & Coradin, L. (2011). Introdução. In L. Coradin, A. Siminski, & A. Reis (Eds.), *Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro – Região Sul* (pp. 19-24). Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Levy-Costa, R. B., Sichieri, R., Pontes, N. S., & Monteiro, C. A. (2005). Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *Revista de Saúde Pública*, 39, 530-540.
- Lima, V. L. A. G., Mélo, E. A., Maciel, M. I. S., & Lima, D. E. S. (2003). Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 101-103.
- Lopes, R. L. T. (2007). *Dossiê Técnico: Fabricação de geléias*. (1ª ed.). Minas Gerais: CETEC, (Capítulo 1).
- Lorenzi H., Bacher L., Lacerda M., & Sartori, S. (2006). Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura*. (2ª ed.). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos de Flora.

- Schmidt, C. G. (2008). Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango [dissertação]. Rio Grande (RS): Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).
- Shami, N. J. I. E., & Moreira, E. A. M. (2004). Lycopene as an antioxidant agent. *Revista de Nutrição*, 17, 221-236.
- Shimadzu Corporation. Shimadzu High-Performance Liquid Chromatograph Prominence (2008). Amino Acid Analysis System Supplementary Manual. Japan.
- Silva, M. R., Silva, M. S., & Oliveira, J. S. (2004). Estabilidade de ácido ascórbico em pseudofrutos de caju-do-cerrado refrigerados e congelados. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 34, 9-14.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J., & Ohrologge, J. B. (2000). Lipids. In B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 456-527). Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.
- Souza-Moreira, T. M., Salgado, H. R. N., & Pietro, R. C. L. R. (2010). O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 435-440.
- Souza, A. V., Rodrigues, R. J., Gomes, E. P., Gomes, G. P., & Vieites, R. L. (2015). Caracterização bromatológica de frutos e geleias de amora-preta. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37, 13-19.
- Storck, C. R., Nunes, G. L., Oliveira, B. B., & Basso, C. (2013). Leaves, stalk, pell and seeds of vegetables: nutritional composition, utilization and sensory analysis in food preparations. *Ciência Rural*, 43, 537-543.
- Temple, N. J., & Gladwin, K. K. (2003). Fruit, vegetables and the prevention of cancer: research challenges. *Nutrition*, 19, 467-470.
- Tirapegui, J., Castro, I. A., & Rossi, L. (2016). Biodisponibilidade de proteínas. In S. M. F. Cozzolino (Eds.), *Biodisponibilidade de nutrientes* (pp. 131-190). São Paulo: Editora Manole.
- Toledo, T. C. F., Brazaca, S. G. C., Arthur, V., & Piedade, S. M. S. (2007). Composition, protein digestibility and deamidation in Brazilian soy cultivars subjected to gamma radiation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 812-815.
- Turolla, M. S. R., & Nascimento, E. S. (2006). Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 289-306.
- Uenojo, M., Marostica Junior, M. R., & Pastore, G. M. (2007). Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, 30, 616-622.
- Vizeu, V. E., Feijó, M. B. S., & Campos, R. C. (2005). Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 254-258.

CAPITULO 2

Estudo fitoquímico, atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae)



Fonte: Fernanda Bruxel

O artigo encontra-se nas normas da revista Journal Medicinal Plants Research para onde será enviado após considerações da banca e tradução para a língua inglesa. As normas da revista encontram-se em anexo (Anexo 2).

Estudo fitoquímico, atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. (Rosaceae)

Marelise Teixeira¹, Bárbara Buhl², Talita Scheibel², Bruna Reckziegel², Fernanda Bruxel³, Eduardo Miranda Ethur⁴, Clelia Neves Afonso⁵, Elisete Maria de Freitas⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Talini, 171 – Universitário, Lajedo por RS, 95900-000. Brasil. mareliset01@gmail.com

²Curso de Farmácia, Centro Universitário UNIVATES.

³Curso de Ciências Biológicas, Licenciatura, Centro Universitário UNIVATES.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES.

⁵MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, ESTM, Instituto Politécnico de Leiria.

⁶Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e em Sistemas Ambientais Sustentáveis, Centro Universitário UNIVATES.

Autor correspondente:

Resumo: Os compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados nas plantas que apresentam efeitos biológicos, incluindo atividades antioxidante e antimicrobiana. A descoberta de novos agentes é de extrema importância para um país como o Brasil que possui imensa biodiversidade. O gênero *Rubus* tem sido estudado por ser fonte de importantes princípios ativos com atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e determinar o conteúdo de flavonoides e polifenóis nos extratos aquosos, etanólicos e hidroetanólicos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl., espécie nativa, endêmica do Brasil. Os métodos utilizados foram Folin-Ciocalteu para polifenóis, espectroscopia para flavonoides, capacidade de redução do radical DPPH por espectrofotometria para atividade antioxidante e o método de micro diluição para atividade antimicrobiana. O conteúdo de polifenóis variou de 182 a 5097 mg de EAG/100 g de frutos e folhas, respectivamente. Para o teor de flavonoides totais, a variação foi de 16 a 234 mg de ERU/g, sendo as menores quantidades para os extratos de frutos. Os frutos apresentaram a menor capacidade antioxidante e o extrato etanólico de folhas apresentou a maior atividade antioxidante. Na atividade antimicrobiana, os extratos hidroetanólicos mostraram ação bactericida frente à *S. aureus*. Os extratos de folhas e frutos tiveram ação bacteriostática sobre *E. coli*. Já a levedura *C. albicans* se mostrou resistente a todos os extratos testados. As atividades apresentadas pelos extratos podem estar relacionadas à presença de

polifenóis e flavonoides em quantidades consideradas elevadas tanto em frutos quanto em folhas. A utilização da espécie, especialmente dos frutos, deve ser estimulada a fim de reduzir o risco de algumas doenças.

Palavras chaves: Concentração Bactericida Mínima, Concentração inibitória mínima, extrato aquoso, extrato etanólico, extrato hidroetanólico, flavonóides, polifenóis.

Introdução

As plantas produzem uma enorme diversidade de substâncias químicas durante o seu metabolismo secundário, as quais são conhecidas como princípios ativos. Estas substâncias, podem provocar uma resposta biológica quando ingeridos ou introduzidos por qualquer via no organismo humano ou animal (Sousa et al., 1991), sendo por isso denominados como compostos bioativos. A descoberta dessas substâncias nas plantas, que constituem produtos naturais biologicamente ativos, se apresenta como base para a síntese de novos fármacos (Guerra e Nodari, 2004) e possível inclusão em alimentos funcionais.

Alguns desses compostos podem apresentar ação antioxidante, sendo responsáveis pela proteção dos sistemas biológicos contra os efeitos adversos da oxidação excessiva. O stress oxidativo é o resultado da interferência entre os processos oxidativo e anti-oxidativo, tendo as suas moléculas origem em processos como a fotossíntese, fagocitose, reações enzimáticas e até origem exógena, como poluição, metais pesados e pesticidas. Como resposta, as células podem apresentar defesas como a produção de enzimas destoxicantes e compostos antioxidantes (Eckert et al., 2006), numa tentativa de evitar os efeitos nefastos, que potenciam o desenvolvimento de doenças degenerativas, cardiovasculares, cancro e diabetes (Dalle-Donne et al., 2006; Markesbery, 1997; Tieu et al., 2003). Alguns compostos associados ao metabolismo secundário são também úteis no controle de contaminações microbianas, proporcionando mais qualidade de vida e reduzindo os estados de morbidade e mortalidade causada por microrganismos (Bianchi e Antunes, 1999). Contudo, a exploração do potencial das espécies vegetais só é possível com maior conhecimento sobre estas, com adoção de estratégias para difusão do conhecimento desenvolvido e do estímulo para o uso da flora nativa pela indústria e pela sociedade (Leite e Coradin, 2011). Além disso, a descoberta de novos agentes é de extrema importância para um país como o Brasil que possui imensa biodiversidade (Ostrosky et al., 2008).

A amora *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl. É um arbusto da família das Rosáceas que ocorre na zona sul de Sudoeste do Brasil, sendo uma espécie endêmica. O gênero *Rubus* têm sido utilizada na medicinal tradicional para o tratamento de vários distúrbios, as folhas ajudam a fortalecer a gengiva e no combate a hemorroidas, as flores reduzem inflamações dos olhos, erupções cutâneas, além de ajudar em doenças relacionadas ao

estômago, e os ramos são utilizados para cessar a diarreia e evitar corrimento vaginal (Hummer, 2010). Além disso, estudos farmacológicos demonstram que as espécies do gênero *Rubus* podem ser fonte de importantes princípios ativos (Nogueira et al., 1998) com atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e gastroprotetora (Patel, Rojas-Vera e Dacke, 2004). Segundo Shin et al. (2014), a espécie *Rubus coreanus* Miquel é popularmente utilizada como medicamento para combate do câncer de próstata e doenças do fígado, além de conter vários antioxidantes. O consumo dos frutos frescos ou processados (do gênero *Rubus* spp.), está associado a várias atividades biológicas (Bobinaitė et al., 2012), reduzindo o risco de acidentes cardiovasculares e de doenças neurodegenerativas (Kusznierewicz et al., 2012). Kanegusuku e colaboradores (2002) confirmaram a atividade hipoglicêmica e o uso popular brasileiro de *R. imperialis* como agente antidiabético. Na China, os frutos de *R. chingii* H.H. Hu são utilizados na medicina para o tratamento de ejaculação precoce, impotência e incontinência urinária (Zhong et al., 2015). Tais informações e a possibilidade de ampliar os benefícios para a humanidade reforçam a importância de ampliar o número de espécies do gênero a serem estudadas. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e determinar o conteúdo de flavonoides e polifenóis nos extratos aquosos, etanólicos e hidroetanólicos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schltdl..

Material e Métodos

Coleta das amostras e preparo dos extratos

Folhas e frutos da amora-preta (*Rubus sellowii* Cham. & Schltdl.) foram coletados de uma população da espécie existente no município de Canudos do Vale (29°19'52.57" S e 52°16'08.27"W), Rio Grande do Sul, Brasil, distante de moradias, rodovias e lavouras a fim de evitar contaminações. A coleta dos frutos se estendeu de Fevereiro a Abril, com coletas semanais, sempre no período da manhã (7:00 até 12:00), em razão de o processo de amadurecimento ser gradual e longo. Passado o período de frutificação, foi realizada a coleta das folhas, também no período da manhã, no mês de Abril, em um único dia.

Para o preparo dos extratos de folhas e de frutos foi seguido o método adaptado de Mayachiew e Devahastin, (2008). Assim, após cada coleta, folhas e frutos foram lavados, selecionados considerando o estado fitossanitário e congelados a -80 °C. As amostras em estudo foram liofilizadas e trituradas, sendo conservadas a -80 °C até posterior utilização. No caso dos frutos, as sementes foram retiradas durante o processo de trituração. As amostras em pó serviram de base para o preparo dos extratos aquoso, com a utilização de água destilada, etanólico com a utilização de etanol 99,8% vol (solvente orgânico polar), e hidroetanólico 50% água destilada e 50% etanol, correspondendo a seis extratos cada um em triplicata (Tabela 1). Para cada extrato foram pesados

5,0 g de pó seco de folhas ou de frutos, em triplicata, colocados em vidro âmbar de 500 mL e adicionado 200 mL dos solventes selecionados, respeitando as concentrações citadas, resultando num total de 18 amostras em estudo. Os extratos foram colocados em agitação a 125 rpm por 12 horas no escuro. No final do processo, as soluções foram filtradas em papel filtro e a parte líquida armazenada no escuro à temperatura ambiente para posterior utilização. Os extratos obtidos foram colocados em rotaevaporador em banho termostatzado à 40 °C para evaporação da parte líquida (Simões et al., 2004) e então armazenados a 4 °C até a utilização para as análises de polifenóis, flavonoides e atividades antioxidante e antimicrobiana.

Tabela 1 – Extratos preparados a partir de folhas e frutos de *Rubus sellowii* liofilizados com o respectivo solvente utilizado e a identificação de cada um (EtOH – etanol).

Material vegetal	Concentração/Solvente	Código do extrato obtido
FOLHAS (5g em pó)	100 % EtOH	Extrato 1
	50 % EtOH / 50 % H ₂ O (destilada)	Extrato 2
	100 % H ₂ O (destilada)	Extrato 3
FRUTOS (5g em pó)	100 % EtOH	Extrato 4
	50 % EtOH / 50 % H ₂ O (destilada)	Extrato 5
	100 % H ₂ O (destilada)	Extrato 6

Quantificação total de polifenóis

A quantificação total de polifenóis (QTP) nos extratos de folhas e frutos foi efetuada através do método de Folin-Ciocalteu, conforme Souza et al. (2007) e Singleton e Rossi (1965). Este método consiste essencialmente na utilização do ácido gálico como padrão e a comparação desta atividade com as amostras em estudo. Para as análises do composto padrão, utilizou-se 3,16 mL de água destilada, 600 µL de solução carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 15%, 200 µL de solução Folin-Ciocalteu 1N e 40 µL de solução metanólica de ácido gálico nas diversas concentrações indicadas. A solução padrão foi diluída, sendo construída uma curva de calibração com concentrações de 50 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 150 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹ e 500 µg.mL⁻¹. A análise dos extratos foi realizada com a substituição da solução metanólica de ácido gálico pelas amostras de folhas e frutos na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Após o preparo das soluções, as mesmas foram agitadas em vórtex por 15 segundos, e em seguida colocados em banho-maria a 40°C por 30 minutos, após o que foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific, G10S-UV-VIS) em comprimento de onda de 765 nm.

A QTP foi expressa em mg de equivalentes do ácido gálico (EAG) por grama de extrato de folhas ou frutos (mg EAG/g), a partir da equação da reta obtida para a curva de calibração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do teor de flavonoides totais

A quantificação total de flavonoides foi efetuada pelo método de espectroscopia descrito por Woisky e Salatino (1998). Primeiramente foi estabelecida uma curva padrão com solução metanólica de rutina nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram adicionados em cubetas, 1,0 mL de cada uma das soluções de rutina com as diferentes concentrações indicadas e, adicionada a cada uma delas, 2,0 mL de uma solução de alumínio (AlCl_3) a 5%.

Para o branco da amostra se procedeu da mesma forma, apenas substituindo o cloreto de alumínio por metanol. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma micropipeta automática e mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Transcorrido o tempo, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro a 415nm. Para a determinação do teor de flavonoides nos extratos procedeu-se da mesma forma apenas substituindo a solução metanólica de rutina pelas amostras de folhas ou frutos em triplicata na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg de equivalentes de rutina (ERU) por grama de extrato de folhas ou frutos (mg ERU.g^{-1}), a partir da equação da reta obtida para a curva de calibração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da capacidade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi obtida através da medição da capacidade de redução do radical DPPH por espectrofotometria, conforme metodologia descrita por Mensor et al. (2001), em triplicata. Como padrão foi utilizada uma solução metanólica de ácido ascórbico na concentração de 0,01 %. Foi preparado previamente uma solução metanólica de DPPH a 0,004 %. A curva padrão de ácido ascórbico foi determinada nas seguintes concentrações: 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A reação decorreu em cubetas, com 1,8 mL de metanol e 200 μL da solução metanólica de ácido ascórbico, a partir desta foram realizadas diluições seriadas de 1,0 mL. Ao final foram adicionados 2,0 mL da solução metanólica de DPPH e homogeneizadas com o auxílio de uma micropipeta. As amostras foram deixadas em repouso durante 30 minutos, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm e o IC_{50} foi calculado para cada um dos extratos, de acordo com a equação $\%AA = 100 \left\{ \frac{[(Aa - Ab) * 100]}{Ac} \right\}$, onde Aa corresponde à absorbância da amostra, Ab corresponde à absorbância do branco e Ac corresponde à absorbância do controle.

Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada através da utilização dos extratos, individualmente testados contra duas bactérias, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. As amostras de bactérias foram incubadas em meio Mueller Hinton a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e a levedura em meio Sabouraud a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Os fármacos padrão utilizados como controle positivo foram a Gentamicina (60 $\mu\text{g/mL}$), Vancomicina (64 $\mu\text{g/mL}$) e Fluconazol (64 $\mu\text{g/mL}$). A atividade foi determinada pelo método de micro diluição utilizando placas de 96 poços, segundo protocolo estabelecido pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (2005), sendo determinadas a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM) e a concentração bacteriostático/fungiostático mínima (CIM).

Primeiramente, procedeu-se o preparo do inóculo com o microrganismo em solução salina estéril, a qual foi padronizada através da leitura da turbidez em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 625 nm até uma absorbância de 0,8 a 0,13, o que corresponde a 0,5 na escala nefelométrica de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1}).

Os extratos foram ajustados à concentração de 40 mg.mL^{-1} e submetidos a uma diluição seriada obtendo-se as concentrações de 20 mg.mL^{-1} ; 10 mg.mL^{-1} ; 5 mg.mL^{-1} ; 2,5 mg.mL^{-1} ; 1,25 mg.mL^{-1} e 0,625 mg.mL^{-1} . Em seguida, foram adicionados 100 μL do inóculo nos poços da microplaca contendo as diluições em série dos extratos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após término das diluições, as placas foram incubadas em temperatura e tempo adequado para cada microrganismo. Para a confirmação da CIM, foi adicionado às placas, 30 μL de solução aquosa estéril de resazurina a 0,02 %. Essa solução revela o crescimento do microrganismo através da mudança de coloração do azul para o rosa. Após a transferência da resazurina, as placas foram mantidas por 30 minutos em temperatura compatível com cada microrganismo.

Para a determinação da CBM, foi realizada a semeadura em placas de Petri com meio de cultura adequado de todos os poços onde não houve coloração com o corante utilizado. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa com tempo e temperatura adequadas para cada um dos microrganismos. Decorrido o tempo, as placas foram analisadas, sendo considerada como ação bacteriostática quando houve o crescimento do microrganismo no meio de cultura e, ação bactericida na ausência de crescimento.

Resultados e discussão

Rendimento dos extratos

Os extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* apresentaram um rendimento médio que variou de 9,44% a 17,66% para folhas e de 21,78% a 32,07% para frutos, calculados após o término da remoção de solvente,

considerando 100% a massa total do material vegetal utilizado. Os melhores rendimentos foram obtidos dos extratos de frutos, independentemente do tipo de solvente utilizado (Tabela 2). Contrariamente ao observado no presente estudo, Arabshahi-Delouee e Urooj (2007) verificaram menor rendimento nos extratos aquosos quando avaliaram os extratos aquosos e metanólicos de folhas de *Morus indica* L.

Tabela 2 – Percentual médio e desvio padrão dos rendimentos dos extratos utilizados: Extrato 1 (extrato etanólico de folha), Extrato 2 (extrato hidroetanólico de folha), Extrato 3 (extrato aquoso de folha), Extrato 4 (extrato etanólico de fruto), Extrato 5 (extrato hidroetanólico de fruto) e Extrato 6 (extrato aquoso de fruto).

Código do extrato	Rendimento (%)
Extrato 1	9,44 ± 1,06
Extrato 2	17,66 ± 4,67
Extrato 3	16,73 ± 2,64
Extrato 4	21,78 ± 1,41
Extrato 5	25,37 ± 0,91
Extrato 6	32,07 ± 3,30

Quantificação total de polifenóis

O conteúdo total de polifenóis (QTP), encontrado nos extratos aquosos, hidroetanólicos a 50% (v/v) e etanólicos de folhas e frutos de *Rubus sellowii*, determinado pela equação de regressão da curva analítica ($y = 0,0005x + 0,0115$, $R^2 = 0,9892$) e expressada em equivalência de ácido gálico (EAG), variaram de 182 a 5097 mg de EAG/100 g de frutos e folhas, respectivamente (Tabela 3). Nos frutos, o extrato hidroetanólico apresentou a maior quantidade de polifenóis, com $882 \pm 0,99$ mg de EAG/100g de fruto. Este resultado demonstra que o solvente utilizado foi mais eficiente na extração dos polifenóis quando comparado com o estudo de Oliveira et al. (2016). Estes autores obtiveram 177,26 mg de EAG/100g de polifenóis em frutos de *Rubus rosifolius* e também, quando comparados com a pesquisa realizada por Zielinski et al. (2015) com cultivares de amora-preta (*Rubus* spp.), pois obtiveram 169,41 mg de EAG/100g para a cultivar Brazos e 101,83 mg de EAG/100g para a cultivar Tupy. Nas folhas, o extrato etanólico apresentou a maior quantidade de polifenóis com $5097 \pm 3,07$ mg de EAG/100g de folhas, valor baixo se comparado com o trabalho de Chen, Lin e Hsieh (2007) que obteve 15436 mg AG/100g para folhas de goiaba com extração em solvente aquoso.

Teor de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides, determinado pela equação de regressão da curva analítica ($y = 0,0102x + 0,0024$, $R^2 = 0,9946$) e expressa em equivalência de rutina (ERU), variou de 16 a 234 mg de ERU/g de extrato (Tabela 3). Tanto para os frutos como para as folhas, o extrato etanólico foi o mais representativo ($23 \pm 0,02$ e

234 $\pm$ 0,03 mg de ERU/100g, respectivamente). Ruiz-Rodríguez et al. (2014), no estudo com frutos de *Rubus ulmifolius*, registraram um teor de flavonoides que variou de 9,01 a 97,29 mg de RU/100 g de frutos, utilizando metanol e acetona como solventes. Este resultado foi superior ao encontrado no presente estudo. Desta forma, pode-se propor que o solvente extrator não foi o mais apropriado ou os fatores edáficos podem estar interferindo no teor de flavonoides presentes nas plantas deste estudo.

Tabela 3: Média e desvio padrão de polifenóis em equivalência de ácido gálico por grama de extrato (EAG/g), flavonoides em equivalência de rutina por grama de extrato (ERU/g) e antioxidantes (IC₅₀) de extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* (Extrato 1 (extrato etanólico de folha), Extrato 2 (extrato hidroetanólico de folha), Extrato 3 (extrato aquoso de folha), Extrato 4 (extrato etanólico de fruto), Extrato 5 (extrato hidroetanólico de fruto) e Extrato 6 (extrato aquoso de fruto)).

Código do extrato	Polifenóis totais (mg de EAG/100 g)	Flavonoides totais (mg de ERU/100 g)	Antioxidante (µg/mL)
Extrato 1	5097 $\pm$ 3,07	234 $\pm$ 0,03	22,05 $\pm$ 1,34
Extrato 2	3578 $\pm$ 1,91	128 $\pm$ 0,05	35,32 $\pm$ 1,54
Extrato 3	2660 $\pm$ 2,17	203 $\pm$ 0,11	48,97 $\pm$ 1,69
Extrato 4	671 $\pm$ 1,19	23 $\pm$ 0,02	> 100
Extrato 5	882 $\pm$ 0,99	19 $\pm$ 0,02	> 100
Extrato 6	182 $\pm$ 0,46	16 $\pm$ 0,01	> 100

Atividade antioxidante

Os extratos aquosos, hidroetanólico e etanólicos de folhas apresentaram atividade antioxidante variando de 22,05 a 48,97 µg/mL (Tabela 3). Os resultados demonstraram que a capacidade antioxidante estabelecida pelo método quantitativo do radical DPPH está diretamente relacionada com o teor de polifenóis totais. O extrato 1 (etanólico de folhas) apresentou alto teor de polifenóis (5097 $\pm$ 3,07 mg de EAG/100g), mostrando relação direta com a capacidade antioxidante com IC₅₀ de 22,05 $\pm$ 1,34 µg/mL quando comparado ao padrão ácido ascórbico 7,65 $\pm$ 0,88 µg/mL. De forma inversa, o extrato 3 (aquoso de folhas) apresentou baixa capacidade antioxidante com IC₅₀ de 48,97 $\pm$ 1,69 µg/mL e baixo teor de polifenóis 2660 $\pm$ 2,17 mg de EAG/100g. Semelhante a isso, os três extratos de frutos (4, 5 e 6) apresentaram a menor capacidade antioxidante, com IC₅₀ > 100 µg/mL.

Os resultados obtidos neste estudo colaboram com os obtidos por Rabêlo et al. (2014) que também obtiveram uma relação da atividade antioxidante com o teor de polifenóis para os extratos etanólico de talos e extrato hexânico e metanólico de folhas de atemoia. E também com o trabalho de Arabshahi-Delouee e Urooj (2007) que, ao avaliar extratos aquosos e metanólicos de folhas de *Morus indica*, obtiveram melhor atividade

antioxidante nos extratos metanólicos. Segundo Vargas et al. (2008), os polifenóis são componentes de um grupo heterogêneo de antioxidantes que tem ação na prevenção de reações oxidativas, apresentando propriedades analgésicas, anticarcinogênica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiaterogênica, antitrombolítica e vasodilatadora (Wollgast e Anklam, 2000).

Atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo foram determinados pela concentração inibitória mínima CIM e a concentração bactericida mínima CBM. Estas concentrações correspondem aos efeitos bacteriostático/fungistático (CIM) e bactericida/fungicida (CBM).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, se observa que no ensaio sobre *S. aureus*, um microrganismo associado às infecções hospitalares e de pele (Gelatti et al., 2009), os extratos hidroetanólico de folhas e de frutos (extrato 2 e 5) mostraram ação bactericida na concentração de 5 mg/mL. A ação bacteriostática mais efetiva foi para o extrato 1, com 0,625 mg/mL.

Conforme observado na Tabela 4, os extratos 1, 3 e 5 apresentaram ação bacteriostática satisfatória (0,625 mg/mL) sobre *E. coli*. Já para a ação bactericida, os extratos não demonstraram eficácia, pois a CBM deve estar acima da maior concentração testada (20 mg/mL). Isso pode ter ocorrido devido à composição da parede celular das bactérias Gram-negativas, que possuem uma bicamada lipídica tornando a membrana mais rígida e mais lipofílica (Silva et al., 2012).

Segundo Silva e Siqueira (2000), em seu estudo sobre a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Rubus urticifolius* frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, a maior atividade antimicrobiana encontrada foi nos frutos, colaborando com os resultados obtidos no presente estudo. No entanto, diferiu do estudo realizado por Panizzi et al. (2002) que mostrou atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos utilizando extratos de diferentes solventes de *Rubus ulmifolius*. Conforme Holetz et al. (2002), os extratos em concentrações abaixo de 100 µg/mL são considerados com boa atividade antimicrobiana; entre 100 e 500 µg/mL, a atividade antimicrobiana é considerada moderada; entre 500 e 1000 µg/mL são considerados de baixa atividade e, acima de 1000 µg/mL são consideradas inativas. Assim os extratos estudados podem ser considerados como de baixa atividade antimicrobiana ou inativas.

C. albicans se mostrou resistente a todos os extratos testados, de forma que os extratos podem ter atividade antimicrobiana, mas em concentração maiores que 20 mg/mL, as quais não foram alvo deste estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Lombardo et al. (2015) quando demonstraram que nenhum dos

extratos aquosos e hidroalcoólicos preparados com diferentes segmentos de *Senna occidentalis* mostraram atividade contra *C. albicans*.

No entanto, de forma inversa, o estudo de Zeidan et al. (2013) sobre a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e metanólicos de folhas e frutos de *Rubus sanguineus*, frente aos microrganismos *E. coli*, *Pseudomons aeruginosa*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* através do ensaio de difusão em placas, mostrou que todos os organismos apresentaram algum grau de sensibilidade às folhas e aos frutos.

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* utilizando extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* (Extrato 1 (extrato etanólico de folha), Extrato 2 (extrato hidroetanólico de folha), Extrato 3 (extrato aquoso de folha), Extrato 4 (extrato etanólico de fruto), Extrato 5 (extrato hidroetanólico de fruto) e Extrato 6 (extrato aquoso de fruto)).

Tipo de extrato	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Extrato 1	0,625	20	0,625	> 20	> 20	> 20
Extrato 2	1,25	5	10	> 20	> 20	> 20
Extrato 3	10	> 20	0,625	> 20	> 20	> 20
Extrato 4	5	10	10	10	> 20	> 20
Extrato 5	5	5	0,625	20	> 20	> 20
Extrato 6	10	20	10	20	> 20	> 20

Apesar de os resultados de atividade antimicrobiana parecerem inadequados num primeiro momento, é importe salientar que “extratos brutos” são geralmente misturas complexas e que a purificação dos mesmos pode levar a frações ou moléculas isoladas mais bioativas. Isso demonstra que mais estudos devem ser realizados, utilizando outros solventes a fim de conseguir um resultado mais satisfatório em relação à atividade antimicrobiana.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo mostram que *Rubus sellowii* possui atividade antioxidante e antimicrobiana apesar desta ser muito reduzida. Estas atividades podem estar relacionadas à presença de polifenóis e flavonoides nos extratos de frutos e folhas em quantidades consideradas elevadas. Além disso, o consumo destes frutos deve ser estimulado a fim de reduzir o risco de doenças coronarianas, hipertensão e infarto do miocárdio, como recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Contudo mais estudos

devem ser realizados utilizando outros solventes a fim de conseguir um resultado mais satisfatório em relação à atividade antimicrobiana.

Agradecimentos:

Ao CNPq pela bolsa Prosup e aos bolsistas do Laboratório de Botânica da Univates pelo auxílio em todas as atividades. Aos proprietários que permitiram o acesso às propriedades para a coleta dos frutos. Clélia Neves Afonso has the support of Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), through the strategic project UID por MAR por 04292 por 2013 granted to MARE.

Referências:

Arabshahi-Delouee S, Urooj A (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chem. 102: 1233-1240.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.013>

Bianchi MLP, Antunes LMG (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição 12 (2): 123-130.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>

Bobinaité R, Viskelis P, Venskutonis PR (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. Food Chemistry. 132 (3): 1495–1501.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.137>

Chen, HY, Lin YC, Hsieh CL (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. Food Chem. 104 (4): 1418-1424.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.004>

Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: norma aprovada sexta edição – M7 – A6. Pennsylvania. v. 23, n. 2.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem. 52 (4): 601-623.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484333> PMID: 16484333

Eckert R, He J, Yarbrough DK, Qi F, Anderson MH, Shi W (2006). Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide. Antimicrob Agents Chemother. 50 (11): 3651-3657.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060534> PMID: 17060534

Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, D'azevedo PA (2009). *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. Anais Brasileiros de Dermatologia. Rio de Janeiro. 84 (5): 501-506.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962009000500009>

Guerra MP, Nodari RO (2004). Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento (5ª ed.). Porte Alegre. Pp. 13-28.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97 (7):1027-1031.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471432> PMID: 12471432

Hummer KE (2010). Rubus Pharmacology: Antiquity to the Present. HortScience. 45 (11): 1587-1591.

<https://naldc.nal.usda.gov/download/48550/PDF>

Kanegusuku M, Benassi JC, Pedrosa RC, Yunes RA, Filho VC, Maia AA, Souza MM, Delle Monache F, Niero R (2002). Citotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). Z. Naturforsch C. 57 (3-4): 272-276.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12064725> PMID: 12064725

Kusznierewicz B, Piekarska A, Mrugalska B, Konieczka P, Namieśnik J, Bartoszek A (2012). Phenolic composition and antioxidant properties of polish blue-berried honeysuckle genotypes by HPLC–DAD–MS, HPLC post

column derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH visualization. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 60 (7): 1755–1763.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf2039839>

Lombardo M, Kiyota S, Kato ETM, Mathor MB, Pinto TJA, Kaneko TM (2015). Evaluation of in vitro biological properties of *Senna occidentalis* (L.) Link. *Acta Scientiarum. Biological Science*. 37 (1): 9-13.

<http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i1.22525>

Leite LL, Coradin L (2011). In: **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul** / Lidio Coradin; Alexandre Siminski; Ademir Reis. – Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 934p., 2011.

Markesbery WR (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**. 1997; 23: 134–147.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165306> PMID: 9165306

Mayachiew P, Devahastin S (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT- Food Science and Technology*. 41 (7): 1153–1159.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.07.019>

Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*. 15 (2): 127-130.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268111> PMID: 11268111

Nogueira E, Rosa GJM, Haraguchi M, Vassiliev VS (1998). Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 61 (2): 111-117.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683341> PMID: 9683341

Oliveira BDA, Rodrigues AC, Cardoso BMI, Ramos ALCC, Bertoldi MC, Taylor JG, Cunha LR, Pinto UM (2016). Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. *Industrial Crops and Products*, v. 84: 59–66.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.037>

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR (2008). Métodos para Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação de concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia. 18(2): 301-307.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>

Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I (2002). In vitro antimicrobial activity of extrats and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. J. Ethnopharmacology. 79 (2): 165-168.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801377>

Patel AV, Rojas-Vera J, Dacke CG (2004). Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. Current Medicinal Chemistry. 11 (11): 1501-1512.

<http://dx.doi.org/10.2174/0929867043365143> PMID 15180580

Rabêlo SV, Costa MM, Libório RC, Almeida JRGS (2014). Antioxidant and Antimicrobial aActivity of Extracts from Atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). Rev. Bras. Frutic. 36: 265-271.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500031>

Ruiz-Rodríguez BM, Sánchez-Moreno C, Ancos B, Sánchez-Mata MC, Fernández-Ruiz V, Cámara M, Tardío J (2014). Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidante capacity. Fruits. 69 (6): 435-448.

<http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2014035>

Shin JS, Cho EJ, Choi HE, Seo JH, An HJ, Park HJ, Cho YW, Lee KT (2014). Anti-inflammatory effect of a standardized triterpenoid-rich fraction isolated from *Rubus coreanus* on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-induced macrophages. Journal of Ethnopharmacology. 158 (A): 291-300.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.044>

Silva JP, Siqueira AM (2000). Acción antibacteriana de extractos hidroalcoólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev. Cubana Plant. Med. 5 (1): 26-29.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000100007&lng=es&nrm=iso

Silva MJD, Endo LH, Dias ALT, Silva GA, Santos MH, Silva MA (2012). Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas. 33 (2): 267-274.

<https://doaj.org/article/039de37cf9c445dfbce64a2464fe26b6>

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2004). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre.

Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16 (3): 144–153.

Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA (1991). Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras. Fortaleza: UFC/Laboratório de Produtos Naturais, Edições. 416p.

Souza CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH (2007). Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. Química Nova. 30 (2): 351-355.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

Tieu K, Perier C, Caspersen C, Teismann P, Wu DC, Yan SD, Naini A, Vila M, Jackson-Lewis V, Ramasamy R, Przedborski S (2003). D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. J Clin Invest. 112 (6): 892-901.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975474> PMID: 12975474

Vargas PN, Hoelzel SC, Rosa CS (2008). Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição**. 19(1):11-15.

Woisky RG, Salatino A (1998). Analysis os propolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. Journal Apicultural Research. 37 (2): 99-105.

<http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

Wollgast J, Anklam E (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International. 33(6):423-447.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)

Zeidan R, Oran S, Khleifat K, Matar S (2013). Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv. (Rosaceae). Afr. J. Microbiol. Res. 7 (44): 5114–5118.

<http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2013.5770>

Zielinski AAF, Goltz C, Yamato MAC, Avila S, Hirooka EY, Wosiacki G, Nogueira A, Demiate IM (2015). Blackberry (*Rubus* spp.): influence of ripening and processing on levels of phenolic compounds and antioxidant activity of the 'Brazos' and 'Tupy' varieties grown in Brazil. Cienc. Rural. 45 (4): 744–749.

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20120715>

Zhong R, Guo Q, Zhou G, Fu H, Wan K (2015). Three new labdane-type diterpene glycosides from fruits of *Rubus Chingii* and their cytotoxic activities against five tumor cell lines. Fitoterapia. 102: 23-26.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.007>

CAPÍTULO 3

Ação Alelopática dos Extratos Aquosos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* Cham. & Schldl. (ROSACEAE)



Fonte: autora

O artigo encontra-se nas normas da revista Brazilian Journal of Botany para onde será enviado após considerações da banca e tradução para a língua inglesa. As normas da revista encontram-se em anexo (Anexo 3).

AÇÃO ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E FRUTOS DE *Rubus sellowii* Cham. & Schktdk. (ROSACEAE)

Marelise Teixeira¹, Fernanda Bruxel², Leticia Rodrigues Vieira², Eliane Regina da Silva³, Claudimar Sidnei Fior⁴, Eduardo Miranda Ethur⁵, Clélia Afonso Neves Afonso⁶, Elisete Maria de Freitas⁷

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Talini, 171 – Universitário, Lajedo por RS, 95900-000. Brasil. mareliset01@gmail.com

²Curso de Ciências Biológicas, Licenciatura, Centro Universitário UNIVATES.

³Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES.

⁶MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, ESTM, Instituto Politécnico de Leiria.

⁷Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e em Sistemas Ambientais Sustentáveis, Centro Universitário UNIVATES.

Autor correspondente:

RESUMO: As plantas produzem aleloquímicos que podem influenciar na germinação, no crescimento ou no desenvolvimento de plantas existentes nos ecossistemas. Espécies nativas com potencial alelopático podem ser utilizadas no controle de espécies invasoras, já que podem ter ação herbicida ou reguladora do crescimento. O objetivo do estudo foi verificar se o extrato aquoso de folhas e frutos de *Rubus sellowii* apresenta efeito fitotóxico na germinação e no crescimento inicial de *Lactuca sativa*. Para a germinação, os parâmetros avaliados foram percentual (PG) e índice de velocidade de germinação (IVG); para o crescimento foram analisados o comprimento

da raiz e da parte aérea. Os parâmetros avaliados foram submetidos à ANOVA seguida de comparação de médias por DMS e análise de regressão. Embora não tenha ocorrido alterações significativas na germinação, a redução dos valores das variáveis na medida em que aumentou a concentração do extrato sugere que em concentrações mais altas pode haver efeito inibitório da germinação. Os valores médios de comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas foram significativamente menores a partir de 2,5% dos extratos. O extrato de folhas teve mais efeito alelopático sobre o crescimento da parte aérea e o extrato dos frutos influenciou no comprimento das raízes e na altura da parte aérea. É provável que o valor do pH do extrato dos frutos, associado aos seus componentes, tenha influenciado mais na redução do crescimento das plântulas. Mais estudos são necessários a fim de isolar os componentes do extrato e identificar quais são os responsáveis pelos efeitos causados, comprovando se a espécie poderia ser potencial para o controle de espécies invasoras.

PALAVRAS-CHAVES: alelopatia, amora-preta, fitotoxicidade, *Lactuca sativa* L.

INTRODUÇÃO

A alelopatia é o meio de interação química entre plantas, ou entre estas e microrganismos, com importantes funções nos diversos ecossistemas (Sausen et al. 2009). Tal importância se deve ao fato de que plantas ou microrganismos produzem, e liberam no ambiente, substâncias químicas secundárias com ação tóxica com efeitos diretos ou indiretos, danosos ou benéficos, sobre outras espécies de plantas (Rice 1984). Essas substâncias, também conhecidas como aleloquímicos, produzidas por diferentes partes das plantas, podem influenciar na germinação, no crescimento ou no desenvolvimento de plantas existentes no habitat (Scherer et al. 2005). A germinação é o processo menos sensível à ação desses aleloquímicos, já o desenvolvimento inicial da raiz primária é mais sensível, podendo ser beneficiada ou prejudicada, o que é, normalmente, observado em testes laboratoriais (Ferreira & Aquila 2000).

Como consequência, as espécies produtoras dessas moléculas podem se beneficiar, pois reduzem o número de indivíduos de outras espécies e conseguem maior sucesso na competição pelos recursos, de modo que os processos de competição e alelopatia podem ser, ocasionalmente, considerados complementares ou colaborativos

(Reigosa et al. 2013). Dessa forma, a vegetação de uma determinada área pode estar condicionada às plantas pré-existentes e às substâncias químicas que elas liberam no meio (Ferreira & Aquila 2000), podendo sofrer as consequências pela invasão de espécies exóticas produtoras de substâncias alelopáticas. Segundo Wandscheer et al. (2011), é provável que a produção de aleloquímicos por *Hovenia dulcis* Thunb., espécie invasora de formações vegetais nativas no Rio Grande do Sul (RS), seja uma estratégia que a favorece no estabelecimento de densas populações.

De forma inversa, os aleloquímicos, quando produzidos por espécies nativas, podem servir como uma opção para o controle das espécies invasoras, já que podem ter ação herbicida ou reguladora do crescimento (Magiero et al. 2009) dando a estas, grande potencial para o uso no controle biológico para o manejo sustentável e ecológico (Maraschin-Silva & Aquila 2006). Porém, são necessárias pesquisas relacionadas aos efeitos fitotóxicos de espécies nativas sobre o crescimento de outras espécies, tanto nativas quanto exóticas, especialmente as invasoras, e sobre o ambiente (Lima et al. 2011).

Os ensaios laboratoriais utilizados para demonstrar a atividade alelopática são realizados com espécies que apresentam germinação rápida e uniforme e maior sensibilidade que permitem expressar os resultados sobre baixas concentrações dos aleloquímicos, como *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Muller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino) (Alves et al. 2004). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar se o extrato aquoso de folhas e frutos de *Rubus sellowii* apresenta efeito fitotóxico frente à germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico e preparo dos extratos

Folhas e frutos foram coletados de populações da espécie existentes em três municípios da região central do RS. Estes foram lavados, congelados e submetidos à liofilização no Centro Tecnológico de Pesquisa e Produção de Alimentos (CTPPA) do Parque Científico e Tecnológico da Univates – TECNOVATES.

Para a obtenção dos extratos, as folhas e frutos liofilizados foram macerados e submetidos à infusão em água de osmose reversa (1:10 w:v) aquecida a 90 °C. A seguir foram mantidos para resfriar em temperatura ambiente por uma hora. As infusões foram então filtradas em algodão e os extratos obtidos foram congelados para utilização nos ensaios de germinação e crescimento, realizados no Laboratório de Botânica da Univates.

Os extratos aquosos de frutos e folhas foram caracterizados no Laboratório de Química da Univates pelo método de Folin-Ciocalteu para a quantificação de polifenóis (Souza et al. 2007, Singleton & Rossi 1965) e pelo método de espectroscopia para a determinação de flavonoides (Woisky & Salatino (1998). As análises mostraram que os extratos aquosos de frutos e folhas apresentam, respectivamente, 19,28 e 281,72 mg de equivalência de ácido gálico/g de extrato de polifenóis e 1,68 e 21,45 mg de equivalência de rutina/g de extrato de flavonoides.

Bioensaio de germinação

Foram utilizadas cipselas de *Lactuca sativa* (Gran Rapids) como espécie receptora, distribuídas em placas de Petri (9,0 mm) sobre uma folha de papel germitest. Em cada placa de Petri foram estabelecidas 25 cipselas (uma repetição) de *L. sativa* e 8,0 mL de extrato nas diferentes concentrações (0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0%) e pH ajustado ao pH do extrato 100% de frutos e de folhas, correspondendo a sete tratamentos para cada um dos extratos, todos com quatro repetições e delineamento experimental casualizado. Para os tratamentos com o valor do pH do extrato 100%, que foi de 2,7 para frutos e 5,6 para folhas, verificado com pHmetro da marca Metrohm modelo 827 pH lab., foi utilizada água destilada ajustada aos dois valores do pH com o uso de ácido clorídrico (HCl).

As placas de Petri foram mantidas por seis dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/luz, temperatura de 25 °C (± 2 °C) e intensidade luminosa de 91 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. A avaliação da germinação foi realizada a cada 12 horas, sendo consideradas como germinadas as cipselas com protrusão radicular de 2,0 mm (Trezzi 2002, Junttila 1976). Foram determinados o percentual de germinação (PG) e índice de velocidade de germinação (IVG) para cada tratamento, usando a expressão $IVG = \left(\frac{G1}{N1}\right) + \left(\frac{G2}{N2}\right) + (...) + \left(\frac{Gn}{Nn}\right)$, onde: G1 = número de sementes germinadas na primeira contagem; N1 = número de horas decorridas até a primeira contagem; G2 =

número de sementes germinadas na segunda contagem N_2 = número de horas decorridas até a segunda contagem e n corresponde à última contagem (Maguire 1962).

Bioensaios de crescimento

Para a avaliação dos bioensaios de crescimento, as cipselas passaram por um pré-tratamento de germinação, sendo mantidas por 36 horas em placa de Petri com papel germitest e água destilada, para o crescimento radicular. As plântulas foram então transferidas para placas de Petri contendo 8,0 mL dos extratos nas mesmas concentrações do ensaio de germinação, correspondendo a sete tratamentos para cada um dos extratos, todos com quatro repetições de 25 plântulas. O delineamento experimental foi casualizado. A seguir foram acondicionadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C (± 2 °C) e intensidade luminosa de 91 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Decorridos cinco dias em sala de crescimento, as plântulas foram fotografadas e a medida do comprimento das raízes e da parte aérea foi obtida com o uso do programa ImageJ.

Todas as variáveis analisadas, tanto de germinação como de crescimento, foram submetidos à ANOVA seguida de comparação de médias por DMS, seguida de análise de regressão, com exceção dos tratamentos com o pH.

RESULTADOS

Bioensaio de germinação

Os valores do percentual de germinação (PG) e do índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 1) mostraram que as concentrações dos extratos, tanto de frutos quanto de folhas, não influenciaram na germinação de *Lactuca sativa*. Para ambos os extratos e todas as concentrações, inclusive os tratamentos com o pH, o PG ficou acima de 90% e o IVG acima de 0,88. Estes resultados evidenciaram que as concentrações dos extratos utilizados não foram eficientes para causar efeito alelopático sobre a germinação, não ocorrendo diferenças significativas ($p > 0,05$). Foi o que também ocorreu no estudo realizado por Ferreira et al. (2010) que também não obtiveram

efeitos significativos na germinação de sementes de fava (*Phaseolus lunatus*) frente ao extrato aquoso de folhas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.).

Não houve diferenças significativas para as variáveis analisadas (PG e IVG) em relação ao tratamento controle (Tabela 1) no ensaio de germinação. No entanto, verificou-se uma pequena redução nos valores, tanto de PG quanto de IVG à medida em que aumentou a concentração dos extratos. Isso indica que em concentrações mais elevadas o extrato poderia ter ação alelopática. Contudo, concentrações muito altas inviabilizam a sua exploração para o controle de espécies invasoras, como por exemplo em sistemas de cultivo, pois seriam necessárias quantidades muito grandes de frutos. Segundo Ferreira & Aquila (2000), a germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento das plântulas. Este resultado também é corroborado por Silva & Aquila (2006) em seu estudo sobre o efeito alelopático de cinco espécies nativas sobre *Lactuca sativa*, no qual não houve diferença significativa na germinação em relação ao controle.

Tabela 1: Média geral do percentual de germinação (PG) e do índice de velocidade de germinação (IVG), valor P da significância estatística da análise de variância e coeficiente de variação dos extratos de folhas e frutos de *Rubus sellowii*.

		Média Geral	Valor P*	Coeficiente de variação (%)
FOLHAS	PG	94	0,96	6,79
	IVG	0,90	0,77	8,35
FRUTOS	PG	94,29	0,43	6,55
	IVG	0,88	0,67	9,01

* Valores de $p > 0,05$ não foram considerados com variância significativa.

Bioensaio de crescimento com extrato de folhas

O crescimento inicial da parte aérea das plântulas de alface foi afetado quando utilizado extrato aquoso de folhas. Nos tratamentos com as concentrações 0 (controle), 0,1% e do valor do pH, as médias de crescimento da parte aérea foram semelhantes e não diferiram entre si, mas passaram a ser menores à medida em que aumentou a concentração do extrato, diferindo significativamente ($p < 0,05$) de todos os demais tratamentos (Tabela 2). As plântulas dos tratamentos 0,5% e 1,0% apresentaram médias de crescimento um pouco inferiores e não diferiram entre si.

Já os tratamentos com as concentrações 1,0%, 2,5% e 5,0% do extrato diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos além de apresentarem as menores médias. As médias diminuíram na medida em que aumentou a concentração do extrato, conforme também mostrou a análise de regressão. Andrade et al. (2009) também observaram redução no crescimento de plântulas de *L. sativa* com a utilização de extrato aquoso de *Cyperus rotundus* L. (tiririca), sendo maior a redução na medida em que aumentou a concentração do extrato.

No crescimento radicular, o tratamento controle se diferenciou de todos os demais tratamentos, atingindo comprimento médio de 2,82 cm, valor superior às médias dos demais. Os tratamentos com 2,5 e 5,0 % não diferiram entre si (Tabela 2), mas seus valores foram bem inferiores aos tratamentos com as menores concentrações do extrato. Estes resultados são semelhantes a outros estudos. Silveira et al. (2014), utilizando extrato aquoso de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. sobre *L. sativa*, mostraram declínio no comprimento das raízes e caules nas concentrações 2,5%, 5%, 7,5% e 10% de extrato. Além disso, Oliveira et al. (2011), em um estudo realizado com folhas frescas de bacupari (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) sobre a alface, mostraram que o comprimento médio do sistema radicular foi negativamente afetado por todos os tratamentos (4%, 8%, 12% e 16%) em comparação com o controle.

Bioensaio de crescimento com extrato de frutos

Quando analisado o crescimento inicial da parte aérea das plântulas de alface, observou-se que o extrato aquoso dos frutos influenciou no crescimento, pois conforme aumentou as concentrações do extrato houve redução na média de altura da parte aérea (Tabela 2). O tratamento controle se diferenciou de todos os tratamentos

atingindo a média mais elevada (0,30 cm). O mesmo ocorreu nos tratamentos de 5,0% e de pH, que além de se diferenciarem dos demais, obtiveram as menores médias (0,17 e 0,18 cm, respectivamente). Borella & Pastorini (2010) também tiveram o comprimento radicular das plântulas de *L. sativa* e picão-preto (*Bidens pilosa*) afetado quando submetidas aos extratos aquosos de frutos de umbu (*Phytolacca dioica*), à medida que aumentou a concentração do extrato. *L. sativa* foi afetada a partir do tratamento 4,0% de concentração e o picão-preto, a partir do tratamento 1,0%. Segundo Rao & Reddy (1981), os efeitos negativos são manifestados apenas em valores de pH igual ou inferior a 3,0 ou igual ou superior a 9,0, como se observou no presente estudo em que o pH dos frutos influenciou no crescimento da parte aérea e da raiz das plântulas de alface. Assim, considerando que o extrato de frutos apresentou menor quantidade de polifenóis e flavonoides, é provável que o pH dos frutos, associado à ação dos componentes do seu extrato, tenha provocado maior efeito sobre o crescimento das plântulas.

Resultados similares foram encontrados por Andrade et al. (2009), Borella & Pastorini (2010) e Oliveira et al. (2011), em seus estudos com outras espécies que concluíram que os extratos testados possuem fitotoxicidade e, possivelmente atividade alelopática, sendo assim pode-se sugerir que *Rubus sellowii* também possui atividade alelopática sobre o crescimento de *L. sativa*.

Tabela 2: Média da influência dos extratos aquosos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa in vitro* (p = 0,05)

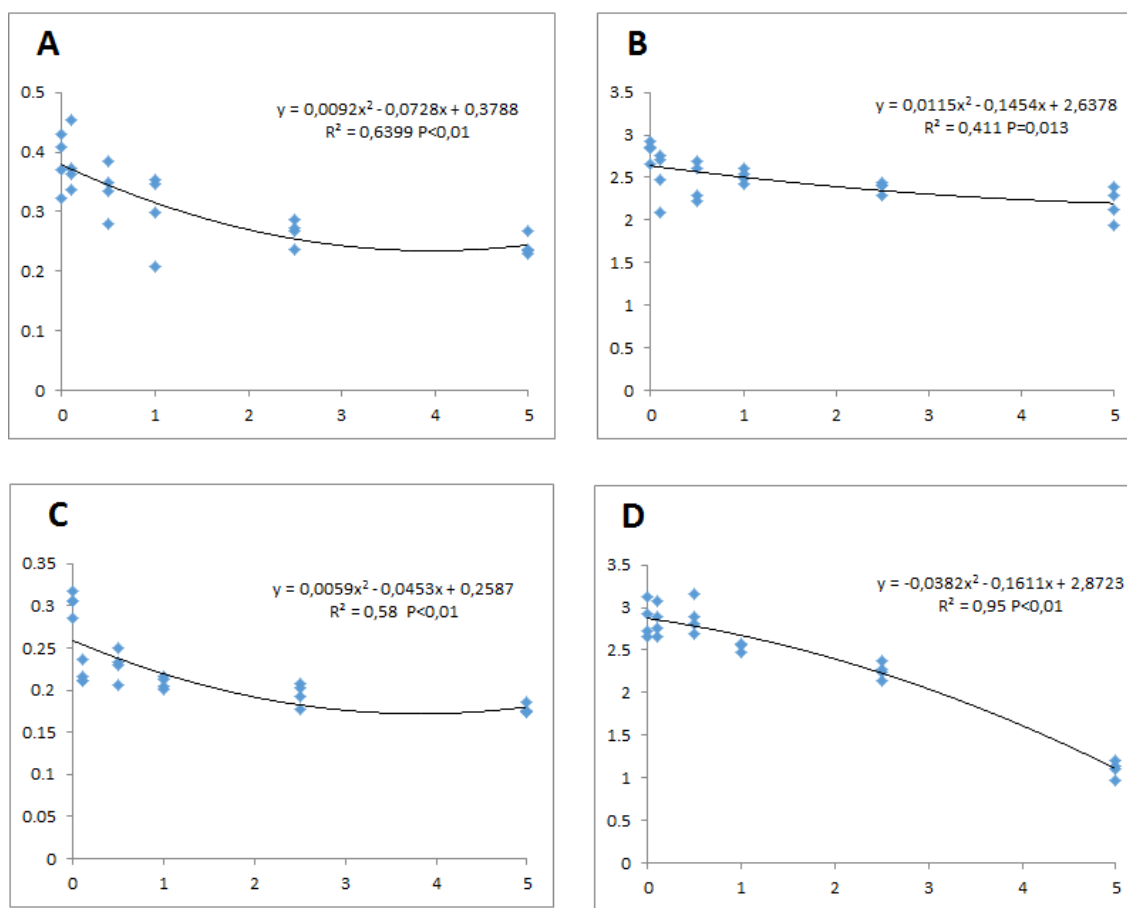
Concentração (%)	Folhas		Frutos	
	Parte aérea		Parte aérea	Raiz
	(cm)	Raiz		
0	0,38 a	2,82 a	0,30 a	2,85 a
0,1	0,38 a	2,51 b	0,22 bc	2,84 a
0,5	0,33 ab	2,45 b	0,23 b	2,88 a
1,0	0,30 bc	2,51 b	0,20 cd	2,22 b
2,5	0,26 c	2,38 bc	0,19 de	2,26 b

5,0	0,24 c	2,18 c	0,17 e	1,10 c
pH	0,35 ab	2,46 b	0,18 e	1,48 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade de erro (teste DMS).

Na análise regressão percebe-se a relação entre a dose e a redução no crescimento inicial da parte aérea e da raiz sob os efeitos dos extratos em suas diferentes concentrações, conforme foi maior a concentração dos extratos (folhas ou frutos) a uma declividade do crescimento da parte aérea e da raiz (Figura 1). Conforme Jacobi & Ferreira (1991), a inibição do crescimento das plântulas após a germinação, sob o ponto de vista ecológico, é um mecanismo de seleção mais eficiente do que evitar a germinação, porque a descendência é eliminada. A raiz das plântulas de alface se mostraram mais sensíveis sob efeito do extrato aquoso dos frutos (Figura 1d), quando comparado com o comprimento das raízes sob efeito do extrato aquoso das folhas (Figura 1b). De acordo com Pereira et al. (2008), os aleloquímicos são muito diversos e muitos só atuam com a presença de outros, em combinações e proporções específicas, assim é difícil determinar os efeitos de cada um pela complexidade dos processos biológicos envolvidos. Assim pode-se explicar a maior atividade alelopática nas concentrações mais altas.

Figura 1: Análise de regressão do crescimento da parte aérea e da raiz de alface sob efeito do extrato aquoso de folhas e frutos de *Rubus sellowii* em diferentes concentrações; A – crescimento da parte aérea sob efeito do extrato aquoso de folhas; B – crescimento da raiz sob efeito do extrato aquoso de folhas; C – crescimento da parte aérea sob efeito do extrato aquoso dos frutos; D – crescimento da raiz sob efeito do extrato aquoso de frutos.



CONCLUSÃO

As concentrações testadas dos extratos aquosos de folhas e frutos de *Rubus sellowii* não afetaram a germinação de *Lactuca sativa*, podendo-se concluir o extrato pode ter atividade alelopática somente em concentrações superiores a 5%. No entanto, o efeito alelopático foi significativo sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa*, tanto do extrato aquoso de folhas e de frutos. O extrato de folhas teve mais efeito alelopático sobre o crescimento da parte aérea de *Lactuca sativa* a partir da concentração de 2,5%. Já o extrato dos frutos apresentou elevado efeito fitotóxico, tanto sobre o crescimento da parte aérea como de raízes, também a partir de 2,5%. No entanto, considerando que o tratamento com o valor do pH do extrato dos frutos também apresentou efeito inibitório do crescimento e que os frutos apresentam menor quantidade de flavonoides e polifenóis, é provável que o pH seja um dos fatores que, associados aos componentes do extrato dos frutos, contribuiu para a redução do crescimento das plântulas.

Assim, mais estudos são necessários a fim de isolar os componentes do extrato e identificar quais são os responsáveis pelos efeitos causados.

REFERÊNCIAS

- Alves MCS, Filho SM, Innecco R, Torres SB. 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. *Pesquisas Agropecuárias Brasileiras* 39: 1083-1086.
- Andrade HM, Bittencourt AHC, Vestena S. 2009. Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. *Ciência e Agrotecnologia* 33:1984-1990.
- Borella J, Pastorini LH. 2010. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. *Ciência e Agrotecnologia* 34: 1129-1135.
- Ferreira AG, Aquila MEA. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 175-204.
- Ferreira EGBS, Matos VP, Sena LHM, Sales AGFA. 2010. Efeito alelopático do extrato aquoso de sabiá na germinação de sementes de fava. *Revista Ciência Agronômica* 41: 463-467.
- Jacobi US, Ferreira AG. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26: 935-943.
- Junttila O. 1976. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. *Physiology plant* 29: 264-268.

Lima CP, Cunico MM, Trevisan RR, Philippsen AF, Miguel OG, Miguel MD. 2011. Efeitos alelopáticos e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. *Acta Botanica Brasilica* 25: 331-336.

Magiero EC, Assmann JM, Marchese JA, Capelin D, Paladini MV, Trezzi MM. 2009. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 11: 317-324.

Maguire JD. 1962. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.

Maraschin-Silva F, Aquila MEA. 2006. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica* 20: 61-69.

Oliveira AKM, Ribeiro JWF, Matias R, Gusmão DH, Pereira KCL. 2011. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) na germinação de alface. *Revista Brasileira de Biociências* 9: 550-553.

Pereira BF, Sbrissia AF, Serrat BM. 2008. Alelopatia intra-específica de extratos aquosos de folhas e raízes de alfafa na germinação e no crescimento inicial de plântulas de dois materiais de alfafa: crioulo e melhorado. *Ciência Rural* 38: 561-564.

Rao PN, Reddy BVN. 1981. Autoecological studies in *Indigofera linifolia* (L.f.) Retz. I. Germination behaviour of the seeds. *Journal of the Indian Botanical Society* 60: 51-57.

Reigosa M, Gomes AS, Ferreira AG, Borghetti F. 2013. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 629-642.

Rice EL. 1984. In: Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. *Polibotânica* 27: 145-158.

Sausen TL, Löwe TR, Figueiredo LS, Buzatto CR. 2009. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. *Polibotânica* 27: 145-158.

Scherer LM, Zucareli V, Zucareli CA, Fortes AMT. 2005. Allelopathic effect of aqueous extracts of leucina (*Leucaena leucocephala* Wit) leave and fruit on germination and root growth of canafistula (*Peltophorum dubium* Spreng). *Semina: Ciências Agrárias* 26: 161-166.

Silva FM, Aquila MEA. 2006. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica* 20: 61-69.

Silveira BD, Hosokawa RT, Nogueira AC, Weber VP. 2014. Atividade alelopática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. *Ciência Florestal* 24: 79-85.

Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144–153.

Souza CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. 2007. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Química Nova* 30: 351-355.

Trezzi MM. 2002. Avaliação do potencial alelopático de genótipos de sorgo. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Wandscheer ACD, Borella J, Bonatti LC, Pastorini LH. 2011. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Houvenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica* 25: 25-30.

Woisky RG, Salatino A. 1998. Analysis os propolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. *Journal Apicultural Research* 37: 99-105.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os frutos de *Rubus sellowii* apresentam elevado potencial nutricional, com quantidades significativas de sais minerais, proteínas, ácido ascórbico e carotenoides e elevada acidez. O consumo dos frutos in natura ou na forma processada pode complementar a dieta, constituindo um alimento funcional que reduz o risco de desenvolvimento de doenças associadas a fenômenos de oxidação e envelhecimento celular.

A espécie apresenta quantidade significativa de polifenóis que pode estar relacionada à sua capacidade antioxidante, atuando na prevenção de reações oxidativas, ou seja, ajuda contra os danos normais causados pelos feitos do processo fisiológico de oxidação dos tecidos e ajuda na prevenção de doenças neuro-degenerativas resultantes do acúmulo do dano oxidativo nas células.

Além disso, a espécie também apresenta atividade antimicrobiana. Os extratos hidroetanólicos de folhas e frutos mostraram ação bactericida frente à *Staphylococcus aureus*. Frente à levedura *Candida albicans*, os extratos podem ter atividade antimicrobiana, mas somente em concentrações mais altas. Em relação à *Escherichia coli*, apresenta apenas ação bacteriostática, pois apenas promoveu a inibição do crescimento.

R. sellowii mostrou ter efeito alelopático sobre a germinação e o crescimento inicial da *Lactuca sativa*. Na germinação, os resultados sugerem que este efeito ocorre em concentrações elevadas, o que inviabiliza a exploração desse potencial. Já para o crescimento inicial da parte aérea e da raiz este efeito é intenso a partir das concentrações de 2,5%, sendo maiores os efeitos quando o extrato for dos frutos. Contudo, são necessários mais estudos a fim de comprovar seu efeito alelopático para o desenvolvimento de subprodutos.

A espécie apresenta diferentes potenciais e a sua exploração deve ser estimulada, contribuindo para o maior aproveitamento da biodiversidade brasileira, sendo importante estimular a continuidade de pesquisas no isolamento de substâncias e na propagação de *R. sellowii*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisas Agropecuárias Brasileiras**, v. 39, p. 1083-1086, 2004.
- ANDRADE, J. S.; ARAGÃO, C. G.; FERREIRA, S. A. N. Caracterização física e química dos frutos de Araçá-Pêra (*Psidium acutangulum*) D. C.). **Acta Amazonica**, v. 23, p. 213-217, 1993.
- ANDRADE, H. M.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p.1984-1990, 2009.
- ANTUNES, L.E. C. Amora-preta: Nova opção de cultivo no Brasil. Blackberry: A new crop option to Brazil. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2002.
- ANTUNES, L. E. C. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta. Editada por Luis Eduardo Côrrea Antunes, Maria do Carmo Bassols Raseira – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, **Documento 122**, 2004.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists (2012). Official Methods of Analysis. **Method 920.177**, Cap. 44, p. 24.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists (1995). **Official Method 991.43**. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods, Chapter 32, p. 7.
- ARABSHAHI-DELOUEE, S.; UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1233-1240, 2007.
- ARAÚJO, P. G. L.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; PAIVA, J. R. β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 104-107, 2007.
- AROUCHA, E. M. M.; GOIS, V. A.; LEITE, R. H. L.; SANTOS, M. C. A.; SOUZA, M. S. Acidez em frutas e hortaliças. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 05, p. 01-04, 2010.

BARBIERI, R. L.; VIZZOTTO, M. Pequenas frutas ou frutas vermelhas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, n. 268, p. 7-10, 2012.

BARCIA, M. T.; JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; ZAMBIASI, R. C. Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 381-390, 2010.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, p. 397-405, 2013.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOBINAITE, R.; VISKELIS, P.; VENSKUTONIS, P. R. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. **Food Chemistry**. 132, 1495–1501, 2012.

BONETTI, J. A.; ZANUZO, M. R.; MACHADO, R. A. F.; CONSTANTINO, E. J.; CACHO, R. C.; RIEGER, F. A. Influência do Parcelamento de Potássio (K) nas características do melão utilizando sistema tutorado em Sinop-MT. **Revista Uniara**, v. 14, p. 110-117, 2011.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1129-1135, 2010.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2016.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde. 2007. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2016.

CARLSEN, M. H.; HALVORSEN, B. L.; HOLTE, K.; BØHN, S. K.; DRAGLAND, S.; SAMPSON, L.; WILLEY, C.; SENOO, H.; UMEZONO, Y.; SANADA, C.; BARIKMO, I.; BERHE, N.; WILLETT, W. C.;

PHILIPS, K. M.; JACOBS Jr, D. R.; BLOMHOFF, R. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. **Nutrition Journal**, London, v. 9, n. 3, p.1-11, 2010.

CHEN, H. Y.; LIN, Y. C.; HSIEH, C. L. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1418-1424, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**: norma aprovada sexta edição – M7 – A6. Pennsylvania, 2005. v. 23, n. 2.

CORADIN, L. In: Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul / Lidio Coradin; Alexandre Siminski; Ademir Reis. – Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**, 934p, 2011.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin Chem**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.

DIAS, V. V.; SCHULTZ, G.; SCHUSTER, M. S.; TALAMINI, E.; RÉVILLION, J. P. O Mercado de Alimentos Orgânicos: Um panorama quantitativo e qualitativo das publicações internacionais. **Ambiente & Sociedade**, v. 18, p. 161-182, 2015.

ECKERT R, H. E. J.; YARBROUGH, D. K.; QI, F.; ANDERSON, M. H.; SHI, W. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3651-3657, 2006.

ELLINGER, S.; ELLINGER, J.; STEHLE, P. Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention and treatment of prostate cancer: do we have the evidence from intervention studies? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 9, p. 722-727, 2006.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 41-46, 2008.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, E. G. B. S.; MATOS, V. P.; SENA, L. H. M.; SALES, A. G. F. A. Efeito alelopático do extrato aquoso de sabiá na germinação de sementes de fava. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, p. 463-467, 2010.

GANEM, R. S. **Conservação da biodiversidade : legislação e políticas públicas**. Brasília : Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 437 p., 2010.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GERHARDT, A.; VINCENZI, A.; SILVA, B. P.; SOUZA, C. F. V.; LIMA, C. V. S.; ETHUR, E. M.; WILDNER, G. R.; HOEHNE, L.; RODRIGUES, M.; MACIEL, M. J. Produção e Análise de Bioprodutos. In: SPEROTTO, R. A. (Org.), **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**, Lajeado: Editora Univates, 329p., 2014.

GOMES, A. P. E.; SILVA, K. E.; RADEKE, S. M.; OSHIRO, A. M. Caracterização física e química de kiwi in natura e polpa provenientes da comercialização de Dourados-MS. **Revista de Ciências Exatas e da Terra UNIGRAN**, v. 1, p. 1-8, 2012.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** (5ª ed.). Porte Alegre. Pp. 13-28, 2004.

GUIMARÃES, M. M.; SILVA, M. S. Nutritional value and chemical and physical characteristics of dried murici fruits (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 817-821, 2008.

HARDISSON, A.; RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. **Food Chemistry**, v. 73, p. 153-161, 2001.

HASSIMOTTO, N. M. A.; MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 702-708, 2008.

HERNANDÉZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLES, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. 96, p. 654-664, 2006.

HIRSCH, G. E.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D. B.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 42, p. 942-947, 2012.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HUMMER, K. E. *Rubus* Pharmacology: Antiquity to the Present. **HortScience**, v. 45, p. 1587-1591, 2010.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. (4th ed.), 2008. URL http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20&func=select&id=1&orderby=2. Acessado 18.01.16.

JAAKKOLA, M.; KORPELAINEN, V.; HOPPULA, K.; VIRTANEN, V. Chemical composition of ripe fruits of *Rubus chamaemorus* L. grown in different habitats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1324–1330, 2012.

JACOBI, U. S.; FERREIRA, A. G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 935-943, 1991.

JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIASI, R. C.; CHIM, J. F. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv.tupy. **Química Nova**, v. 33, p. 1720-1725, 2010.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R.C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp.) Phytochemicals in blackberry. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 245-260, 2011.

JUNTILA, O. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. **Physiology plant**, v. 29, p. 264-268, 1976.

KANEGUSUKU, M.; BENASSI, J. C.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; MAIA, A. A.; SOUZA, M. M.; DELLE MONACHE, F.; NIERO, R. Citotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 272-276, 2002.

KINUPP, V. F. Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS. 2v. 562 f. **Tese (Doutorado em Agronomia)**, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2014.

KOKA, I.; KARADENIZ, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 447-450, 2009.

KUSZNIEREWICZ, B.; PIEKARSKA, A.; MRUGALSKA, B.; KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J.; BARTOSZEK, A. Phenolic composition and antioxidant properties of polish blue-berried honeysuckle genotypes by HPLC–DAD–MS, HPLC post column derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH visualization. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1755–1763, 2012.

LEITE, L. L.; CORADIN, L. In: **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul** / Lidio Coradin; Alexandre Siminski; Ademir Reis. – Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 934p. 2011.

LEVY-COSTA, R. B.; SICHIERI, R.; PONTES, N. S.; MONTEIRO, C. A. Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 530-540, 2005.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, D. E. S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 101-103, 2003.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeitos alelopáticos e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 331-336, 2011.

LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KATO, E. T. M.; MATHOR, M. B.; PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M. Evaluation of in vitro biological properties of *Senna occidentalis* (L.) Link. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v. 37, n. 1, p. 9-13, 2015.

LOPES, R. L. T. **Dossiê Técnico: Fabricação de geléias**. (1ª ed.). Minas Gerais: CETEC, (Capítulo 1), 2007.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. (2ª ed.). São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos de Flora**, 2006.

MAAS, J.L.; GALLETTA, G.J.; STONER, G.D. Ellagic acid, na anticarciogen in fruits, especially in strawberry: a review. **HortScience Alexandria**. v. 26, n.1, p. 10-14. 1991.

MAGIERO, E. C.; ASSMANN, J. M.; MARCHESE, J. A.; CAPELIN, D.; PALADINI, M. V.; TREZZI, M. M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 317-324, 2009.

MAGUIRE, James D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAIHARA, V. A.; SILVA, M. G.; BALDINI, V. L. S.; MIGUEL, A. M. R.; FÁVARO, D. I. T. Nutritional evaluation of proteins, lipids, carbohydrates, fiber and vitamins in industry worker's diets. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 672-677, 2006.

MAPA/SDA/CGAL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretária de Defesa Agropecuária/Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial. Análises Físico-Químicas de Bebidas e Vinagres – BEB. MET BEB/006/001 **Método para determinação de ácido ascórbico**. Brasil, 2013.

- MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 61-69, 2006.
- MARDINI, C. V.; MARDINI, L. B. L. F. **Cultivo de peixes e seus segredos**. (1ª ed.). Canoas: Editora ULBRA, (Capítulo 5), 2000.
- MARKESBERRY, W. R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, p. 134–147, 1997.
- MAYACHIEW, P.; DEVAHASTIN, S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p.1153–1159, 2008.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res** 15: 127-130, 2001.
- MOTA, R. V. Caracterização do suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 303-308, 2006.
- MUNHOZ, P. C.; PEREIRA, E.; SCHIAVON, M. V.; SANTOS, D. C.; VIZZOTTO, M. Caracterização Química de Frutas nativas vermelhas: araçá-vermelho, cereja-do-rio-grande, pitanga e jabuticaba. **Embrapa Clima Temperado**, 2014.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B., KENT, G. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n. 403, p. 853-858. 2000.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NEPA por UNICAMP - Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação. Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos. 2011. **http: por por www.unicamp.br/nepa/taco/**, Accessed 08.10.16

NETO, N. C.; DENUZI, V. S. S.; RINALDI, R. N.; STADUTO, J. A. R. Produção Orgânica: uma potencialidade estratégica para a agricultura familiar. **Revista Percorso-NEMO**, v. 2, p. 73-95, 2010.

NOGUEIRA, E.; ROSA, G. J. M.; HARAGUCHI, M.; VASSILIEFF, V. S. Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 2, p. 111-117, 1998.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 543-555, 2000.

OLIVEIRA, A. K. M.; RIBEIRO, J. W. F.; MATIAS, R.; GUSMÃO, D. H.; PEREIRA, K. C. L. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) na germinação de alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, p. 550-553, 2011.

OLIVEIRA, J. A. R.; CARVALHO, A. V.; MARTINS, L. H. S.; MOREIRA, D. K. T. Elaboração e Catacterização Físico-química e Sensorial de Estruturados de Polpa Concentrada de Abacaxi. **Alimento Nutrição Araraquara**, v. 23, p. 23-31, 2012.

OLIVEIRA, B. D. A.; RODRIGUES, A. C.; CARDOSO, B. M. I.; RAMOS, A. L. C. C.; BERTOLDI, M. C.; TAYLOR, J. G.; CUNHA, L. R.; PINTO, U. M. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 59–66, 2016.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação de concentração mínima ininitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extrats and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 165-168, 2002.

PATEL, A. V.; ROJAS-VERA, J.; DACKE, C. G. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1501-1512, 2004.

PAWLOSKY, R. J.; WARD, G.; SALEM, N. Essential Fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. **Lipids**, v. 31, p. S103-S107, 1996.

PELISSARI F. M.; RONA, M. S. S.; MATIOLI, G. O Licopeno e suas contribuições na prevenção de doenças. **Arquivo Mudi**, v. 12, p. 5-11, 2008.

PEREIRA, B. F.; SBRISSIA, A. F.; SERRAT, B. M. Alelopatia intra-específica de extratos aquosos de folhas e raízes de alfafa na germinação e no crescimento inicial de plântulas de dois materiais de alfafa: crioulo e melhorado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 561-564, 2008.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. **A química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais**. (1ª ed.). Maceió: EDUFAL, (Capítulo 1), 2005.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 179-187, 2006.

RABÊLO, S. V.; COSTA, M. M.; LIBÓRIO, R. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Antioxidant and Antimicrobial a Ativity of Extracts from Atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 265-271, 2014.

RAO, P. N.; REDDY, B. V. N. Autoecological studies in *Indigofera linifolia* (L.f.) Retz. I. Germination behaviour of the seeds. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 60, p. 51-57, 1981.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 629-642, 2013.

RICE, E. L. In: Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. **Polibotánica**, v. 27, p. 145-158, 1984.

RIDGEN, L. V. M.; CAVALCANTI, T. B. A conservação e utilização de recursos genéticos vegetais. 2002. In: Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul / Lidio Coradin; Alexandre Siminski; Ademir Reis. – Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**, 934p., 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. 2004. **HarvestPlus handbook for carotenoids analysis**. Washington, DC and Cali: IFPRI and CIAT.

RUIZ-RODRÍGUEZ, B. M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M.; TARDÍO, J. Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidant capacity. **Fruits**, v. 69, n. 6, p. 435-448, 2014.

SAUSEN, T. L.; LÖWE, T. R.; FIGUEIREDO, L. S.; BUZATTO, C. R. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acacia sellowiana* (O. Berg) Burret. **Polibotânica**, v. 27, p. 145-158, 2009.

SCARIOT, A. Panorama da Biodiversidade brasileira. In: **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas**. Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, p. 111-130, 2010.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 221-236, 2004.

SCHERER, L. M.; ZUCARELI, V.; ZUCARELI, C. A.; FORTES, A. M. T. Allelopathic effect of aqueous extracts of leucina (*Leucaena leucocephala* Wit) leave and fruit on germination and root growth of canafistula (*Peltophorum dubium* Spreng). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 161-166, 2005.

SCHMIDT, C. G. Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango. **Dissertação de Mestrado**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande: FURG, 130 p., 2008.

SHIN, J. S.; CHO, E. J.; CHOI, H. E.; SEO, J.H.; AN, H. J.; PARK, H. J.; CHO, Y. W.; LEE, K. T. Anti-inflammatory effect of a standardized triterpenoid-rich fraction isolated from *Rubus coreanus* on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-induced macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 158, p. 291-300, 2014.

Shimadzu Corporation. **Shimadzu High-Performance Liquid Chromatograph Prominence** (2008). Amino Acid Analysis System Supplementary Manual. Japan.

SILVA, J. P.; SIQUEIRA, A. M. Acción antibacteriana de extractos hidroalcoólicos de *Rubus urticaefolius*. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 5, n. 1, p. 26-29, 2000.

SILVA, M. R.; SILVA, M. S.; OLIVEIRA, J. S. Estabilidade de ácido ascórbico em pseudofrutos de caju-do-cerrado refrigerados e congelados. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, p. 9-14, 2004.

SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 61-69, 2006.

SILVA, M. J. D.; ENDO, L. H.; DIAS, A. L. T.; SILVA, G. A.; SANTOS, M. H.; SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 33, n. 2, p. 267-274, 2012.

SILVEIRA, B. D.; HOSOKAWA, R. T.; NOGUEIRA, A.C.; WEBER, V. P. Atividade alelopática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Ciência Florestal**, v. 24, p. 79-85, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre 2004.

SIMOPOULOS, A. P.; SALEM, N. Fatty acids and lipids from cell biology to human disease. **Lipids**, v. 31, p. S1-S1, 1996.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144–153, 1965.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J.; OHROLOGGE, J. B. Lipids. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.), **Biochemistry and molecular biology of plants** (pp. 456-527). Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2000.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras. **Fortaleza: UFC/Laboratório de Produtos Naturais**, Edições. 416p, 1991.

- SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 435-440, 2010.
- SOUZA, A. V.; RODRIGUES, R. J.; GOMES, E. P.; GOMES, G. P.; VIEITES, R. L. Caracterização bromatológica de frutos e geleias de amora-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 13-19, 2015.
- STORCK, C. R.; NUNES, G. L.; OLIVEIRA, B. B.; BASSO, C. Leaves, stalk, pell and seeds of vegetables: nutritional composition, utilization and sensory analysis in food preparations. **Ciência Rural**, v. 43, p. 537-543, 2013.
- TEMPLE, N. J.; GLADWIN, K. K. Fruit, vegetables and the prevention of cancer: research challenges. **Nutrition**, v. 19, p. 467-470, 2003.
- TIEU, K.; PERIER, C.; CASPERSEN, C.; TEISMANN, P.; WU, D. C.; YAN, S. D.; NAINI, A.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; RAMASAMY, R.; PRZEDBORSKI, S. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. **J Clin Invest**, v. 112, n. 6, p. 892-901, 2003.
- TIRAPEGUI, J.; CASTRO, I. A.; ROSSI, L. **Biodisponibilidade de proteínas**. In S. M. F. Cozzolino (Eds.), Biodisponibilidade de nutrientes (pp. 131-190). São Paulo: Editora Manole, 2016.
- TOLEDO, T. C. F.; BRAZACA, S. G. C.; ARTHUR, V.; PIEDADE, S. M. S. Composition, protein digestibility and deamidation in Brazilian soy cultivars subjected to gamma radiation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 812-815, 2007.
- TREZZI, M. M. Avaliação do potencial alelopático de genótipos de sorgo. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 132p., 2002.

- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.
- UENOJO, M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, p. 616-622, 2007.
- VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C.; ROSA, C. S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p.11-15, 2008.
- VIZEU, V. E.; FEIJÓ, M. B. S.; CAMPOS, R. C. Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimistura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 254-258, 2005.
- VIZZOTTO, M. Propriedades funcionais das pequenas frutas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, n. 268, p. 84-88, 2012.
- ZEIDAN, R.; ORAN, S.; KHLEIFAT, K.; MATAR, S. Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv. (Rosaceae). **African Journal Microbiology Research**, v. 7, n. 44, p. 5114–5118, 2013.
- ZIELINSKI, A. A. F.; GOLTZ, C.; YAMATO, M. A. C.; AVILA, S.; HIROOKA, E. Y.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M. Blackberry (*Rubus* spp.): influence of ripening and processing on levels of phenolic compounds and antioxidant activity of the ‘Brazos’ and ‘Tupy’ varieties grown in Brazil. **Cienc Rural**, v. 45, n. 4, p. 744–749, 2015.
- ZHONG, R.; GUO, Q.; ZHOU, G.; FU, H.; WAN, K. Three new labdane-type diterpene glycosides from fruits of *Rubus Chingii* and their cytotoxic activities against five tumor cell lines. **Fitoterapia**, v. 102, p. 23-26, 2015.
- WANDSCHEER, A. C. D.; BORELLA, J.; BONATTI, L. C.; PASTORINI, L. H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Houvenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 25-30, 2011.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 6, p. 423-447, 1998.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p.423-447, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 – Normas da revista Journal of Functional Foods



JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS

Journal of Functional Foods is the official scientific journal of the International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 1756-4646

DESCRIPTION

The *Journal of Functional Foods* aims to bring together the results of fundamental and applied research into **functional foods** (ie those containing various factors to ensure or enhance health) and their **development** and **commercialization** in food products. The journal will cover (but will not be restricted to) the fields of **plant bioactives**; **antioxidants** and ageing; **dietary fibre**, **prebiotics** and **functional starches**; **probiotics** and probiotic functional foods; functional **lipids**; **bioactive peptides**; **vitamins**, **minerals** and **botanicals** and other **dietary supplements**; functional beverages and food products; and **molecular nutrition** and other relevant aspects of **disease** prevention and treatment.

Papers will cover such issues as new functional food bioactives; efficacy and safety of bioactive compounds and other functional food constituents using genomic technologies, bioassays and dynamic models; characterisation of functional foods and functional constituents with reference to product development; preparation of natural and synthetic ingredients for use in foods, supplements or premixes and improvement of ingredient quality; use of natural and synthetic ingredients in foods, supplements or premixes, effects of processing (including packaging, storage etc) on functionality and improvement of product quality; verification, quality control and traceability of natural and synthetic functional food ingredients and products; improvement of the quality of foods with inherent health benefits ; development and commercialisation of specific functional food products, supplements or functional ingredients; and the regulatory aspects of functional foods and related issues eg labelling, substantiation of health claims.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Academics, scientists, nutraceutical and functional foods industries

IMPACT FACTOR

2015: 3.973 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
 SciSearch/Science Citation Index Expanded
 ScienceDirect
 Scopus
 Scirus
 Journal Citation Reports - Science Edition

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

F. Shahidi, Dept. of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, 232 Elizabeth Ave, St John's, A1B 3X9, Canada

Associate Editors

R. Aluko, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada
J.N. Seiber, University of California, Davis, Davis, California, USA
K.M. Tuohy, Fondazione Edmund Mach, S. Michele all'Adige (TN), Italy
M. Wang, The University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China
W. Yokoyama, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Albany, California, USA

Editorial Board Members

C. Alasalvar, TÜBİTAK Marmara Research Center, Gebze/Kocaeli, Turkey
E. Alvarez Parrilla, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, Mexico
C. Barrow, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia
J. Betz, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA
H.-J. Chae, Chonbuk National University, Jeonju, South Korea
Z.-Y. Chen, The Chinese University of Hong Kong, New Territories, Hong Kong
C.-T. Ho, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA
A. Ismail, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia
K. Kanazawa, Kobe University, Kobe, Japan
S.-K. Kim, Pukyong National University, Pusan, South Korea
S. Li, University of Macau, Macao, China
Y. Mine, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada
K. Miyashita, Hokkaido University, Hakodate, Japan
A. Murakami, Kyoto University, Kyoto, Japan
H.-K. Na, Sungshin Women's University, Gangbuk-gu, Seoul, South Korea
M.-H. Pan, National Taiwan University, Taipei, Taiwan
G.M. Pastore, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil
R. Prior, University of Arkansas, Little Rock, Arkansas, USA
D. Rodríguez Amaya, Cidade Universitária, Campinas, Brazil
S. Sang, North Carolina Agricultural and Technical State University, Kannapolis, North Carolina, USA
K. Sato, Kyoto University, Kyoto, Japan
A. Scalbert, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Saint-Genes-Champagnelle, France
M. Serafini, National Institute for Food Nutrition Research, Rome, Italy
V. Somoza, University of Vienna, Vienna, Austria
Y.-J. Surh, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea
R. Tsao, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Guelph, Ontario, Canada
G. Williamson, University of Leeds, Leeds, UK
P. Winterhalter, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany
H. Xiao, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA
R.Y. Yada, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada
G.-C. Yen, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Journal of Functional Foods focuses on fundamental and applied research and functional foods product development and commercialization. The journal covers the fields of plant bioactives; antioxidants and ageing; dietary fibre, prebiotics and functional starches; probiotics and probiotic functional foods; functional lipids; bioactive peptides; vitamins, minerals and botanicals and other dietary supplements; functional beverages and food products; molecular nutrition and other relevant aspects of disease prevention and treatment.

Authors are encouraged to submit contributions on all types of functional foods, nutraceuticals and food supplements. The focus of the journal ranges from technical issues in the production of first-generation functional foods (e.g. vitamin supplements, fibre-enriched foods), and technology for the improvement of 'whole foods', to research in areas such as nutrigenomics, informing the next generation of functional foods.

ESSENTIALS TO FASTER HANDLING OF PAPERS

Do not contact the editor-in-chief to ask if your manuscript is suitable for submission to the journal. This is a decision you have to make. There is no pre-screening of papers outside the electronic system. All papers should be submitted via the electronic submission system. Regarding authorship, include only those who have meaningfully contributed to the work; others could be placed in the acknowledgement section. The number of authors on each paper is usually no more than 5. Papers that carry more authors names should consider having some in the Acknowledgement section, unless they have all made primary contributions to the design of the study, writing of the paper. For more information on authorship please refer to: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#authorship> Please number both the pages and lines; continuous line numbering is **essential**. Please prepare double-spaced text of your paper. Please use **British spelling** of terms. The presentation language must be adequate for submission to JFF as an English journal. If not done adequately, the manuscript may be rejected without review. An English language editing service is available through Elsevier at: <http://webshop.elsevier.com/languageservices/> When suggesting 3 potential reviewers for your paper, please note that: These should not be from your own institution These **cannot** be all from your own country (no more than one be from the same country) These must be expert in the field and not suggested for other reasons (such as collaborators of any sort). Please note that your reviewer suggestions will not always be used as a first choice. Demonstrate relevance to the area of the interest to the journal mandate and to the field. Proper review and citation of important papers is essential. Novelty of the work and how it advances knowledge in the field must be highlighted and explained both in the text of the manuscript and in the cover letter. Credit must be given to prior work explicitly or else quoting of sentences, paragraphs or tables without citation is prohibited and results in rejection of papers. It should be noted that all manuscripts are screened through anti-plagiarism software, and excessive reproduction of previously published text will result in rejection of manuscripts without review. Further information can be obtained from: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#writing-an-article> Submission to more than one journal is a very serious breach of publication ethics and such papers will be rejected, as would be use of other authors' work or even your own without reference citation. Further information can be obtained from: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#writing-an-article> When using human or animal subjects, protocols as well as permission details must be provided. Further information can be found at: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#conducting-research>

Identification of procedures from other work must be provided in the text. Simple reference to a previous paper is insufficient and makes the paper a dependent one. For full papers the usual length is 7500 words (excluding references) with no more than 8 illustrations (tables plus figures). For short communication, 2500 words (excluding references) and a maximum of 4 illustrations (tables plus figures) is permitted. For review articles, it is best to keep them at 10,000-12,000 (excluding references) words. The usual number of references for full papers is about 40, for short communication 20-25 and for reviews may vary but usually up to 150. All tables, figures should be understandable without reference to the text and be able to stand alone; abbreviations must therefore be defined in table headings / footnotes and figure captions. Abbreviations should also be fully defined on first use in the abstract and the main text. The style of the Journal of Functional Foods for referencing, both in the text and at the end must be strictly followed. Please avoid using words that are not usually used or abbreviations that are confusing. Authors must define the starting materials and details of bioactives

responsible for the observed effects, both by identifying and quantifying them. Structure-activity relationships discussion is essential in most cases. All suppliers and manufacturers should be given with addresses (city, state or province and country), in the first place they appear. When responding to the queries in your paper by including explanations in the accompanying letter, please note that these are not seen by the readers of your paper when published. It is therefore essential that you include the relevant parts of such matters in the text of your manuscript, and identify the specific changes in revised manuscripts by line number and also colour highlighted if possible. When reporting oxidation, please note that the thiobarbituric acid (TBA) test or kits measuring it, do not provide evaluation of malondialdehyde (MDA). However, results are expressed as MDA equivalents. MDA may be determined using HPLC. Please use triacylglycerol, diacylglycerol and monoacylglycerol and not triglyceride, diglyceride and monoglyceride, respectively. The editor-in-chief or associate editors should not be contacted for purposes of the review process or otherwise unless there is a special circumstance. Problems associated with submission and technical issues should be addressed to Elsevier's staff. For retrieving of password and other related issues, you also need to contact the on-line service of Elsevier and not the editors. For assistance please visit: <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>

Types of paper

Original research articles, review papers, perspective commentaries and opinion pieces, and rapid communications.

Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and which should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 8 tables and illustrations). Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). Perspective commentaries and opinion pieces - These should be concise, on hot topics and describe cutting-edge developments and technologies. They should not exceed 2000 words. Rapid communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3550**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

The suggested reviewers should not come from the same institute, and should not all come from the same country.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
- 5) is poorly written.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Authors must provide details about their starting material, the source, the bioactive components responsible for the observed effects and changes in their content upon processing.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstracts should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10

names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the [PubChem CID](#) of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

[More information.](#)

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit "billion" is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Formulae must be typewritten, each on a separate line. Leave ample space around the formulae. Subscripts and superscripts should be clear. All symbols used in the formulae should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference

between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter I. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. All equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$. In chemical formulae, valence of ions must be given as e.g. Ca^{2+} and CO_3^{2-} , not as Ca^{++} or CO_3^{--} . Isotope numbers should precede the symbols, e.g. 18O. The repeated writing of complicated chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound followed by its abbreviation (ethylene-diamine-tetraacetic acid, EDTA) should be given in full. The abbreviation is to be used in the case of a very long name or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-functional-foods>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

RESEARCH DATA

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases.](#)

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available.](#) Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

R code viewer

You can enrich your online article by including R code and underlying data sets, which will be displayed in your article on ScienceDirect. All R code and data files should be submitted as part of a single ZIP file. This ensures the code and data files that depend on each other are stored and made available together. R code should be saved as a plain text ASCII file. In your manuscript, you can indicate where the material should appear in the article, by including a note such as "Insert file Rcode.ZIP here". When your article is published on ScienceDirect, readers will be able to interactively explore highlighted R code next to the article page. [More information.](#)

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions.](#)

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO 2 – Normas da revista Journal of Medicinal Plants Research

JMPR - Instructions for Authors

[Introduction](#)

[Research ethics](#)

[Reporting guidelines](#)

[Preparing your manuscript](#)

[Title](#)

[Abstract](#)

[Abbreviations](#)

[The Introduction](#)

[Materials and methods](#)

[Results and discussion](#)

[Declaration of conflict of interest](#)

[Acknowledgments](#)

[References](#)

[Tables and figures](#)

[Acceptance Certificate](#)

[Payment of manuscript handling fee](#)

[Proofs](#)

[Publication](#)

[Publication Notification](#)

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) [Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects](#).

Studies involving non human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the [Animal Welfare Act](#), [The Animals \(Scientific Procedures\) Act \(Amendment\) Order 1993](#), [The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes](#), [ARRP policies and guidelines](#), etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

See additional [guidelines for reporting of health research](#).

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the [IMRAD structure](#).

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in [unstructured or structured format](#). The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Baumert J, Kunter M, Blum W, Brunner M, Voss T, Jordan A, Klusmann U, Krauss S, Neubrand M, Tsai YM (2010). Teachers` mathematical knowledge, cognitive activation in the classroom, and student progress. Am. Educ. Res. J. 47(1):133-180.

<http://dx.doi.org/10.3102/0002831209345157>

Christopoulous DK, Tsionas EG (2004). "Finacial Development and Economic Growth: Evidence from Panel Unit Root and Cointegration Tests" J. Dev.Econ. pp.55-74

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdeveco.2003.03.002>

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. Pediatric. Emerg. Care 17:130-131.

<http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. J. Laryngol. Otol. 115:648-649.

<http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the [manuscript management system](#), the payment option is only enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

We welcome manuscripts edited by the following organizations:

JOURNALS CONSORTIUM (www.journalsconsortium.org)

EDITAGE (www.editage.com)

BIOEDIT (www.bioedit.co.uk)

NARVAN (www.banarvan.com)

ANEXO 3 – Normas da revista Brazilian Journal of Botany

23/01/2017

Braz. J. Bot. - Instructions to authors



ISSN 1806-9959 versão online

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope](#)
- [Preparation of manuscripts](#)
- [Instructions to the Authors](#)

Scope

The **Brazilian Journal of Botany** is a periodical published by the Sociedade Botânica de São Paulo - SBSP reporting the results of original botanical research written in **English**.

Preparation of manuscripts

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication in any other journal; that its publication has been approved by all of the co-authors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work was carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation. Authors are responsible for all the informations contained in their papers.

The complete manuscript (including figures and tables) must be sent to the Editor-in-Chief online (<http://submission.scielo.br/index.php/rbb/index>). All manuscripts are peer-reviewed, and their acceptance depends on the decision of the Editorial Board. Manuscripts should only contain information essential to understanding their content. Articles longer than 15 printed pages (approximately 30 typed pages, including figures and tables) may be published at the discretion of the Editorial Board, **although the author(s) will be charged for extra pages. The costs of color figures in the printed version, if approved by the Editorial Board, will also be charged to the author(s).** Colour art is free of charge for online publications. Scientific notes should represent original contributions to scientific research. Instructions for organizing scientific notes are the same as described for complete articles; they should not exceed 10 typed pages including up to three figures or tables. Review papers can be solicited by the Editorial Board.

Instructions to the Authors

The Brazilian Journal of Botany (BrazJBot) is a periodical published by the Sociedade Botânica de São Paulo (SBSP) reporting the results of original botanical research as complete articles or scientific notes in English. Either British English or American English spelling and terminology may be used, but must be consistent throughout the text.

Manuscripts should be double-spaced throughout, with consecutive page numbering. Use Word for Windows 2000 (or later versions), font Times New Roman, size 12. Place only one space between words and do not hyphenate them at the end of a line. Do not use tabulation (Tab key)

<http://www.scielo.br/revistas/rbb/instruc.htm>

1/4

23/01/2017

Braz. J. Bot. - Instructions to authors

except at the beginning of each paragraph. Do not use bold or underline (except in subtitles). Restrict italics to scientific names, descriptions or diagnosis of new taxa, the names and numbers of collectors, and for genetic or statistical symbols.

Manuscript format

First page - Title: concise and informative (in bold); authors' full names (in capital letters); affiliation, complete address, corresponding author and respective e-mail, all as footnotes; running title.

Second page - **ABSTRACT** (include title), Key words (up to 5, in alphabetical order without repeating any title words).

Text - Start a new page each according to the following sequence of items: **INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, and REFERENCES**. Acknowledgements should be placed before the references.

First-level headings - capitalize the first letter, bold, not centered.

Second-level headings- italic, bold, same font as the first-level heading, followed by the text on the same line but separated by dash (-).

Do not use third-level headings.

Cite each figure and table in the text in numerical order.

Present references according to the following examples:
Smith (1960) or (Smith 1960); Smith (1960, 1973); Smith (1960a, b); Smith & Gomez (1979) or (Smith & Gomez 1979); Smith et al. (1990) or (Smith et al. 1990); (Smith 1989, Liu & Barros 1993, Araujo et al. 1996, Sanches 1997).

In taxonomic papers, cite botanical material in detail in the following sequence: place and date of collection, collector's name and number, and herbarium abbreviation, according to the samples below: BRAZIL. Mato Grosso: Xavantina, s.d., *HS Irwin s.n.* (HB3689). São Paulo: Amparo, 23-XII-1942, *JR Kuhlmann & ER Menezes 290* (SP); Matão, BR 156, 8-VI-1961, *G Eiten et al.* 2215 (SP, US).

All other papers should cite vouchers.

Authors of scientific names of vascular plants should be abbreviated according to IPNI (<http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>). Species author(s) name(s) should be included when first mentioned in the text; in the title only when essential. Abbreviations of original works on taxonomy must follow BPH.

References to unpublished results or submitted papers should appear as follows: (SE Sanchez, unpublished data).

Provide numbers and units as follows:

- Numbers up to nine should be written in full, except if followed by units, or if indicating tables or figures (Examples: 21 L, 20.32 mg, Table 1).

- Separate units from values by placing a space (except for percentages, or geographical degrees, minutes and seconds); use abbreviations whenever possible.

- For compound units, use exponentiation, not slash (Example: mg day⁻¹ instead of mg/day, $\mu\text{mol min}^{-1}$ instead of $\mu\text{mol/min}$).

Do not insert spaces to move to the next line if the unit does not fit into the same line. **Do not insert figures into the text file.**

References

Adopt the format used in the examples as follows:

Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. 4th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River.

Yen AC, Olmstead RG. 2000. Phylogenetic analysis of *Carex* (Cyperaceae): generic and subgeneric relationships based on chloroplast DNA. In Monocots: systematics and evolution (KL Wilson, DA Morrison, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, p.602-609.

Bentham G. 1862. Leguminosae. Dalbergiae. In Flora brasiliensis (CFP Martius, AG Eichler, eds.). F. Fleischer, Lipsiae, v.15, pars 1, p.1-349.

Döbereiner J. 1998. Função da fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas e sua importância no ecossistema brasileiro. In Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros (S Watanabe, coord.). Aciesp, São Paulo, v.3, p.1-6.

Farrar JF, Pollock CJ, Gallagher JA. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. Plant Science 154:1-11.

Punt W, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A. 1999. Glossary of pollen and spore terminology. <http://www.biol.ruu.nl/~palaeo/glossary/glosint.htm> (accessed 2003 Apr 10).

Cite dissertations or theses **only in exceptional cases**, when the information provided is essential for a better understanding of the paper, and when the information has not been published as a scientific paper. In this case, use the format below:

Sano PT. 1999. Revisão de *Actinocephalus* (Koern.) Sano - Eriocaulaceae. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Do not cite meeting abstracts.

Tables

Use Word for Windows design resources and table formatting.

Avoid abbreviations (except for units).

Tables should be placed on separate pages, with their titles positioned above them, according to the example:

Table 1. Total flavonoids and total phenol production (% of dry mass) in leaves of *Pyrostegia venusta*.

Do not insert vertical lines; use horizontal lines only to stress the header and close the table.

Figures

Submit a set of high-resolution original figures. Send digital images with a minimum of 300 dpi. Send the original file (in a CorelDraw, Photoshop, or similar format) as well as a .tif file of each digital image. The space available for plates (photographs, drawings, charts, maps, or diagrams) is 23.0 × 17.5 cm at most, including when possible the space required for the legend. Any figure exceeding these dimensions will be resized. These should never be attached to MS Word or Power Point files. Charts or other figures may be reduced to fit into a single column (8.5 cm); therefore, be sure that the numbers or font sizes will remain visible even after reduction. The font type and size of both the legends and charts should be the same as used in the text. Charts and figures made using Excel spreadsheets must be accompanied by the file with the original sheet. Each plate must appear on a separate page. Type all figure legends together (numbered sequentially) on another page. Use bar scales to indicate size. Bar scales should be placed at the bottom of the page on the left hand side. The right hand side should contain the figure number. Avoid the use of letters that are used for internal legends. Failure to correctly follow these instructions concerning illustrations may result in poor quality figures in the printed version; in such cases, the Editorial Board can decide on their elimination or the rejection of manuscripts already accepted. Each figure should have a concise caption accurately describing what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Permission

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both printed and online formats, and to include evidence that such permission was granted when submitting their papers. Any material received without these qualifications will be assumed to be original.

Additional information

Details of manuscript organization can be found in the final pages of every journal issue. For further information, refer to the journal's latest issue. The authors will only be informed of the final acceptance of a paper after its approval by the Editorial Board, both in terms of scientific merit and graphic format. For further information please contact us: brazibot@gmail.com

[\[Home\]](#) [\[About the journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscriptions\]](#)



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons License

Sociedade Botânica de São Paulo
Caixa Postal 57088, CEP 04089-972
São Paulo, SP - Brazil
Tel.: +55 (11) 5067-6059



rbbot@iq.com.br

ANEXO 4 - Resultados da análise de lipídios da polpa dos frutos, realizado no laboratório da UNIANÁLISES


UNIANÁLISES
 LABORATÓRIO DE ANÁLISES
 E PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS
 UNIVATES



LABORATÓRIO DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS (Bromatologia)

RELATÓRIO DE ENSAIO

RELATÓRIO Nº: 10515/2016-A
Interessado: Fuvates - Propagação de espécies vegetais nativas regionais de importância econômica e ambiental
Endereço: Av. Avelino Tallini, 171 - Lajeado - RS \ Brasil
Nº fiscal:

Material analisado: Polpa Data de recebimento: 17/06/2016 Hora do recebimento: 14:30 Data de validade: não informado Temperatura no recebimento: 12,0 °C Peso da amostra: 334 g	Marca: não informado Lote: não informado Lacre: não informado Data de remessa: 17/06/2016 Data de fabricação/produção: não informado Condições de recebimento: sob refrigeração
--	--

Amostragem: Data de amostragem: 17/06/2016 Hora da amostragem: 11:30 Responsável pela amostragem: não informado Classe/ tipo de amostra: não informado	Temperatura da amostra: não informado Temperatura ambiente: não informado Local da amostragem: não informado Condições ambientais: não informado Plano de amostragem: não aplicável
---	--

Declaramos que:
 Quando a amostragem é realizada pelo laboratório, a mesma segue o procedimento PR- UNI085.
 Quando o cliente é responsável pela amostragem, este recebeu instruções de amostragem conforme o DC -UNI082.

RESULTADOS:

Ensaio	Resultados	*Limite de Tolerância (*)	*Limite de detecção/quantificação	Incerteza de Medição	Período Ensaio	Metodologia
FQ 058 - Lipídeos (Mojonnier)	<1,0 g/100 g	-	1,0 g/100 g	-	30/06/2016	AOAC. Official Methods of Analysis (2012). Method 920.177, Cap. 44, p. 24.

Condição de realização do(s) ensaio(s): T: 15 - 25 °C UR: 35 - 80 %

*Limite de tolerância: É a tolerância máxima aceitável para amostra indicativa ou, quando for o caso, representativa conforme estabelecido pela legislação utilizada.
 *Limite de detecção/quantificação: É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado.
 (*) Legislação: Não aplicável

OBS:
Este relatório de ensaio substitui o original de nº 10515/2016.

Resultado menor que o Limite de detecção:
 Via 1 = 0,12 g/100 g
 Via 2 = 0,12 g/100 g

Interpretação: Não aplicável

Os resultados restringem-se à amostra entregue no Laboratório, e a reprodução parcial deste relatório somente será possível com a autorização prévia do Laboratório responsável.

FIM

Assinado digitalmente por:

Rodrigo Giovanella
Gerente Técnico Substituto
CRQ - 05202449

Lajeado, 21 de Julho de 2016

RE – UNI002 Relatório de Ensaio, revisão 17, página 1 de 1

UNIANÁLISES
 Rua Avelino Tallini, 171 | Bairro Universitário | Lajeado | RS | Brasil
 CEP 95900-000 | Prédios 5 e 6 da Univates | Fone: (51) 3714-7027
 unianalises@univates.br | www.unianalises.com.br



TECNOVATES
 PARQUE CIENTÍFICO
 E TECNOLÓGICO
 UNIVATES



UNIVATES

Digitally signed by RODRIGO GIOVANELLA; DN: cn=RODRIGO GIOVANELLA, o=UNIVATES, ou=Lajeado, c=BR; Date: 2016.07.21 18:16:02 -03'00';
 Autenticação: http://www.univates.br/sistemas/ass Cod: MD2MEWMYNTUX
 Localização: BR

ANEXO 5 - Resultados da análise de fibra dos frutos, realizado no laboratório da EUROFINS



Laboratório Alac Ltda.
Rua David Sarton, 601
Baixo Alameda
CEP 96720-000 - Garibaldi - RS
Tel: (51) (54) 3388 3232
Fax: (51) (54) 3388 3200
alac@eurofins.com.br
www.eurofins.com.br

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 66386/2016

CONTRATANTE: Elisete Maria de Freitas
ENDEREÇO: Av. Avalino Tallini, 171 - Universitário - Lajeado/RS
DATA DA COLETA: Não consta
RESPONSÁVEL PELA COLETA: Coleta realizada pelo solicitante
DATA E HORA DO RECEBIMENTO: 05/08/2016 10:02:05
PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS: 08/08/2016 a 18/08/2016

DADOS DO PRODUTO

PRODUTO: Polpa de Fruta
DESCRIÇÃO/EMBALAGEM: Amostra líquida recebida em embalagem plástica transparente. Cor aparente da amostra: vermelho
QUANTIDADE DE AMOSTRA RECEBIDA: 2 embalagens - 475g
DATA DE FABRICAÇÃO: Não consta
DATA DE VALIDADE: Não consta
LOTE: Não consta

RESULTADOS

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS		
DESCRIÇÃO DO ENSAIO	RESULTADO	UNIDADE
Fibra alimentar total	5,02	g/100g

MÉTODOS ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS
Fibra alimentar total: AOAC INTERNATIONAL. Total, Soluble and Insoluble Dietary Fiber in Foods: Method 991.43 (PNT007-AL)

Considerações Finais

Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam exclusivamente à amostra ensaiada. O relatório de ensaio só deverá ser reproduzido na íntegra, não deve ser parcialmente reproduzido sem a prévia autorização do Laboratório Alac.

Garibaldi, 18 de agosto de 2016

Código de Assinatura Eletrônica: 41D7B33C1973B13ABDE5E79C004C7C70

Marina Salvadori Possebon
Engenheira de Alimentos
CREA-BA 050931774-0

Laboratório Alac Ltda.
CNPJ 94.088.952/0001-52
I.E. 0500032886

01 de 01