

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CAMPUS CURITIBANOS
JULIO CESAR SBARDELLA DALLORSOLETA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS FRUTOS DE
AMOREIRA-PRETA (*Rubus* spp.)**

Curitibanos
2019

JULIO CESAR SBARDELLA DALLORSOLETA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS FRUTOS DE
AMOREIRA-PRETA (*Rubus* spp.)**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Greicy Michelle Marafiga Conterato.

Curitibanos
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dallorsoleta, Julio Cesar Sbardella
Avaliação do potencial antioxidante in vitro dos frutos
de amoreira-preta (*Rubus spp.*) / Julio Cesar Sbardella
Dallorsoleta ; orientador, Greicy Michelle Marafiga
Conterato, 2019.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Atividade antioxidante. 3. Compostos
bioativos. 4. Amoreira-preta. 5. Metodologia de extração.
I. Conterato, Greicy Michelle Marafiga. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III.
Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2176 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

ACADÊMICO

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* dos frutos de amoreira-preta (*Rubus* spp.)

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 27 de junho de 2019.

Prof. Dra. Elis Borcioni
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Greicy Michelle M. Conterato
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Karine Louise dos Santos
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Luciano Picoletto
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTO

A todos os profissionais e colegas que me auxiliaram durante o período de graduação e nos momentos de necessidade. Sem eles isto não estaria se concretizando.

Ao Programa Institucional de Iniciação Científica e Tecnológica (PIICT) da UFSC e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica (PIBIC) concedida para a realização deste trabalho durante a minha iniciação científica.

RESUMO

A amoreira-preta (*Rubus* spp.) é uma espécie frutífera exótica com importante potencial econômico para a agricultura familiar. Além disso é fonte de compostos bioativos com propriedades benéficas à saúde humana. Desde 1970, tem sido inserida em programas de melhoramento genético, os quais podem contribuir para o incremento dos teores de compostos bioativos e do potencial biológico dos seus frutos. O preparo de extratos a partir dos frutos é importante para a avaliação dos teores dos compostos bioativos e da atividade antioxidante, sendo o método de extração um fator muito importante para a melhor recuperação desses parâmetros. Assim, este estudo avaliou inicialmente, o efeito de diferentes métodos de extração sobre os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* dos frutos de amoreira-preta cultivados na região de Curitiba -SC. Posteriormente, utilizou-se o método de extração escolhido para avaliar o teor de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* dos frutos de cinco diferentes genótipos: cultivares Xavante, Tupy, BRS Xingu e seleções avançadas Black 145 e Black 178. Dos seis diferentes métodos de extração utilizados, os melhores para a recuperação de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram os que utilizaram solvente etanólico (etanol 99°GL) à temperatura de 50°C ou o solvente hidroalcoólico (etanol 96°GL) com ou sem acidificação. Na segunda etapa do estudo, utilizando somente a extração com o solvente hidroalcoólico (etanol 96°GL) acidificado, observou-se que a cultivar Xavante apresentou o maior teor de compostos fenólicos e antocianinas e potencial antioxidante nos métodos de avaliação do potencial redutor de ferro (FRAP) e de remoção do radical DPPH. Esses dados *in vitro* demonstram a importância do uso de solventes etanólicos ou hidroalcoólicos para a obtenção de melhor potencial antioxidante da amoreira-preta e sugerem um possível maior potencial biológico da cultivar Xavante em relação aos demais genótipos. Porém, há ainda a necessidade de se corroborar o potencial biológico dos genótipos avaliados em estudos *in vivo* futuros.

Palavras chave: Amora-preta. Cultivar. Genótipos. Compostos bioativos.

ABSTRACT

Blackberry tree (*Rubus* spp.) is an exotic fruit species with significant economic potential for family farming. It is also a source of bioactive compounds with beneficial properties to human health. Since 1970, it has been inserted in breeding programs, which can contribute to the increase of bioactive compounds content and the biological potential of their fruits. The preparation of extracts from the fruits is important for the evaluation of bioactive compound content and the antioxidant activity, being the extraction method a very important factor for the better recovery of these parameters. Thus, this study initially evaluated the effect of different extraction methods on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant activity of fruits of blackberry tree grown in the region of Curitibanos - SC. Afterwards, it was used the extraction method chosen to evaluate the bioactive compounds content and the *in vitro* antioxidant activity of the fruits of five different genotypes: Xavante, Tupy, BRS Xingu cultivars and advanced selections Black 145 and Black 178. From six different extraction methods, the best for the recovery of phenolic compounds and antioxidant activity were those that used ethanolic solvent (99°GL ethanol) at 50°C or the hydroalcoholic solvent (96°GL ethanol) with or without acidification. In the second stage of the study, using only the extraction with hydroalcoholic solvent (ethanol 96°GL), it was observed that Xavante cultivar presented the highest phenolic compounds and anthocyanin content and antioxidant potential in the methods of evaluation of the iron reducing potential (FRAP) and of DPPH radical scavenging. These *in vitro* data demonstrate the importance of the use of ethanolic or hydroalcoholic solvents to obtain a better antioxidant potential from blackberry and suggest a possible greater biological potential of the Xavante cultivar in relation to the other genotypes. However, there is still a need to corroborate the biological potential of the genotypes evaluated in further *in vivo* studies.

Key words: Blackberry. Cultivar. Genotypes. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Amoreira-preta (<i>Rubus</i> spp.) em sistema de condução.....	16
Figura 2- Frutos de amoreira-preta (<i>Rubus</i> spp.) logo após a colheita.....	19
Figura 3- Frutos de amoreira-preta (<i>Rubus</i> spp.).....	20
Figura 4- Estádios fenológicos da cultivar Tupy	21
Figura 5- Demonstração de formação de EROs	23
Figura 6- Antioxidantes enzimáticos.....	24
Figura 7- Modelo estrutural básico dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos	25
Figura 8- Estrutura química das principais classes de flavonoides.....	26
Figura 9- Estrutura química básica das antocianinas.....	26
Figura 10- Estrutura das diferentes antocianidinas.....	27
Figura 11- Alteração na estrutura química das antocianinas por variação de pH.....	28
Figura 12- Teor de compostos fenólicos totais em seis diferentes extratos dos frutos de amoreira-preta (<i>Rubus</i> spp.).....	40
Figura 13- Teor de compostos fenólicos totais (A) e de antocianinas monoméricas totais (B) em extratos dos frutos de cinco diferentes genótipos de amoreira-preta...45	45
Figura 14- Atividade antioxidante <i>in vitro</i> . (A) Potencial redutor de ferro e (B) Atividade sequestrante de DPPH de extratos dos frutos de cinco diferentes genótipos de amoreira-preta.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área total produtora das principais frutas no Brasil, de acordo com o clima.....	18
Tabela 2. Principais Estados produtores de amora-preta no Brasil.....	19
Tabela 3. Atividade removedora do DPPH para os 6 extratos de <i>Rubus</i> spp.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMT – Antocianinas Monoméricas Totais
CAT – Catalase
DCNTs – Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DPPH 1,1 – Difenil-2-picril-hidrazila
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária
ERs – Espécies Reativas
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
ET – Equivalente de Trolox
FRAP – Potencial Antioxidante Redutor de Ferro
GAE – Equivalente de Ácido Gálico
GPx – Glutathione Peroxidase
GR – Glutathione Redutase
ha – Hectare
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAFRA – Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal
RPM – Rotações por minuto
SOD – Superóxido Dismutase
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 JUSTIFICATIVA	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Rubus</i> spp.	16
2.1.1 Origem	16
2.1.2 Produção	17
2.1.3 Características físico-químicas, nutricionais, fenológicas e ações biológicas	19
2.2 ESPÉCIES REATIVAS, ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO COM AS DOENÇAS HUMANAS.....	22
2.3. COMPOSTOS BIOATIVOS.....	24
2.3.1 Fenólicos	25
2.3.2 Antocianinas	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 DIVISÃO DE ETAPAS.....	31
3.2 LOCAL E DATA.....	31
3.3 VARIEDADES UTILIZADAS.....	
3.4 CONSERVAÇÃO DOS FRUTOS	32
3.5.1 Extrato aquoso (suco integral)	33
3.5.2 Extrato etanólico (extraído à 26°C)	33
3.5.3 Extrato etanólico (extraído à 50°C)	34
3.5.4 Extrato etanólico (extraído à 26°C e acidificado)	34
3.5.5 Extrato hidroetanólico (extraído à 1°C)	34
3.5.6 Extrato hidroetanólico (extraído à 1°C e acidificado)	34
3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	35
3.6.1 Determinação de fenólicos totais	35
3.6.2 Determinação de antocianinas monoméricas	36
3.6.3 Potencial redutor de ferro	36
3.6.4 Atividade sequestrante do radical DPPH	37
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 ETAPA 1.....	39

4.1.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante	39
4.2 ETAPA 2.....	44
4.2.1 Compostos fenólicos e antocianinas	44
5 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) presentes no Anuário Brasileiro de Fruticultura de 2014, o Brasil é o terceiro país entre os maiores produtores mundiais de frutas, ficando atrás apenas da China e da Índia (FAO, 2017). O Rio Grande do Sul, com a primeira colocação e São Paulo, com a segunda, são os estados responsáveis por mais de 80% da área total cultivada no Brasil de amoreira-preta (*Rubus* spp.), e os demais 20%, se dividem entre os estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo (FAOSTAT, 2016).

Segundo os autores Attilio et al. (2009), Fachinello et al. (2011), Jacques e Zambiasi (2011), Yanamoto et al. (2013), o acréscimo de renda per capita é um dos principais fatores que influencia no incremento da produção de fruticultura nacional, uma vez que o aumento do poder aquisitivo e a adesão aos hábitos saudáveis relacionados à maior procura de alimentos que tenham em sua composição elementos funcionais, acompanham o aumento do consumo de frutas e verduras. Além disso, estudos indicam que a prática de atividades físicas e a adoção do consumo de frutas e verduras está atrelado à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) como o câncer, diabetes, doenças hipertensivas, doenças cardiovasculares, bem como ao fortalecimento do sistema imunológico (KEY et al., 2004; TANDON et al., 2008; AICR, 2013; INCA, 2014; KHANNA et al. 2014).

A origem e a progressão das DCNTs estão associadas ao estresse oxidativo causado pela produção excessiva de espécies reativas (ERs) nas células, e portanto, a sua prevenção está associada à ingestão de vegetais e frutas ricos em compostos antioxidantes, também conhecidos como compostos bioativos (WAHLQVIST et al., 2013). Esses compostos derivados de plantas (polifenóis, flavonoides, carotenóides, etc) têm despontado como excelentes alternativas com potencial dietético e/ou terapêutico nas doenças associadas à má alimentação.

Neste sentido, os frutos da espécie vegetal *Rubus* spp. (amoreira-preta) possuem compostos bioativos que estão relacionados à qualidade da amora-preta, e que também são reconhecidos por apresentar propriedades antioxidante, anti-mutagênica e antitumoral em alguns tipos de cânceres (TAVARES et al., 2012). Evidências científicas demonstram que a casca da raiz de amoreira branca (*Morus*

alba) também possui atividade anticancerígena e anti-inflamatória (ZENI et al., 2010; CHEN et al., 2013; EO et al., 2014).

Em razão de sua alta produtividade e do baixo custo de implantação e de manutenção, a amoreira-preta é uma espécie exótica com importante potencial econômico para a agricultura familiar (FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010). Desde 1970, tem sido inserida em programas de melhoramento genético no Brasil pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), com o objetivo de proporcionar melhor adaptação ao cultivo e ao consumo no Brasil (PEREIRA et al., 2013; ANTUNES et al., 2014). Neste sentido, cada espécie tem um local de ótimo desenvolvimento, com exigências edafoclimáticas específicas, sendo possível a expressão do seu potencial produtivo de forma integral apenas nos locais de melhor adaptação. Logo, por inferir que o Brasil em sua extensão territorial possui características climáticas adversas (PBMC, 2016), a informação nutricional, química e funcional presente em diferentes espécies pode ser um dos fatores de escolha no momento de implantação da cultura (BOWEN-FORBES et al., 2010; TAVARES et al., 2012). Além disso, práticas de melhoramento genético em frutíferas podem resultar também em aumento do teor de compostos bioativos, bem como de sua qualidade nutricional e de seu potencial biológico (CAPOCASA et al., 2008; TORMA et al., 2017).

Adicionalmente às práticas de melhoramento genético, outro fator importante que pode resultar em diferentes teores de compostos bioativos e da atividade antioxidante de frutas de diferentes genótipos, é o método extrativo utilizado para a obtenção dos extratos. Neste sentido, o tempo e a temperatura de extração, bem como os tipos e proporções de solventes utilizados impactam diretamente nos teores e nos perfis de compostos obtidos, bem como na atividade antioxidante (KRAUZE-BARANOWKA et al., 2014; BARBI, 2016; SANTOS et al., 2017).

Considerando a importância da agricultura familiar para a economia do município de Curitiba e região, bem como o potencial econômico da amoreira-preta para esta atividade, este estudo buscou avaliar o potencial antioxidante dos frutos de cinco diferentes genótipos da amoreira-preta obtidos por melhoramento genético e cultivados em Curitiba – SC.

1.1 JUSTIFICATIVA

A geração de renda nas propriedades a partir da agricultura familiar é um desafio constante, tanto pela alta competição com outros produtos de origem animal e vegetal, já inseridos por questões tradicionais e culturais, como pela dificuldade em unir a diminuição dos impactos ambientais causados pelos métodos de manejo convencionais adotados, ao ganho de capital do produtor (ANTUNES, 2002). Com o aumento da procura por alimentos com qualidade nutricional e funcional, abre-se espaço para frutíferas como a amoreira-preta. Essa espécie vegetal possui potencial produtivo e qualitativo, pois depende de manejo menos intensivo e agressivo ao meio ambiente, uma vez que apresenta características de resistência e adaptação ao clima temperado, bem como altos valores nutritivos contendo atividade funcional (FACHINELLO et al., 2011). Dessa maneira a geração de informação de qualidade oriunda de pesquisas, é necessária para que se agregue valor à esses produtos, permitindo o incremento na oferta de empregos e inserção de pequenos produtores no fomento do mercado consumidor.

Além disso, os dados provenientes de pesquisas sobre o potencial funcional da amoreira-preta podem auxiliar no desenvolvimento de medicamentos e incentivar o consumo de frutos na forma *in natura* ou até mesmo processados. O consumo de frutos ricos em compostos fenólicos é de extremo interesse, pois os mesmos agem no combate e prevenção de doenças oriundas de um desequilíbrio no organismo decorrente da ação de radicais livres e denominado estresse oxidativo (ALLEN; TRESINI, 2000). Esse por sua vez, inicia ou agrava patologias como o câncer e as doenças cardiovasculares. Estudos anteriores com a espécie de amoreira *Rubus brasiliensis* comprovaram que além de nutrientes e minerais na sua composição química, está presente o ácido elágico ($C_{14}H_6O_8$), derivado do ácido gálico, que possui propriedades anticancerígena, antioxidante e anti-mutagênica (ANTUNES, 2004), o que incentiva ainda mais estudos sobre outras espécies de amoreira. Ainda não existem estudos prévios sobre a quantificação de compostos bioativos e atividade antioxidante dos genótipos de amoreira-preta (*Rubus* spp.) cultivados em Curitiba – SC. Esses estudos são de grande relevância, pois podem agregar valor à produção e comercialização dos frutos e processados, aumentando assim, o interesse por parte dos produtores, comerciantes e dos consumidores locais e regionais em relação à essa espécie frutífera.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Quantificar compostos bioativos como os fenólicos e antocianinas monoméricas totais (AMT), e avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos frutos de cinco diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* spp.) provenientes de programas de melhoramento genético e cultivados na região do município de Curitiba – SC.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Definir o melhor método para a extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* de extratos obtidos de uma mistura dos frutos de cinco genótipos de amoreira-preta (*Rubus* spp.);
- Após a definição do método de extração, quantificar o teor de fenólicos e AMT, bem como avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos obtidos a partir dos frutos de cada um dos cinco diferentes genótipos da amoreira-preta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Rubus* spp.

2.1.1 Origem

A amoreira-preta é uma planta arbustiva que pode possuir porte ereto ou rasteiro (Figura 1), pertencente à família das Rosáceas (Rosaceae), do gênero *Rubus*, o qual abrange em torno de 740 espécies (SANTOS; BASSOLS; MADAIT, 1997). O centro de origem da amoreira-preta (*Rubus* spp.) não é definido como apenas em um local, podendo ser considerado oriundo da Europa, da América do Norte e até mesmo da América do Sul (SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009). Segundo Raseira (2004), estima-se que existam aproximadamente 740 espécies de amoreira-preta no mundo, podendo estar classificadas em até 15 subgêneros diferentes.

Figura 1. Amoreira-preta (*Rubus* spp.) em sistema de condução



Fonte: Abê, (2018)

Além da amoreira-preta, existem estudos envolvendo a amoreira-branca (*Morus alba* L.) e a amoreira-miúra (*Morus nigra* L.) ambas da família Moraceae. O centro de origem de ambas é o extremo oriente, China, sendo dispersas por todas as regiões do globo terrestre que apresentam até dois mil metros de altitude, sendo cultivadas em clima temperado quente, mediterrâneo, tropical e sub-tropical. Ambas tem registros de utilização na medicina Chinesa (PAWLOWSKA; OLESZEK; BRACA, 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Os frutos de amoreira-miúra também são

conhecidos como amora-preta, sendo que normalmente, os suplementos alimentares à base de amora-preta não especificam a espécie utilizada, e portanto, não se sabe se as propriedades funcionais do fruto são atribuídas às amoras do gênero *Rubus* ou *Morus* (ANVISA, 2018).

A amoreira-miúra é uma árvore que pode atingir 5 metros de altura, possui tronco de cor escura e casca rugosa, suas folhas chegam a 16 centímetros de comprimento, possui flores pequenas branco-amareladas, e tem frutos negros quando maduros. Difere da *Rubus* fenológica e fisiologicamente, uma vez que seu porte é arbustivo podendo ser ereta ou rasteira (SANTOS; BASSOLS; MADAIT, 1997). A espécie está dispersa pelo território brasileiro, porém seu principal centro de dispersão é o Vale do São Francisco (ALMEIDA, 2011; ARAUJO, 2015).

No Brasil, apesar de haver a ocorrência de espécies nativas de amoreira-preta do gênero *Rubus*, tais como a *R.urtieaeifolius*, *R.erythroclados*, *R. brasiliensis*, *R.sellowiie* e *R. imperialis*, a maioria dos cultivos dessa planta utiliza cultivares oriundas de cruzamento de espécies nativas dos Estados Unidos (ANTUNES et al., 2014).

2.1.2 Produção

Segundo dados levantados pelo IBGE, o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial dos países que representam as maiores produtividades de frutas, representadas em milhões de toneladas por ano. De acordo com Santos, et al. (2014), a produção nacional de frutas no ano de 2011 chegou a 44,955 milhões de toneladas. A China é responsável pela maior produção mundial, com aproximadamente 214,478 milhões de toneladas, seguida pela segunda colocada, Índia, que alcançou valores de 87,360 milhões de toneladas anuais de produção frutífera.

Dentro do país, pode-se afirmar que as condições edafoclimáticas propiciam uma separação de três grandes climas principais: tropical, subtropical e temperado. Logo, para a produção de espécies frutíferas é necessária a realização de um zoneamento agroclimático de acordo com as necessidades das culturas de interesse e as condições climáticas do local de cultivo (FACHINELLO; NACHTIGAL; KERSTEN, 2011). De acordo com dados do IBGE (2007), em cada clima, existe uma

área estimada de produção das principais frutíferas, como é demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Área total produtora das principais frutas no Brasil, de acordo com o clima.

FRUTAS	ÁREA (ha)
Tropicais	1.034.708
Subtropicais	928.552
Temperadas	135.857
Total	2.099.117

Fonte: Fachinello et al. (2011)

A área de cultivo de espécies frutíferas de clima temperado ainda é muito baixa quando comparada com espécies de clima tropical. O cultivo da amoreira-preta se adapta bem ao clima frio, temperado, de invernos amenos a rigorosos, podendo ser cultivada em regiões em que as horas de frio acumuladas sejam apenas de 200 horas frio, até regiões em que ultrapassem as 1000 horas frio. Entretanto, as mudanças de temperatura e altitude acarretam na alternância de ciclo da cultura, afetando principalmente o estágio de floração, onde uma variação a cada 300 metros a mais de altitude, faz com que a cultura responda com atraso de até dez dias o início do seu florescimento (PAGOT et al., 2007).

Segundo Antunes et al. (2014), o Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de amoreira-preta, com uma área plantada de aproximadamente 239,2 hectares (ha) possuindo quase metade da área total plantada no país que corresponde a aproximadamente 527,8 ha, como demonstra a Tabela 2. São Paulo apresenta a segunda maior área cultivada, e o restante da produção se concentra nos estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo. O fator que impulsiona o acréscimo nas áreas cultivadas e na produção alcançada, segundo Fachinello et al. (2011), é o aumento da renda nacional per capita conciliado ao acréscimo na procura de uma alimentação saudável. Dessa maneira, as frutíferas de clima temperado tendem a ganhar cada vez mais espaço no mercado interno.

Tabela 2. Principais Estados produtores de amora-preta no Brasil.

Estado	Área de produção (ha)
Rio Grande do Sul	239,2
São Paulo	213,5
Minas Gerais	40,0
Paraná	22,1
Santa Catarina	10,0
Espirito Santo	3,0
Total	527,8

Fonte: Antunes et al.(2014)

2.1.3 Características físico-químicas, nutricionais, fenológicas e ações biológicas

Os frutos das diferentes cultivares do gênero *Rubus* são grandes, variando em torno de um peso médio de 6 gramas, possuindo coloração preta (Figura 2) e sabor ácido, porém doce, devido aos teores de sólidos solúveis totais. São frutos consistentes revestidos por uma película resistente, que libera aroma característico do fruto. As sementes dentro dos frutos são pequenas (ANTUNES; RASEIRA, 2004).

Figura 2. Frutos de amoreira-preta (*Rubus spp.*) logo após a colheita.



Fonte: Abê (2018)

Têm ainda como características, alta umidade, teores consideráveis de proteínas, fibras alimentares e sólidos solúveis totais. São frutos que possuem acidez, considerando porcentagem de ácido cítrico e um pH baixo, os quais podem variar entre as cultivares.

Com relação aos valores de composição centesimal dos frutos, o estudo de HIRSCH (2011), feito com diferentes genótipos de amoreira-preta cultivados pela EMBRAPA Clima Temperado de Pelotas (seleções 07/001, 03/001, 02/96 e 99 e cultivares Guarani, Cherokee, Tupy e Xavante), revelou teores de umidade dentro de uma faixa de 84,8 até 90,3%, valores proteicos de 0,09 a 0,14%, fibras alimentares variando menos de 0,3% dentro de uma faixa de 5,5 a 5,8%, e o resultante de cinzas entre 0,27 a 0,49%. Em relação aos sólidos solúveis totais, obteve-se uma variação entre 7,3 a 10,2 °Brix, e o ácido cítrico demonstrou valores entre 1,30 e 1,58%, com pH entre 2,8 e 3,1.

Do ponto de vista nutricional, os frutos de amoreira-preta são ricos em vitamina C, minerais, vitaminas do complexo B e A, água (em torno de 85%) e carboidratos (em torno de 10%), além de conter ácidos graxos essenciais, que são compostos essenciais na regulação de diversas funções do organismo (ANTUNES et al., 2002). Deve-se atentar ao momento de colheita para que os valores nutricionais estejam dentro do esperado. Assim, as alterações na coloração dos frutos auxiliam na identificação do melhor momento para a colheita. Na Figura 3A, observa-se o momento em que o fruto está em ponto de colheita e na 3B, quando ainda não está apto para ser colhido (GONÇALVES et al., 2012).

Figura 3. Frutos de amoreira-preta (*Rubus spp.*) (A) Fruto maduro; (B) Frutos não maduros.



Fonte: Gonçalves et al., (2012)

A coloração dos frutos da amoreira-preta segue um padrão durante seu amadurecimento, logo, os frutos são inicialmente de coloração verde, e conforme atingem sua maturação alteram sua cor para avermelhado e por fim preto, como pode ser observado na Figura 4, que demonstra os estádios fenológicos da amoreira-preta, cultivar Tupy (Adaptado de Antunes, 1999).

Figura 4. Estádios fenológicos da cultivar Tupy: 0: botão floral fechado; 1: botão floral aberto; 2: flor aberta; 3: perda total das pétalas; 4. Inchamento dos frutos; 5: Mudança de coloração dos frutos sem restos florais; 6: Mudança de coloração verde para avermelhado; 7: Fruto totalmente vermelho; 8: Início de escurecimento do fruto; 9: Fruto totalmente preto.



Fonte: Adaptação de Antunes (1999)

Em relação ao cultivo da amoreira-preta, uma das principais problemáticas encontradas é a sua curta vida pós-colheita, por serem frutos frágeis e pouco resistentes a impactos físicos quando comparados com outros frutos, como a cereja por exemplo. Além disso, possuem alta taxa respiratória, o que também diminui sua vida de prateleira. Portanto deve-se ter cuidado com o armazenamento e transporte, de preferência mantendo-se os frutos à uma temperatura próxima à 2°C (ANTUNES, DUARTE FILHO; SOUZA, 2003).

Silva et al. (2014) demonstrou que em um período de armazenamento de até 10 dias à uma temperatura ambiente de 28°C pode ter influência positiva no aumento do número de fenólicos totais da amora-preta, devido ao aumento da taxa respiratória e geração desse produto, elevando sua capacidade antioxidante. Entretanto, o autor não considera características sensoriais como sabor, aparência e

aroma, características essas que são essenciais para a comercialização dos frutos, principalmente *in natura*. Com base nisso, pode-se considerar que o armazenamento refrigerado, por retardar os processos respiratórios e transpiratórios e também a produção de etileno, é o melhor método de armazenamento por períodos de tempo prolongados, uma vez que, com baixas temperaturas, reduz-se a proliferação de fungos causadores de podridões (ANTUNES et al., 2003; SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009).

Pouco se sabe sobre as atividades biológicas dos frutos da espécie *Rubus* spp, sendo a atividade antioxidante, a mais estudada até o momento (HIRSCH, 2011; DENARDIN et al., 2015). CUEVAS-RODRIGUEZ et al. (2010) também demonstrou as propriedades anti-inflamatórias dos frutos de diferentes genótipos de *Rubus* spp. Especificamente sobre os genótipos trabalhados no presente estudo, ou seja, as cultivares Xavante, Tupy, BRS Xingu e as seleções Black 178 e Black 145, evidências de suas propriedades biológicas são escassas, especialmente sobre as seleções, não havendo estudos desses genótipos cultivados na região de Curitiba – SC.

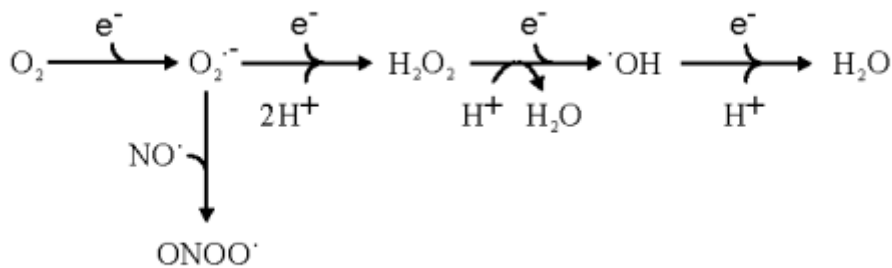
Em oposto à espécie *Rubus* spp., o potencial biológico da amoreira-miúra (*Morus nigra* L.) está melhor elucidado. O estudo de Araujo (2015) demonstrou que os frutos da amoreira-miúra possuem compostos antioxidantes naturais que auxiliam no controle de radicais livres e dos danos oxidativos em lipídios, reduzindo a incidência de casos de doenças crônicas. Outros estudos evidenciaram a atividade protetora cerebral em camundongos, relacionados ao ácido siríngico presente no extrato aquoso dos frutos de amoreira-miúra (QUADIR; ALI; IBRAHIM, 2014; DALMAGRO; CAMARGO; ZENI, 2017). Os frutos e as folhas da amoreira-miúra tem demonstrado atividades antioxidante, antimutagênica e anticarcinogênica (AGABEYLI, 2012; ISSA; ABD-ALJABAR, 2013; TURAN et al., 2017).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS, ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO COM AS DOENÇAS HUMANAS

Durante o metabolismo celular produtor de energia, ocorre a liberação de íons hidrogênio (H⁺) livres, os quais tem potencial tóxico, pois podem reagir com outras moléculas por meio de reações de óxido-redução, gerando assim espécies reativas de oxigênio (EROs) (HUBER et al., 2008), como demonstrado na Figura 5. Por

reações de redução de 1 elétron, o oxigênio molecular (O_2) é convertido em ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que na sequência, pode ser reduzido à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou convertido a peróxinitrito ($ONOO^-$) na presença de óxido nítrico (NO). Na presença de Fe^{2+} , o H_2O_2 forma o radical hidroxil ($\bullet OH$), a mais reativa das EROs.

Figura 5. Demonstração da formação de EROs.



Fonte: NICHI, (2003)

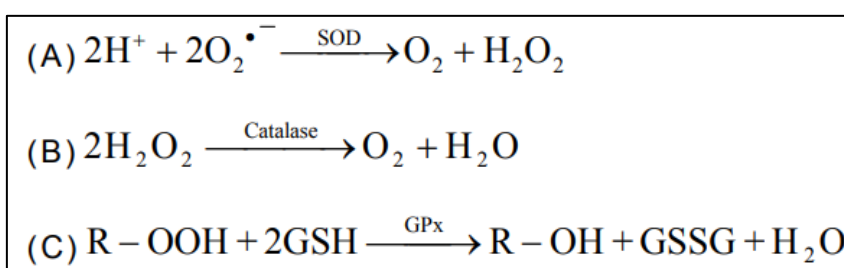
Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), as EROs podem ser divididas em espécies radicalares e não radicalares. As radicalares possuem elétrons desemparelhados na sua última camada orbital, sendo as principais representadas por: radicais hidroxila ($\bullet OH$), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais peroxil ($RO\bullet_2$), radicais hidroperoxil ($HO\bullet_2$) e radicais alcóxil ($RO\bullet$). Enquanto que as EROs não radicalares possuem os elétrons pareados, sendo representadas principalmente pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3).

Estudos demonstraram que as EROs são importantes no desempenho de funções do sistema imune e na sinalização celular, porém, quando presentes em excesso, podem causar danos às biomoléculas (FINKEL E HOLBROOK, 2000; JI; GOMEZ-CABRERA; VINA 2006). Esses danos em excesso podem evoluir para mutações, desorganização tecidual, alterações na expressão gênica, decréscimo na sinalização intracelular, instabilidade genômica, entre outros danos (RATTAN, 2006).

De forma a evitar o acúmulo de EROs, existem compostos denominados de antioxidantes, os quais podem ser encontrados de forma endógena e exógena no organismo, e fazem o controle dessas ERs potencialmente tóxicas. Esses

antioxidantes são divididos em enzimáticos e não enzimáticos (RODRIGUEZ et al., 2004). Os antioxidantes enzimáticos são representados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPX) e pela catalase (CAT) (Figura 6) (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999). Os antioxidantes não enzimáticos por sua vez, são representados pela glutathione (GSH), coenzima Q-10, cisteína, melatonina, e os compostos bioativos (β -Caroteno, fitoestrógenos, vitaminas E e C e os compostos fenólicos) (WEI; LEE, 2002).

Figura 6. Antioxidantes enzimáticos. (A) SOD, (B) CAT e (C) GPx



Fonte: ARAUJO (2006)

O estresse oxidativo é uma condição que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção das EROs e a sua remoção por antioxidantes endógenos ou exógenos. Por se tratar de uma condição que rompe o equilíbrio celular, o estresse oxidativo é comumente associado a inúmeras doenças, pois causa danos oxidativos às proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (ZABIDAH; KONG; AMIN, 2011).

Nesse sentido, a ingestão de antioxidantes de origem natural atua significativamente na prevenção do estresse oxidativo, auxiliando na prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) oriundas da ação das ERs, tais como o câncer, as doenças cardiovasculares e o diabetes (VENDEMIALE; GRATAGLIANO; ALTOMARE, 1999; PEREIRA; CARDOSO 2012; SCHAICH, 2015). Neste contexto, os compostos bioativos oriundos de frutas e vegetais têm demonstrado importantes atividades relacionadas à prevenção e tratamento dessas DCNTs (WAHLQVIST et al., 2013).

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

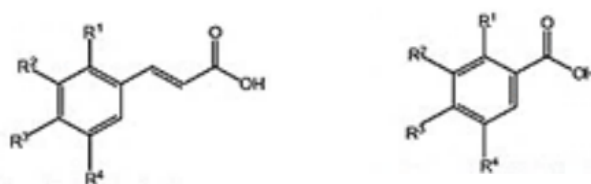
Em espécies vegetais, os compostos bioativos ou fitoquímicos consistem em metabólitos secundários com função de proteção de condições adversas, sejam elas

oriundas de meios biótico ou abiótico. Além disso, possuem função alelopática e servem como forma de atração para polinizadores (LARCHER, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.3.1 Fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam um grupo fenol constituído por um anel aromático hidroxilado em seu modelo estrutural básico, entretanto, são separados em diversas classes, sendo duas predominantes: os ácidos fenólicos e os flavonoides (MARTINS et al., 2016). Os ácidos fenólicos são representados pelos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos (Figura 7). Enquanto que os flavonoides são divididos em seis outras classes: flavonas, flavononas, antocianidinas, flavanois, isoflavonas e flavonois (Figura 8) (LIU et al., 2014; SILVA et al., 2014). A estrutura química básica dos flavonoides é o flavilium que consiste em 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B). Os benzenos aparecem interligados a uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), onde o primeiro benzeno é condensado com o sexto carbono do pirano, que na posição 3 carrega um grupo fenila (DORNAS et al. 2007) (Figura 8). Por possuírem mais de um anel aromático hidroxilado, os flavonoides são frequentemente referidos como polifenóis.

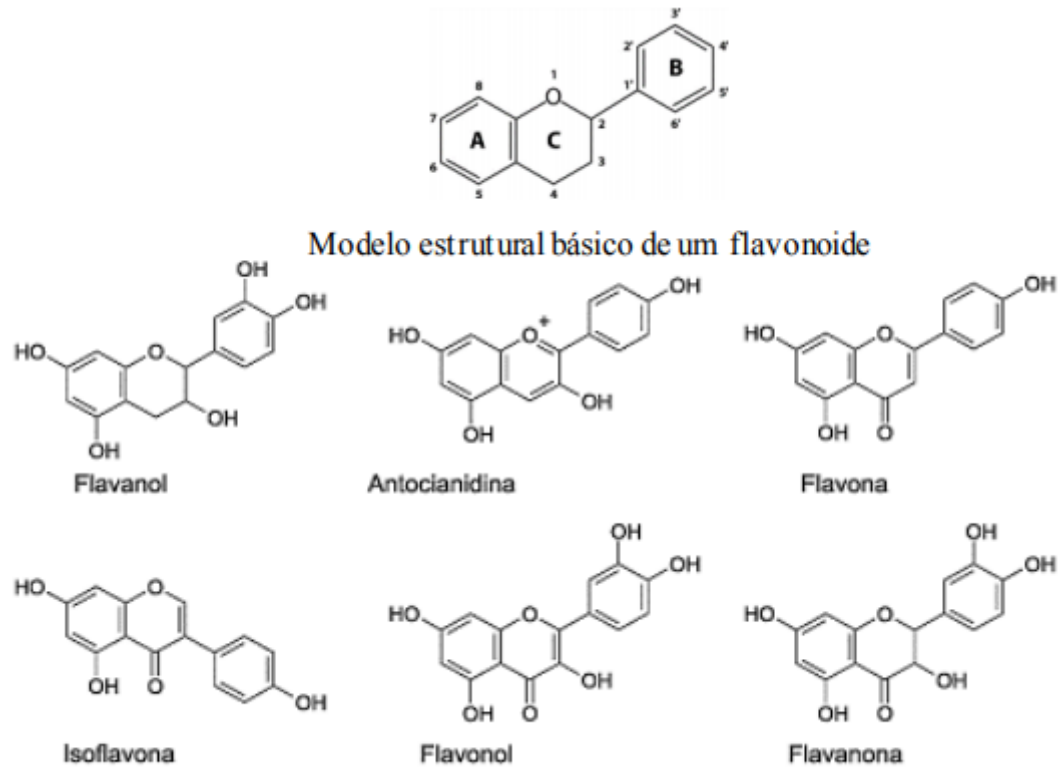
Figura 7. Modelo estrutural básico dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos



Substituição	Derivados do ácido hidroxicinâmico	Derivados do ácido hidroxibenzoico
R ¹ =OH	Ácido <i>o</i> -cumárico	-
R ¹ =OH	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido hidroxibenzoico
R ² =R ³ =OH	Ácido cafeico	Ácido protocateico
R ² =OCH ₃ , R ³ =OH	Ácido ferúlico	Ácido vanílico
R ² =R ³ =R ⁴ =OH	-	Ácido gálico
R ¹ =R ⁴ =OH	-	Ácido gentísico
R ² =R ⁴ =OCH ₃ , R ³ =OH	Ácido sinápico	Ácido siríngico

Fonte: Heleno et al., (2015)

Figura 8. Estrutura química das principais classes de flavonoides

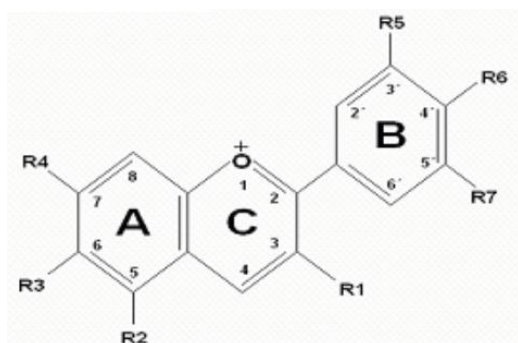


Fonte: CERQUEIRA et al., 2007, adaptado

2.3.2 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos vegetais pertencentes à classe dos flavonoides e são responsáveis pela pigmentação de frutos, vegetais e grãos de maneira em geral. A estrutura química básica das antocianinas é policíclica e constituída por quinze carbonos, como demonstrado na Figura 9.

Figura 9. Estrutura química básica das antocianinas

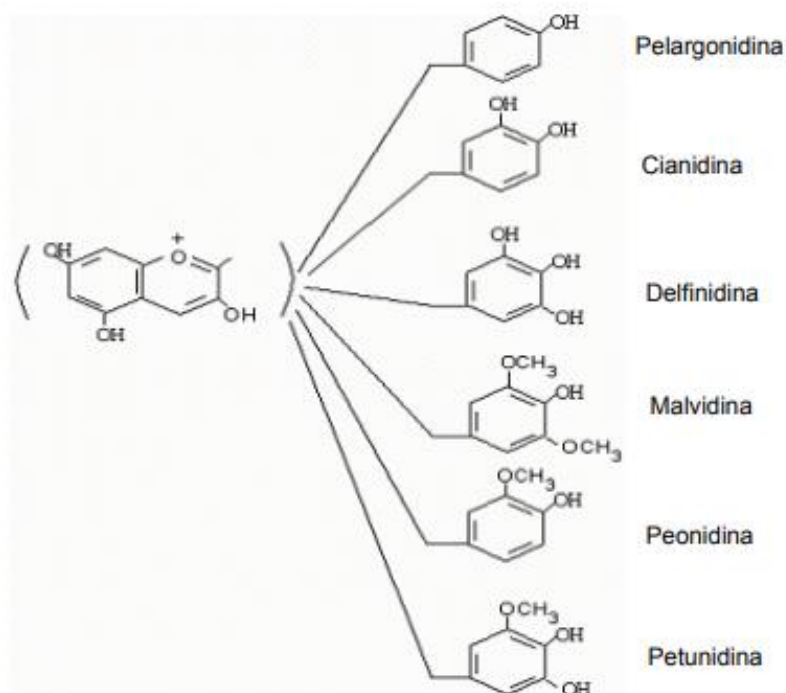


Fonte: LÓPES et al., (2000)

Esses pigmentos conferem cores em tons de vermelho, azul e roxo majoritariamente às flores e frutos, embora também sejam encontrados nas folhas vermelhas, em grãos, raízes e tubérculos vermelhos a púrpureos comestíveis (KHOO et al., 2017).

As antocianinas são parte essencial dos frutos, uma vez que a qualidade desses é relacionada à sua atratividade aos olhos dos consumidores. Logo, se a aparência e qualidade dos frutos forem superiores, maior será a chance de venda, e maiores serão os teores de compostos funcionais ingeridos pelo consumidor. Pelargonidina, Cianidina, Peonidina, Delphinidina, Petunidina e Malvidina são as seis antocianidinas (estruturas não glicosiladas) encontradas no reino vegetal, que podem variar sua estrutura por substituições glicosídicas nas porções 3 e 5 (LEE, 2005), demonstradas na Figura 10.

Figura 10. Estrutura das diferentes antocianidinas.

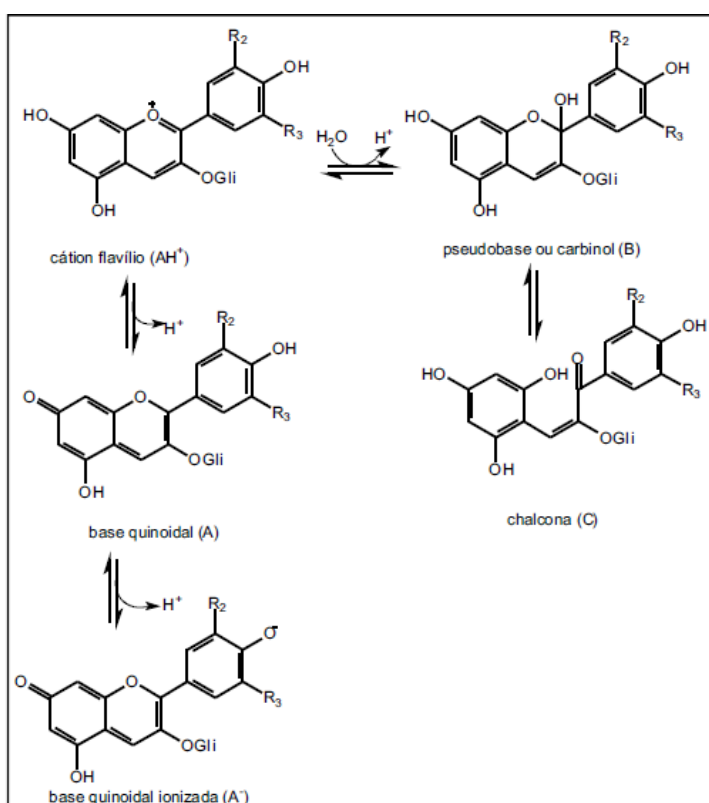


Fonte: Adaptado de Bobbio; Bobbio (1995)

Quimicamente, as antocianinas são muito instáveis e podem sofrer degradação ao passarem por qualquer tipo de processamento, o que limita seu uso como corante natural, uma vez que a temperatura, luz e pH são os principais fatores que proporcionam essa degradação (LIMA et al., 2002; LIMA et al., 2005)

Entre os três principais fatores de degradação, o mais limitante deles é considerado o pH, o qual pode alterar a estabilidade, forma química e a cor das antocianinas, sendo a forma mais estável encontrada em pH ácido. Estudos como o de Akwie (2000) relataram que em pH 3,0, as antocianinas assumem cor avermelhada (cátion flavílio ou flavílio), as quais passam para amarelo pálido com o dobro do valor de pH (pseudobase ou carbinol) e azul escuro com o triplo do valor do pH inicial (ionizadas e chalconas). A seguir, pode-se observar a mudança na estrutura química das antocianinas, demonstrado na Figura 11.

Figura 11. Alteração na estrutura química das antocianinas por variação de pH



Fonte: Akwie, (2000)

2.3.3 Compostos bioativos da amoreira-preta

Os frutos do gênero *Rubus* são considerados como potenciais agentes nutritivos por apresentarem não só minerais e nutrientes essenciais, mas também grupos responsáveis por desempenhar propriedades funcionais no organismo humano, como os compostos fenólicos (ALLEN; TRESINI, 2000; MOTA, 2006).

Antunes (2004) demonstrou a presença do ácido elágico ($C_{14}H_6O_8$) na espécie *Rubus brasiliensis*. Este composto é um composto fenólico derivado do ácido gálico e possui função anticancerígena, antioxidante e anti-mutagênica. Trabalhos como o de Kähkönen et al. (1999), demonstraram maior atividade antioxidante e alto conteúdo fenólico total em bagas *Aronia* e de *Rubus* spp, quando comparadas aos da maçã. Esse comparativo pode-se tornar interessante uma vez que atenta que pequenos frutos como os de *Rubus* spp podem estar em vantagem nutracêutica quando comparados com frutos de grande expressão produtiva em climas temperados como a maçã.

Nesse contexto, a amoreira-preta (*Rubus* spp) se encaixa como uma aliada do produtor e do consumidor, por ser uma frutífera que disponibiliza em seus frutos altos valores nutritivos.

Além disso, os frutos são de fácil manejo agrônomo, adaptados à região de clima temperado e possuem boa resistência a patógenos e doenças, portanto, independem do uso obrigatório de agroquímicos, podendo ser conduzidos sem a utilização de defensivos químicos de altas concentrações. Portanto, a amoreira-preta pode se enquadrar na produção familiar, gerando segurança alimentar e ambiental (ANTUNES, 2002).

Considerando o potencial biológico de diversas espécies de amoreira-preta já demonstrado na literatura científica, é importante a realização de estudos que avaliem os compostos bioativos e atividade antioxidante dos genótipos obtidos por melhoramento genético e cujos dados sobre as suas propriedades biológicas ainda são escassos ou inexistentes. A fim de propiciar melhores condições para a extração dos compostos bioativos e atividade antioxidante da amora-preta, é importante considerar a escolha de um método de extração adequado, que recupere o máximo de compostos bioativos e que ao mesmo tempo, garanta a integridade e a qualidade desses compostos.

2.3.4 Fatores que influenciam a extração dos compostos bioativos

Diferentes fatores influenciam a extração de compostos bioativos das frutas ricas em antocianinas. Entre os principais fatores a se considerar são a temperatura, tempo de extração, o pH (muito crítico para as antocianinas) e a proporção entre solventes ou entre o(s) solvente(s) e o material vegetal utilizado (SKREDE; WROLSTAD; DURST, 2000; MARIAM; CHIM; 2009; PATRAS et al., 2010).

Em relação à influência da temperatura sobre a extração de compostos fenólicos totais e antocianinas, alguns estudos indicam o uso de uma temperatura mais elevada (em torno de 50°C), capaz de inativar a enzima polifenol oxidase (PFO), envolvida na degradação de compostos bioativos em frutos, favorecendo o aumento da extração das antocianinas (SKREDE; WROLSTAD; DURST, 2000; PATRAS et al., 2010). Por outro lado, estudos indicam que o uso de temperaturas elevadas podem levar à degradação dos compostos bioativos (AKOWUAH; MARIAM; CHIN, 2009; TSAO, 2010). Portanto, é importante a realização de estudos que avaliem o efeito da temperatura sobre a extração desses compostos, bem como de sua atividade antioxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DIVISÃO DE ETAPAS

O presente trabalho foi dividido em duas principais etapas. A primeira etapa foi responsável por avaliar e escolher qual o melhor método de extração de compostos fenólicos da amora preta, baseado em 6 diferentes métodos descritos na literatura para frutos ricos em antocianinas. Nessa etapa, a escolha do método mais representativo foi baseada na quantificação espectrofotométrica de fenólicos totais e no teste de remoção do radical DPPH. O método escolhido foi aplicado à segunda etapa deste estudo.

A segunda etapa consistiu em avaliar e quantificar os compostos bioativos (fenólicos totais e antocianinas) presentes nos frutos de 5 diferentes genótipos de amoreira-preta, bem como a sua atividade antioxidante *in vitro*, a fim de comparar esses dados entre os genótipos obtidos por melhoramento genético.

3.2 LOCAL E DATA

A execução e desenvolvimento do presente experimento foram efetuados na Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos, no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA) e Laboratório de Química Geral, os quais possuem a estrutura necessária para a realização de processos como extração, caracterização e avaliação dos compostos fitoquímicos presentes nos extratos. O início das atividades relacionadas ao projeto se deram em julho de 2017.

A coleta dos frutos foi feita na fazenda experimental da UFSC – Campus de Curitibanos, onde foram cultivadas as diferentes variedades de amoreiras.

3.3 VARIEDADES UTILIZADAS

Foram utilizados os frutos de cinco diferentes genótipos de amoreira-preta, sendo duas seleções (Seleção Black 145, seleção Black 178) e três cultivares (Xavante, Tupi, BRS Xingu).

As seleções são resultados de programas de melhoramento genético que visam gerar plantas com características atrativas tanto ao consumidor quanto ao produtor. A seleção Black 145 é descendente do cruzamento da cultivar Caingangue

com a Seleção 9/96, enquanto que a seleção Black 178 é originária do cruzamento entre a cultivar Caingangue e a Seleção 5/96.

As cultivares avaliadas no presente experimento também são oriundas de cruzamentos. A cultivar Xavante é oriunda da segunda geração do cruzamento entre as seleções A. 1620 e A. 1507, enquanto que a Cultivar Tupi é resultado do cruzamento entre a Cultivar Uruguai e a Cultivar Comanche; a Cultivar BRS Xingu é resultado do cruzamento entre a Cultivar Tupi e a Cultivar americana Arapaho (ANTUNES; RASEIRA, 2004; EMBRAPA, 2015).

3.4 CONSERVAÇÃO DOS FRUTOS

Como citado anteriormente, os frutos da espécie *Rubus* spp. são sensíveis ao processo pós-colheita. Por esse motivo, buscou-se minimizar o máximo possível as perdas que pudessem ocorrer por injúrias mecânicas devido ao transporte, colheita e armazenamento. Também buscou-se minimizar o tempo em que esses frutos pudessem ficar expostos às condições climáticas do local, reduzindo o tempo de incidência de luz solar e temperaturas elevadas sobre os mesmos. Por isso quando colhidos, os frutos foram separados imediatamente em sacos plásticos transparentes, identificados, armazenados em caixas de isopor contendo gelo. Logo após a coleta, os frutos foram repassados para outra caixa de isopor, e armazenados em um Ultrafreezer presente no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA/USFSC – Campus de Curitiba), onde ficaram armazenados à uma temperatura controlada de -80°C .

3.5 PREPARO DOS EXTRATOS

Na primeira etapa deste estudo, foram preparados seis diferentes extratos a partir de uma mistura de frutos oriundos dos cinco genótipos de amoreira-preta, os quais são descritos logo a seguir.

Adotou-se um padrão de aproximadamente quinze gramas (g) de frutos para cada processo de extração, para ser possível a quantificação de rendimento e concentração do extrato, e também impossibilitar que valores diferentes de peso de frutos pudessem influenciar nos resultados dos testes. Após a finalização do

processo de extração e evaporação, foi feita a pesagem do extrato para obter o rendimento total de cada extrato.

3.5.1 Extrato aquoso (suco integral)

O extrato aquoso é basicamente o suco integral dos frutos de amoreira-preta. O suco integral foi preparado por adicionar 15g de frutos em um processador de frutas Juicer Premium modelo PJE-800S (800 W de potência).

O extrato obtido foi acondicionado em um tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugado à uma rotação de 3000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos em uma centrífuga de mesa M/FANEM EXCELSA II (modelo 206 BL).

O sobrenadante resultante da centrifugação foi separado em outro tubo tipo Falcon de 15 mL que novamente foi centrifugado à 3000 rpm por 5 minutos. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi transferido para frascos tipo eppendorf de capacidade de 2 mL, onde foi efetuada uma pesagem em balança analítica para determinar o rendimento do suco. Por fim o extrato de suco foi congelado a uma temperatura de -80°C em um Ultrafreezer.

3.5.2 Extrato etanólico (extraído à 26°C)

Para o preparo do extrato etanólico à 26°C (ET26), seguiu-se a metodologia de Denardin et al. 2015 com pequenas modificações. Foram utilizados aproximadamente 15 g de frutos, os quais foram macerados por 5 minutos com o uso de um pistilo. Durante o processo de maceração, foi adicionado 45 mL de etanol (C₂H₆OH) 99°GL, seguindo uma proporção de 1:3 m/v. O resíduo sólido macerado e o líquido foram transferidos para um Erlenmeyer de 125 mL com tampa, envolvidos em papel alumínio e levados a um agitador de tubos por mais 30 minutos a temperatura ambiente de 26°C.

Após agitação, o conteúdo foi acondicionado em tubos Falcon de 15 mL, e centrifugado à uma rotação de 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi levado para um rotaevaporador à uma temperatura de 40°C. No resíduo sólido do Erlenmeyer foi adicionado mais 45 mL de etanol absoluto 99°GL e novamente foi levado ao agitador de tubos por mais 30 minutos à uma temperatura ambiente de 26°C. Após a segunda agitação, o conteúdo foi acondicionado em tubos Falcon de

15 mL e centrifugado à uma rotação de 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi levado para o rotaevaporador juntamente com a outra porção que já estava sendo rotaevaporada, onde permaneceram até a evaporação quase completa.

Após o período de quase total evaporação o extrato etanólico extraído a 26°C foi acondicionado em uma Placa de Petri de acrílico, e levada para uma Capela de Fluxo Laminar onde foi deixada *overnight*, por um período de aproximadamente 14 horas para evaporar o restante do álcool presente no extrato.

Após a evaporação total, a placa com o extrato foi pesada, embrulhada com papel alumínio, identificada e levada ao freezer em uma temperatura de -80°C.

3.5.3 Extrato etanólico (extraído à 50°C)

Para a preparação do extrato etanólico extraído à 50°C (ET50), repetiu-se o procedimento citado acima para o ET26, alterando apenas a temperatura de extração de 26 para 50°C.

3.5.4 Extrato etanólico (extraído à 26°C e acidificado)

Para o preparo do extrato etanólico extraído a 26°C e acidificado (ET26AC), repetiu-se todo o procedimento anterior de extração à 26°C, alterando apenas o processo pós-maceração, que consistiu em adicionar 0,25 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl), com o intuito de reduzir o pH para aproximadamente 1,6.

3.5.5 Extrato hidroetanólico (extraído à 1°C)

Para o preparo do extrato hidroetanólico extraído a 1°C (HA1), repetiu-se o procedimento de extração à 26°C, alterando-se o etanol absoluto para o etanol 96°GL, além do tempo e forma de extração. Nesse caso, o resíduo sólido macerado e o líquido foram transferidos para um Erlenmeyer de 125 mL com tampa, enrolados com papel alumínio e levados para uma geladeira onde permaneceram por 24 horas à uma temperatura de 1°C.

3.5.6 Extrato hidroetanólico (extraído à 1°C e acidificado)

Para o preparo do extrato hidroetanólico extraído a 1°C e acidificado (HA1AC), repetiu-se o procedimento de extração à 1°C, porém após a maceração, foi adicionado 0,25 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl), com o intuito de atingir um pH de aproximadamente 1,6.

Uma vez que esse foi o extrato escolhido para proceder à segunda etapa deste trabalho, procedimento semelhante a esse foi seguido para preparar o extrato de cada um dos cinco genótipos avaliados separadamente, alterando apenas a proporção massa/solvente, seguindo a metodologia de Kuskoski et al. (2005) com modificações de Sacchet et al. (2015). Durante o preparo, 25 g de amoras-pretas inteiras (fruto e sementes) foram maceradas durante 5 minutos com a adição de 50 mL de etanol 96°GL. Posteriormente, foi adicionado em torno de 0,5 mL (gota a gota) de ácido clorídrico (HCl) concentrado para atingir o pH = 1,5. Em seguida, o extrato foi armazenado refrigerado (1°C) durante 24 h. Posteriormente, o extrato foi centrifugado duas vezes (1500 x g durante 5 minutos) e o sobrenadante coletado e evaporado em rotaevaporador à temperatura de 40°C. Após a evaporação completa do etanol, os extratos foram armazenados a -80°C até a avaliação da atividade antioxidante.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Foram quantificados os compostos fenólicos totais e as AMT por métodos espectrofotométricos. Antes de todos os ensaios, foi preparada uma solução de cada extrato (50 mg.mL⁻¹) em solução hidroalcoólica 70%.

3.6.1 Determinação de fenólicos totais

A quantificação do conteúdo de fenólicos totais dos extratos foi realizada utilizando o método do Folin Ciocalteu descrito por (SINGLETON; ROSSI, 1965). 100 µL de diferentes diluições dos extratos foram adicionadas a 1mL do reagente Folin-Ciocalteu 1N diluído 10 x. As misturas foram agitadas em vórtex e deixadas em repouso por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, 1 mL de Na₂CO₃ 10% (p/v) foi adicionado às misturas, que foram incubadas por 90 min em local protegido da luz. A absorbância do produto de coloração azul formado durante a incubação, o qual resulta capacidade dos compostos fenólicos dos extratos em reduzir o Folin

Ciocalteu em meio alcalino foi medida em 765 nm em leitor de microplaca (Spectramax 190, Molecular Devices) contra um branco (contendo todos os reagentes da técnica, menos o extrato). Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3) e o conteúdo de fenólicos totais foi calculado utilizando uma curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 100 grama de extrato (mg GAE/100 g de extrato).

3.6.2 Determinação de antocianinas monoméricas

O conteúdo de antocianinas monoméricas (ATM) dos extratos foi determinado utilizando o método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

Em tubos de ensaio, os extratos foram diluídos em tampão de cloreto de potássio (KCl 0,025M, pH 1,0), homogeneizados e armazenados por 15 min na ausência de luz. Posteriormente, as absorvâncias de cada extrato diluído foram lidas em 510 nm em leitor de microplaca (Spectramax 190, Molecular Devices), e as diluições de cada extrato escolhidas para proceder a próxima etapa foram aquelas cuja absorvância atingiu entre 0,100 e 1,200 em 510 nm (requisito de linearidade do método). Em seguida, cada extrato foi também combinado com uma solução de acetato de sódio (pH 4,5), na diluição escolhida previamente, homogeneizados e armazenados por 15 min. A absorvância de cada solução foi medida em 510 e 700 nm. O valor da absorvância corrigida foi calculado como segue:

$$[(A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}] \quad (1)$$

O conteúdo de TMA foi calculado pela fórmula:

$$\text{AMT} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) \div \epsilon \times 1. \quad (2)$$

Onde: valores de absorvidade molar (ϵ) e de peso molecular da cianidina 3-O-glicosídeo foram 26,900L/mol.cm e 449,2g/mol, respectivamente. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de cianidina 3-O-glicosídeo/100g de extrato.

3.6.3 Potencial redutor de ferro

O potencial redutor dos extratos foi avaliado pelo método do potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP) segundo o método de BENZIE e STRAIN (1996) com algumas modificações. Diferentes diluições das frações do extrato foram incubadas com uma solução de trabalho contendo 2,4,6 – Tris(2-piridil)-s-Triazina (TPTZ) 10 mM (preparado em HCl 40 mM), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM e tampão acetato 0,3M (pH 3,6) a temperatura de 37 °C por 15 min. A absorbância resultante da formação do complexo entre o íon ferroso (Fe^{2+}) e o TPTZ foi registrada contra um branco em 593 nm em leitor de microplaca (Spectramax 190, Molecular Devices). Tubos contendo a solução de trabalho e o extrato, porém sem o TPTZ foram também preparados a fim de descontar possíveis absorções diretas dos compostos presentes no extrato no comprimento de onda utilizado (593 nm).

Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$) e a atividade redutora dos extratos foi calculada através de uma curva padrão ($1,25 - 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) preparada com o antioxidante Trolox (Sigma-Aldrich), um análogo hidrossolúvel da vitamina E. Os resultados foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes em μg equivalente de Trolox/g de extrato.

3.6.4 Atividade sequestrante do radical DPPH

O ensaio de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) foi realizado de acordo com BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995), com algumas modificações. O princípio do método consiste em avaliar a capacidade do extrato em reduzir o radical DPPH, formando o composto difenil-picril-hidrazina. Essa redução é percebida pela conversão da coloração púrpura do DPPH em coloração amarela (do composto difenil-picril-hidrazina), cuja diminuição da absorbância é medida em 517 nm. Neste ensaio, diferentes diluições de cada extrato foram preparadas em água ultrapura ou em solução hidroalcoólica 70%. Em seguida, 50 μL das diferentes diluições de cada extrato foram misturados à 50 μL de metanol e à 1,9 mL de solução metanólica de DPPH. Essas misturas foram incubadas por 24 h à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Uma solução contendo 1,9 mL de DPPH e 100 μL metanol foi preparada e utilizada como controle. A absorbância foi lida em 517 nm contra um branco (metanol) em espectrofotômetro. Todos os resultados foram expressos como percentagem de inibição do radical DPPH, os quais foram calculados pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = [(Abs \text{ controle} - Abs \text{ extrato}) \div (Abs \text{ controle})] * 100 \quad (3)$$

Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados da % de inibição do radical DPPH, bem como da CE50 foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da quantificação de fenólicos totais e de antocianinas, bem como da atividade antioxidante foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e submetidas ao teste de Tukey para comparação de médias. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando Statistica® 9.1 (Statsoft Inc., 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ETAPA 1

4.1.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Inicialmente, foram avaliados os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de seis diferentes extratos, sendo cada um obtido de uma mistura dos frutos de cinco diferentes genótipos de amoreira-preta. O objetivo foi avaliar qual(is) seria(m) o(s) método(s) de extração que exerceriam um melhor efeito sobre a recuperação do conteúdo total de fenólicos e sobre a atividade antioxidante dos extratos. Foram então preparados os seguintes extratos:

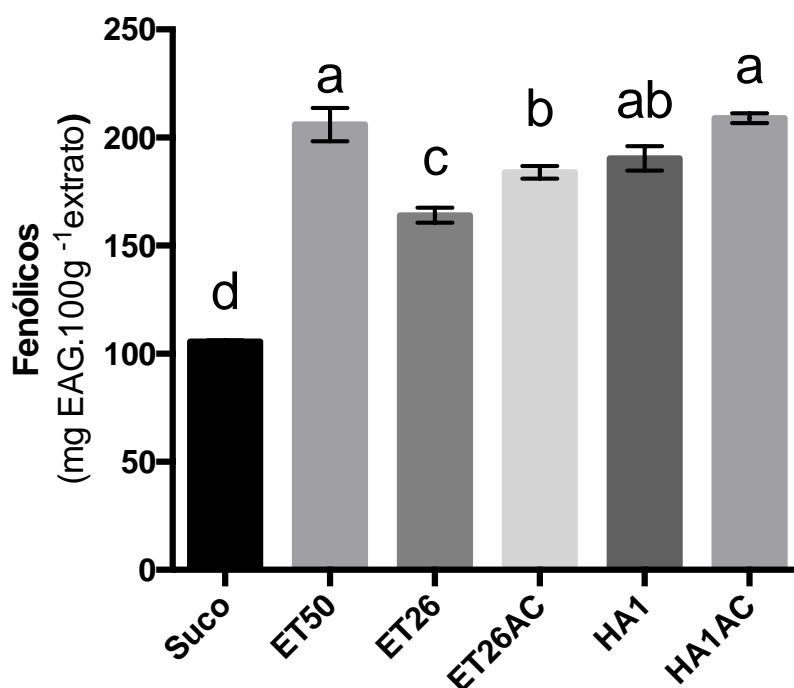
- Extrato aquoso (suco);
- Extrato etanólico, preparado em etanol 99°GL à 50°C (ET50);
- Extrato etanólico preparado com etanol 99°GL à 26°C (ET26);
- Extrato etanólico preparado com etanol 99°GL à 26°C, mas acidificado com HCl (ET26AC);
- Extrato hidroalcoólico preparado com etanol 96°GL à 1°C (HA1);
- Extrato hidroalcoólico preparado com etanol 96°GL à 1°C, mas acidificado (HA1AC).

Os resultados do teor de fenólicos totais são mostrados na Figura 12. Observa-se que o teor de compostos fenólicos foram maiores para os extratos ET50, HA1A e HA1AC, uma vez que não diferiram entre si. Assim, nota-se que tanto um extrato etanólico obtido a uma temperatura mais elevada (50°C) quanto um extrato hidroalcoólico obtido a uma temperatura mais baixa (1°C) com ou sem acidificação, apresentam o mesmo efeito sobre a recuperação do teor de compostos fenólicos de amora-preta.

Os menores teores de compostos fenólicos foram apresentados, nessa ordem, pelos extratos ET26AC, ET26 e pelo suco. Nesse caso, diferente dos extratos HA1 e HA1AC, a acidificação do extrato etanólico com HCl (ET26AC) resultou em um aumento significativo no teor de fenólicos em comparação com o respectivo extrato etanólico não acidificado (ET26). Dados indicam que a

acidificação de extratos de frutos ricos em antocianinas favorece o aumento do teor desses compostos bioativos (VIZZOTTO; PEREIRA, 2011; MACHADO, 2014). Uma vez que quantificamos neste trabalho o teor de fenólicos totais, não podemos descartar a contribuição das antocianinas para o aumento desses compostos no ET26AC comparado ao ET26. Por outro lado, a menor recuperação de compostos fenólicos observada no suco, indica a importância do uso de um solvente etanólico ou hidroetanólico ao invés de aquoso, para obter maiores teores de compostos fenólicos em extratos dos frutos de amoreira-preta. Isso ocorre porque em geral, solventes etanólicos e hidroetanólicos podem propiciar a extração tanto de compostos polares quanto apolares em relação aos solventes aquosos, que apenas extraem os compostos mais polares (SALDANHA, 2005).

Figura 12. Teor de compostos fenólicos totais em seis diferentes extratos dos frutos de amoreira-preta (*Rubus spp.*).



Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de três repetições independentes. Barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey).

EAG = equivalente de ácido gálico.

Os resultados da atividade antioxidante sequestrante do radical DPPH demonstram que para todos os extratos, houve um aumento dessa atividade com o aumento da concentração (ver colunas, Tabela 4). No entanto, para o suco (extrato aquoso) e para o ET26AC esse aumento foi significativo somente na maior concentração ($320 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação à 20 e $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 3. Atividade removedora do DPPH para os 6 extratos de *Rubus* spp.

% Inibição DPPH						
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Suco	ET50	ET26	ET26AC	HA1	HA1AC
20	$8,55 \pm 2,55^{\text{Bb}}$	$16,47 \pm 1,89^{\text{Ca}}$	$7,581 \pm 0,25^{\text{Cb}}$	$13,33 \pm 1,30^{\text{Ba}}$	$8,436 \pm 1,61^{\text{Cb}}$	$11,76 \pm 3,62^{\text{Ca}}$
80	$12,09 \pm 1,33^{\text{ABd}}$	$51,13 \pm 2,00^{\text{Ba}}$	$33,49 \pm 2,16^{\text{Bc}}$	$17,88 \pm 1,57^{\text{Bd}}$	$43,13 \pm 2,00^{\text{Bb}}$	$38,91 \pm 2,01^{\text{Bb}}$
320	$17,88 \pm 1,57^{\text{Ac}}$	$91,14 \pm 2,09^{\text{Aa}}$	$91,14 \pm 2,09^{\text{Aa}}$	$82,86 \pm 1,84^{\text{Ab}}$	$91,36 \pm 2,37^{\text{Aa}}$	$87,60 \pm 2,16^{\text{Aa}}$

Os dados são mostrados como média \pm E.P. de três repetições independentes. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna ou minúsculas na mesma linha indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$, Two-way ANOVA/Tukey).

Comparando os seis extratos entre si em cada concentração (linhas, Tabela 4), observa-se que o extrato etanólico obtido à 50°C (ET50) obteve o maior valor médio de % de inibição do DPPH nas duas primeiras concentrações, indicando que uma maior temperatura de extração pode favorecer a recuperação de compostos bioativos responsáveis por essa atividade. Por outro lado, o suco obteve o menor valor médio (especialmente nas concentrações de 80 e 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), indicando portanto, que o uso de um solvente hidroalcoólico ou etanólico é mais adequado para a extração de compostos com atividade antioxidante dos frutos de amoreira-preta.

De modo geral, os dados dessa primeira etapa mostram que, tanto para a recuperação do teor de fenólicos totais quanto para a atividade antioxidante avaliada pelo método de remoção do radical DPPH, os extratos ET50, HA1A e HA1AC obtiveram os melhores resultados. Esses resultados podem ser atribuídos tanto à influência benéfica da maior temperatura (50°C) como do uso de um solvente hidroalcoólico (acidificado ou não) sobre a recuperação de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos dos frutos de amoreira-preta.

4.2 ETAPA 2

4.2.1 Compostos fenólicos e antocianinas

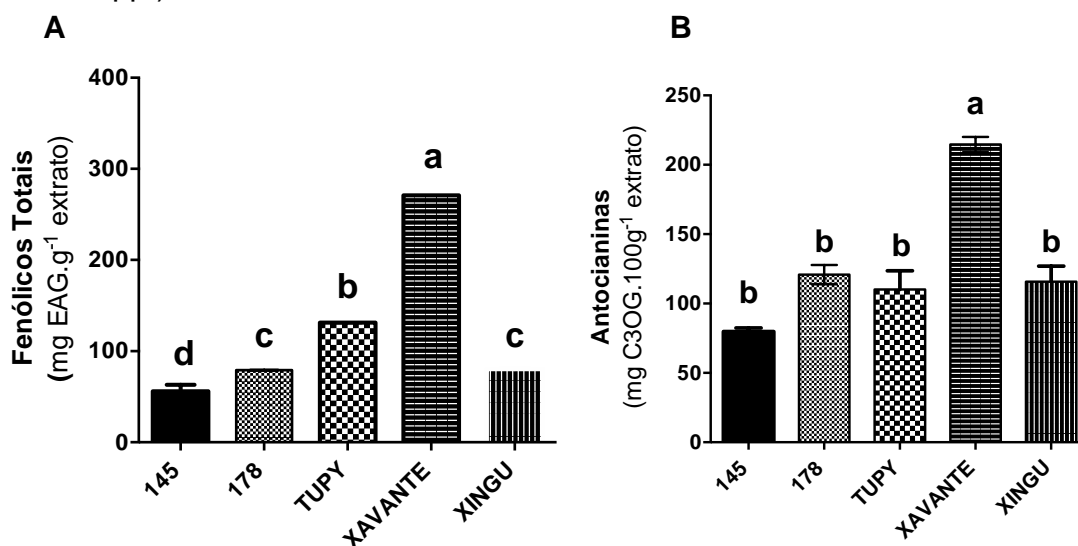
Nessa etapa, aplicou-se o método de extração escolhido para o preparo dos extratos dos frutos dos cinco genótipos separadamente. Foi escolhido o método com extração hidroalcoólica (etanol 96°GL), utilizando a temperatura de extração de 1°C (equivalente ao extrato HA1AC da etapa 1). A escolha foi baseada no fato de que o solvente hidroalcoólico exerceu influência positiva tanto quanto o extrato ET50, porém sem a necessidade do uso de uma temperatura mais elevada. Ressalta-se que os dados referentes ao uso de uma temperatura mais elevada para a extração de frutos com elevado teor de antocianinas (como os da amoreira-preta) são conflitantes. Alguns estudos sugerem que em torno de 50°C a enzima polifenol oxidase (PFO), envolvida na degradação de compostos bioativos é inativada, exercendo um efeito positivo na retenção das antocianinas. Porém, outros estudos indicam que uma temperatura maior durante a extração pode diminuir os teores de compostos fenólicos. No entanto, a temperatura mínima para essa redução ocorrer

varia entre os estudos, além de ser um fator também dependente do tempo de extração (SKREDE; WROLSTAD; DURST, 2000; PATRAS et al., 2010). Porém, estudos demonstram que temperaturas elevadas podem acarretar em degradação de compostos bioativos (AKOWUAH; MARIAM; CHIM; 2009; TSAO, 2010). Por isso, optou-se por não utilizar uma temperatura mais elevada na segunda etapa do estudo.

Com relação à acidificação, mesmo que os resultados entre os extratos HA1 e HA1AC tenham sido semelhantes na primeira etapa, optou-se por manter a acidificação dos extratos, uma vez que já é de comum consenso na literatura científica que a extração de antocianinas é favorecida em meio ácido, devido ao aumento de sua estabilidade e da sua condição neutra em pH baixo (STALIKAS, 2010; TSAO, 2010; ONCEA; STOIA; COMAN, 2012; TORMA et al., 2017).

Os resultados do teor de compostos fenólicos e AMT são mostrados na Figura 13.

Figura 13. Teor de compostos fenólicos totais. (A) e de antocianinas monoméricas totais (B) em extratos dos frutos de cinco diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* spp.).



Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de três repetições independentes. Barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey). EAG = equivalente de ácido gálico; C3OG: equivalente de cianidina-3-O-glicosídeo.

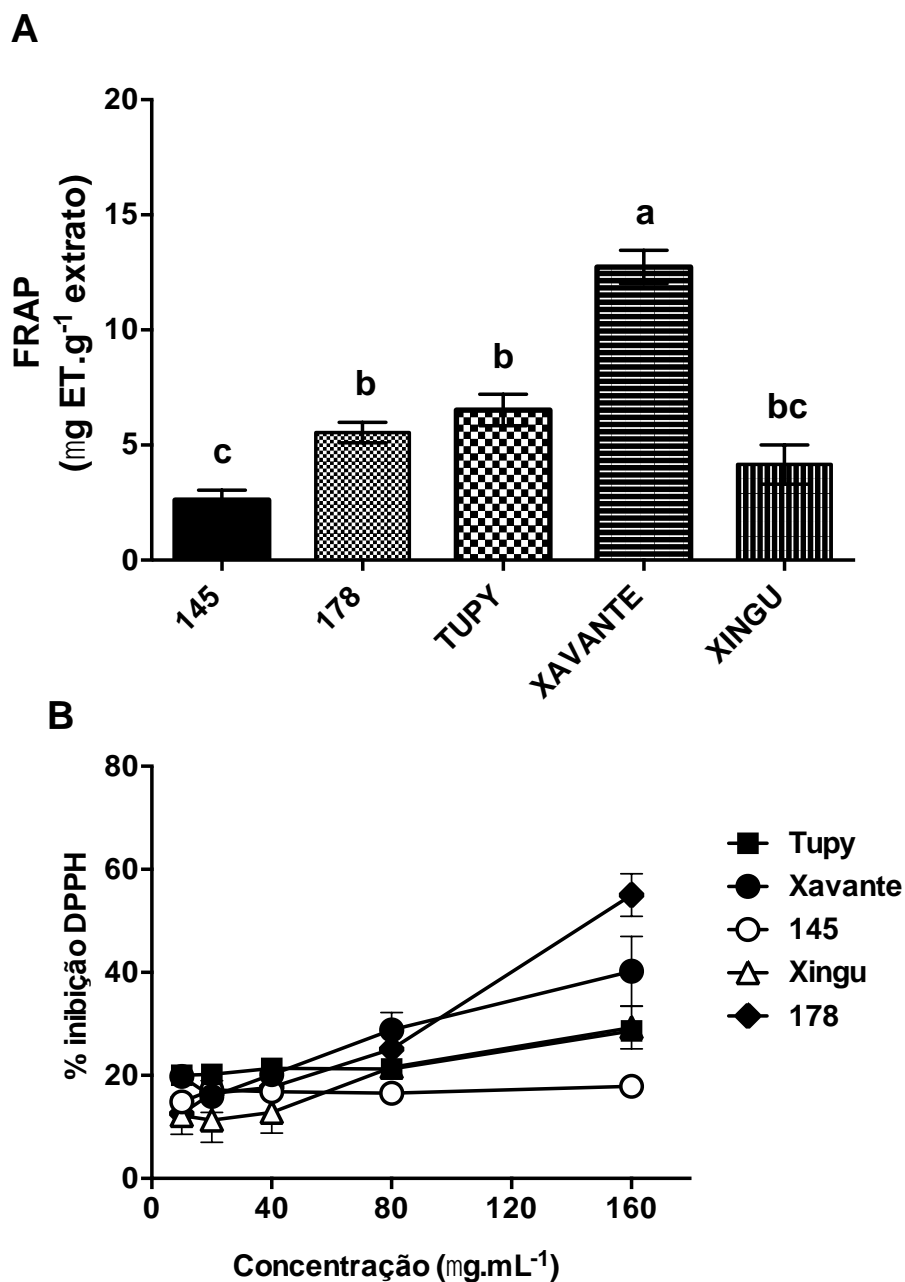
A cultivar Xavante foi a que apresentou os maiores teores de fenólicos totais e de AMT. Esses dados estão de acordo com o estudo de Guedes et al. (2014), o

qual comparou as cultivares Xavante, Tupy, Guarani e Cherokee, e também com Denardin et al. (2015), em que a cultivar Xavante, juntamente com a pitanga roxa apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais, seguido pela amora (cultivar Cherokee), araçá, pitanga laranja e vermelha e o butiá. A cultivar BRS Xingu e as seleções avançadas *Black 145* e *Black 178* apresentaram os menores teores de compostos fenólicos, enquanto que os teores de antocianinas, com exceção da cultivar Xavante, não diferiram entre os demais genótipos avaliados.

4.2.2 Atividade antioxidante *in vitro*

Os resultados da atividade antioxidante *in vitro* são apresentados na Figura 14.

Figura 14. Atividade antioxidante *in vitro* quantificada pelo potencial redutor de ferro (A) e pela remoção do radical DPPH (B).



(A) Potencial redutor de ferro e (B) Atividade sequestrante de DPPH de extratos dos frutos de cinco diferentes genótipos de amoreira-preta. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de três repetições independentes. Em (A), barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey). ET = equivalente de Trolox.

Semelhante aos resultados dos compostos bioativos (Figura 13A e B), a cultivar Xavante apresentou a maior atividade antioxidante pelo método do FRAP (Figura 14 A).

Em relação ao ensaio de remoção do radical DPPH, as diferenças entre os genótipos só foram visíveis na maior concentração ($160 \mu\text{g.mL}^{-1}$), por isso, não foi

possível determinar o parâmetro de EC50 (concentração que reduz 50% da concentração do radical DPPH) para este ensaio. Diferente do ensaio de FRAP, a cultivar Xavante apresentou a segunda maior atividade, ficando atrás somente da seleção Black 178 (Figura 14B), porém indicando ainda um melhor potencial antioxidante comparada à maioria dos genótipos estudados. Nota-se que a seleção Black 145 foi a que apresentou menor potencial antioxidante nos dois ensaios.

Mesmo com menores teores de compostos fenólicos totais e de AMT em relação à cultivar Xavante, a maior atividade da Black 178 na remoção do radical DPPH sugere que essa seleção contenha maior conteúdo de compostos bioativos responsáveis por remover esse radical em relação à cultivar Xavante e aos demais genótipos.

No geral, nossos resultados indicam que a cultivar Xavante é o genótipo de amoreira-preta com maior potencial antioxidante. Esses dados são corroborados por Guedes et al. (2014), os quais comprovam que a cultivar se sobressai em teor de flavonoides e em atividade antioxidante, quando comparada com as cultivares Tupy, Guarani e Cherokee. Silva et al. (2011), também demonstraram a maior capacidade sequestrante de DPPH da Xavante comparada às demais cultivares avaliadas no estudo, ou seja, Guarani, Comanche, Caingangue, Brazos, Tupi, Chocktaw e Cherokee.

Por fim, o melhoramento genético da amora-preta é importante para a adaptação ao clima e para a aquisição de características favoráveis ao consumo e comercialização, porém, parece não resultar em maiores teores de compostos bioativos ou em maior atividade antioxidante dessa fruta.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos na primeira etapa do presente trabalho, foi possível concluir que o método de extração que melhor impactou nos teores de compostos bioativos e na atividade antioxidante do fruto de amoreira-preta foi com o uso de solvente etanólico (à temperatura de 50°C) ou com solvente hidroalcoólico com ou sem acidificação. Na segunda etapa do estudo, conclui-se que o genótipo de amoreira-preta que apresentou maior teor de compostos bioativos e potencial antioxidante, entre os avaliados, foi a cultivar Xavante. Esses dados sugerem um possível maior potencial biológico dessa cultivar, o que deve ser corroborado em estudos posteriores utilizando modelos *in vivo* (culturas celulares ou modelos animais). Por fim, ressalta-se a importância de se realizar estudos acerca do potencial antioxidante de amoras-pretas cultivadas na região de Curitiba, a fim de buscar agregar valor à essas espécies e incentivar seu cultivo na agricultura familiar.

REFERÊNCIAS

- AGABEYLI, R.A. Antimutagenic Activities Extracts from Leaves of the *Morus alba*, *Morus nigra* and Their Mixtures. **International Journal of Biology**, v. 4, n. 2, p. 166-172, 2012.
- AICR. American Institute for Cancer Research, HEAL WELL Healthy Eatyng and Activity for Living: **A cancer nutrition guide**. p. 31. 2013. Disponível em: <http://www.aicr.org/assets/docs/pdf/education/heal-well-guide.pdf>. Acesso em: 12/02/2019.
- AKOWUAH, G.A.; MARIAM, A.; CHIN, J.H. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, p. 81–85, 2009.
- ALLEN, R.G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 28, p. 463-99, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699758>. Acesso em: 26 de março de 2018.
- ALMEIDA J. R. G. S. et al. **Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae)**. Latin American Journal of Pharmacy, v.30, n.1, p. 96-100. 2011.
- ANTUNES, L.E.C. Amora-preta: Nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, Vol. 32, n. 1, p. 151-158, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/cr/v32n1/a26v32n1.pdf>>. Acesso em: 23 de março de 2018.
- ANTUNES, L.E.C. et al. **A cultura da amora-preta**. Belo Horizonte: EPAMIG, p. 28, 2002. EPAMIG. Boletim Técnico, 69. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=247060&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22REGINA,%20M.%22&qFacets=autoria:%22REGINA,%20M.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 05 de junho de 2019.
- ANTUNES L.E.C.; DUARTE FILHO J.; SOUZA C. M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Vol. 38. n.3. Brasília. 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2003000300011. Acesso em: 23 de março de 2018.
- ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.C.B. **Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 54, 2004. Embrapa Clima Temperado Documentos 122). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32426/1/documento-122.pdf>. Acesso em: 24 de março de 2018.
- ANTUNES, L.E.C. et al. Produção extemporânea de amora-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n.3, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.p->

hp?script=sci_arttext&pid=S010029452006000300020&lng=en. Acesso em: 23 de março de 2018.

ANTUNES, L. E. C. et al. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 100-111, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-450/13>. Acesso em: 09/08/2018.

ANVISA. **Consulta de Produtos**. Alimentos. Amora-preta. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/alimentos/q/?nomeProduto=amora-preta>. Acesso em: 06 jun. 2019.

ARAUJO, A. S. R. **Influência do estresse oxidativo no desenvolvimento da hipertrofia e insuficiência cardíaca induzida pelo hipertireoidismo em ratos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Conclusão de Curso. Porto Alegre. p. 125. 2006. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/8175>.

ARAUJO, C. M. **Análise da eficácia da polpa do fruto e do extrato das folhas de amoreira (Morus nigra L.) sobre a modulação de marcadores metabólicos e marcadores do estado redox celular em um modelo experimental de diabetes tipo 1**. Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). 2015.

BARBI, R. C. T. **Extração e quantificação de compostos fenólicos e antioxidantes da chia (Salvia hispânica L) usando diferentes concentrações de solventes**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016. Disponível em: http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5045/1/CM_COEAL_2016_1_11.pdf. Acesso em: 12/08/2018.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-6, 1996.

BOWEN-FORBES, C. S. et al. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 554-560, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.012>. Acesso em: 08/08/2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Journal of Food Science and Technology - LEB**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 26 de março de 2018.

CAPOCASA, F. et al. Breeding strawberry (Fragaria X Ananassa Duch) to increase fruit nutritional quality. **Biofactors**, v. 34, n. 1, p. 67-72. 2008.

CERQUEIRA, F. M. et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**. v. 30, n.2, p. 441-449, 2007.

CHEN, Y.C. et al. *Morus alba* and active compound oxyresveratrol exert anti-inflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling. **The official journal of the International Society for Complementary Medicine Research**, 13:45, p. 1-10, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-45>. Acesso em: 20 de março de 2019.

CUEVAS-RODRÍGUEZ E.O. et al. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, n.17, p. 9542-9548, 2010.

DALMAGRO, A. P.; CAMARGO, A.; ZENI, A.L.B. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n.6, p.1963-1973. 2017.

DENARDIN, C.C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387- 398, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949815000344>. Acesso em: 10 abr. 2019.

DORNAS, W. C. et al., Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista Ciência Farmácia Básica Aplicada**. Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

EMBRAPA. **Amora-preta: BRS Xingu**. Pelotas, RS. p. 1, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2938/amora-preta--brs-xingu&ved=2ahUKEwi1voqkoqTjAhVSK7kGHe66DdwQFjAAegQIAhAB&usq=AOvVaw3h-jvMRRQZUgAq1KQDj3li>. Acesso em: 20 de março de 2018.

EO, H.J., et al. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (*Morus alba* L.) root bark. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14:200, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4074313/pdf/1472-6882-14-200.pdf>. Acesso em: 20 de março de 2018.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p.109-120, 2011. Volume Especial. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000500014 . Acesso em: 24 de março de 2018.

FAOSTAT. **Producción agrícola**. 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Acesso em: 20 de março de 2018.

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **Comportamento recente da fruticultura na área de atuação do BNB**. FAOSTAT. 2017. Divisão de estatística. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/documents/80223/2509338/fruticultura_9_2017%28V2%29.pdf/78355bff-67a5-d1b9-be93-fa2471ef523a. Acesso em: 15 de junho de 2019.

FINKEL, T., HOLBROOK N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons. Unit. F1.2.1-13, 2001.

GUEDES, M.N.S. et al. Composição química, compostos bioativos e dissimilaridade genética entre cultivares de amoreira (*Rubus* spp.) cultivadas no sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.1, p.206–213, 2014.

HALLIWEL B., GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press; 1999.

HIRSCH, G. E. **Valor Nutricional e Capacidade Antioxidante de diferentes Genótipos de Amora-Preta (*Rubus* sp.)**. 2011. UFSM. Dissertação de Mestrado. Santa Maria, RS. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/5692/HIRSCH%2C%20GABRIELA%20ELISA.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 20 de março de 2018.

HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**. v. 173, p. 501-513, 2015.

HUBER, P.C., et al. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. v. 31, n.5, p. 1170-1179. 2008.

INCA. Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro. 124 p. 2014. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf. Acesso em: 12/02/2019.

ISSA, N.K.; ABS-ALJABAR, R.S. Evaluation of Antioxidant Properties of *Morus nigra* L. Fruit Extracts (II). **Journal of Biological Sciences**. v. 6, n.4, p. 258 – 265, 2013.

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

JI, L.L. GOMEZ-CABRERA M. C., VINA J. Exercise and homersis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. **Ann N Y Academy of Science**, v. 1067, p. 425-435. 2006.

KEY, T.J. et al. Diet, nutrition and the prevention of cancer. **Public Health Nutrition**. DOI: 10.1079/PHN2003588. v.. 7(1A), p. 187–200, 2004. Disponível em: https://www.who.int/nutrition/publications/public_health_nut6.pdf. Acesso em: 12/02/2019.

KHANNA, R.; KUMAR, ANAND; KHANNA, R. Diet-Nutrition and Cancer Prevention (Review). **International Journal of Dental and Medical Specialty**, v.1, n.2, p. 33-37, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273506809_Diet-Nutrition_and_Cancer_Prevention_Review. Acesso em: 10/02/2019.

KHOO, H.E. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food Nutry Resource**. v.1, n. 13, p. 61, 2017. doi: 10.1080/16546628.2017.1361779. Disponível em: flybase.org/reports/FBBrf0224180.html Acesso em: 20 de março de 2018.

KRAUZE-BARANOWKA et al. Antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. **Food Function**, v. 5, n.10, p. 2536-2541, 2014. doi: 10.1039/C4FO00129J. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25131001>

KUSKOSKI, E.M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, p. 531. 2004.

LEE, J. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit Juices, Beverages, Natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal AOAC International**, vol. 88, n. 5, p.1269-1278, 2005. Disponível em: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/37108/pdf/leejaoac.pdf>. Acesso em: 28 de março de 2018.

LIU, Z., HUANG, Y., HU, W., HUANG, S., WANG, Q., HAN, J., ZHANG, Y.Q. dAcsl, the *Drosophila* Ortholog of Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 3 and 4, Inhibits Synapse Growth by Attenuating Bone Morphogenetic Protein Signaling via Endocytic Recycling. **Journal Neuroscience**, v.8, n. 34, p. 2785-2796, 2014. Disponível em: <http://flybase.org/reports/FBBrf0224180.html>. Acesso em: 20 de março de 2018.

MACHADO, A.P.D. **EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO DA AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) UTILIZANDO LÍQUIDOS PRESSURIZADOS**. Unicamp. Campinas, p. 127. 2014. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/254627/1/Machado_AnaPaula_daFonseca_M.pdf. Acesso em: 10 de abril de 2019.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. São Paulo. 2003. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-14062004-114313/>

OLIVEIRA, A.C.B. et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n.2, p. 244-249, 2013.

ONCEA, S.; STOIA, M.; COMAN, D. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of *Vaccinium Corymbosum* in the Perspective of Food Applications. **Procedia Engenier**, v. 42, p. 489-495, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705812028408>. Acesso em: 10 de abril de 2019.

PAGOT, E. et al. **Cultivo da Amora-preta**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2007. 11 p. Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 75. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/56229/1/cir075.pdf>. Acesso em: 24 de março de 2018.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends Food Science Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224409002271>. Acesso em: 09 abril de 2019.

PAWLOWSKA, A.M., OLESZEK W. , BRACA A. Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.56. n. 9. p. 77-80, 2008.

PBMC. **Mudanças Climáticas e Cidades. Relatório Especial do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas**. PBMC, COPPE – UFRJ. Rio de Janeiro. ISBN: 978-85-285-0344-9. 116p. 2016. Disponível em: http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/documentos/Relatorio_UM_v10-2017-1.pdf. Acesso em: 12/02/2019.

PEREIRA, I.S. et al. Adubação nitrogenada e características agronômicas em amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. v. 48, n. 4, p. 373-380, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100204x2013000400004>. Acesso em: 12/02/2019.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

QUADIR, M. I.; ALI, M.; IBRAHIM, Z. Anticancer activity of *Morus nigra* leaves extract. **Bangladesh Journal Pharmacol**. v. 9 n. 4. p. 496-497. 2014.

RASEIRA, M.C.B. et al. **Classificação botânica, origem e cultivares**. In: **ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.C.B. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 54p. (Embrapa Clima Temperado Documentos 122). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744812/1/documento122.pdf>. Acesso em: 24 de março de 2018.

RATTAN, S.I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. **Free Radical Research**, v.40, n.12, p. 1230-1238, 2006.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.36, n.1, p. 1-9. 2004.

SACCHET, C. et al. Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, Article ID 601503, 9 p, 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/601503/>.

SALDANHA, L.A. **Avaliação da atividade antioxidante “in vitro” de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. 2005. Dissertação (Mestre em Saúde Pública), Universidade de São Paulo. São Paulo/SP. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6133/tde-15042008-104510/es.php>. Acesso em: 10 de abril de 2019.

SANTOS, A. M.; BASSOLS, M.C.; MADAIT, J.C.M. **A cultura da amora-preta**. EMBRAPA, Clima Temperado. 2 ed. Brasília. Embrapa. p. 61, 1997. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/161998/1/A-cultura-da-amora-preta.pdf>. Acesso em: 23 de março de 2018.

SANTOS, C.E. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2014**. Ed. 1. Santa Cruz do Sul. Gazeta Santa Cruz. v. 136 p. 2013. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-da-fruticultura-2014/>. Acesso em: 25 de março de 2018.

SANTOS, S.S. et al. Microcapsules of Blackberry Pomace (*Rubus fruticosus*): Light and Temperature Stability. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 6. 2017. Disponível em: <https://www.aidic.it/eff2017/program/1madrona.pdf>. Acesso em: 10/08/2018.

SCHAICH K.M., TIAN X., XIE J.. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**. v. 18. P. 782–796; 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615002625>. Acesso em 22 de março de 2018.

SCHAKER, P. D. C.; ANTONIOLLI, L. R. Aspectos econômicos e tecnológicos em pós-colheita de amoras-pretas (*Rubus* spp). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 11-15, 2009. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/883015/aspectos-economicos-e-tecnologicos-em-pos-colheita-de-amoras-pretas-rubus-spp> Acesso em: 22 de março de 2018.

SILVA et al. Embrapa Clima Temperado. In: **ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL**, 6., 2014, Pelotas. Palestras e resumos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2014. 189 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/987113/compostos-fenolicos-totais-e-atividade-antioxidante-em-amora-preta-cv-tupy-de-diferentes-estadios-de-maturacao-armazenada-sob-refrigeracao>. Acesso em: 27 de março de 2018.

SILVA, R.S.; VENDRUSCOLO, J.L.; TORALLES, R.P. Avaliação da capacidade antioxidante em frutas produzidas na região sul do RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 3-4, p. 392-400, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/download/2073/1911>.

SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **Journal Food Science**, v. 65, p. 357-364, 2000.

STALIKAS, C.D. Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 610, p. 65-90, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013173>. Acesso em: 10 jan. 2019.

STATSOFT, Inc. (2004). **STATISTICA (data analysis software system), version 7**. Disponível em: <https://www.tibco.com/products/tibco-statistica>. Acesso em: 15 de março de 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. v. 4, p. 820, 2013

TANDON et al.. Anti-cancer diet: Reviewing the role of nutrition in cancer prevention. **Current Topics in Nutraceutical Research**. v. 6, p. 67-82. 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287348329_Anti-cancer_diet_Reviewing_the_role_of_nutrition_in_cancer_prevention. Acesso em: 12/02/2019.

TAVARES, L. et al. Neuroprotective effects of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1443-1452, 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.025>. Acesso em: 02/08/2018.

TORMA, P.D. et al. Hydroethanolic extracts from different genotypes of açai (*Euterpe oleracea*) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Food Chemistry**, v. 222, p. 94-104, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28041564>. Acesso em: 15 abril de 2019

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-46, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254006>. Acesso em: 10 de abril de 2019.

TURAN, I. Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n.2, p. 241-248, 2017.

VENDEMIALE, G., GRATTAGLIANO I., ALTOMARE, E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 29, n.2, p. 49-55, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436261>. Acesso em: 3 de abril de 2018. 29(2):49-55.

WAHLQVIST, M.L. et al. Antioxidant relevance to human health. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 22, p. 171-176. 2013. Disponível em:

<https://pdfs.semanticscholar.org/4d08/b676ae5b387b11b3375914d53d2e26648a28.pdf>. Acesso em: 12/02/2019.

WEI, Y. H., LEE, H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 227, n.9, p. 671-682. 2002.

YANAMOTO, L.Y. et al. Substratos no enraizamento de estacas herbáceas de amora-preta Xavante. **Ciência Rural**, v.43, p. 15-20, 2013.

ZABIDAH, A.A.; KONG K.W., AMIN, I. Antioxidant properties of tropical juices and their effects on in vitro hemoglobin and low density lipoprotein (LDL) oxidations. **International Food Research Journal**. v.18, p. 549-556, 2011. Disponível em: [http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(02\)%202011/\(12\)%20IFRJ-2010-233.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(02)%202011/(12)%20IFRJ-2010-233.pdf). Acesso em: 03 de abril de 2018.

ZENI, A.L.B.; DALL`MOLIN, M. Hypotriglyceridemic effect of *Morus alba* L., Moraceae, leaves in hyperlipidemic rats. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 20, n.1, p. 130-133, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000100025. Acesso em: 20 de março de 2019.

ZHEKUM, Z.; GILBERT. M.G. **Moraceae**. Flora of China. p. 21-73, 2003. Disponível em: <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume05/Moraceae.pdf>. Acesso em: 12/02/2019.