

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**CURSO DE NUTRIÇÃO**

**AMANDA MARTINS DOS SANTOS**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS DE DIETAS ADICIONADAS DE ORA-PRO-NÓBIS NA  
NUTRIÇÃO DE *Drosophila melanogaster***

**Itaqui**  
**2023**

**AMANDA MARTINS DOS SANTOS**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS DE DIETAS ADICIONADAS DE ORA-PRO-NÓBIS NA  
NUTRIÇÃO DE *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Nutrição.

Orientador: Tiago André Kaminski

**Itaqui**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

|       |   |
|-------|---|
| S237e | <p>Santos, Amanda Martins dos<br/>Efeitos bioquímicos de dietas adicionadas de ora-pro-nóbis na nutrição de <i>Drosophila melanogaster</i> / Amanda Martins dos Santos.<br/>24 p.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, NUTRIÇÃO, 2023.<br/>"Orientação: Tiago André Kaminski".</p> <p>1. <i>Pereskia aculeata</i>. 2. Mosca. 3. Longevidade. 4. Capacidade antioxidante. 5. Estresse oxidativo. I. Título.</p> |
|-------|---|

**AMANDA MARTINS DOS SANTOS**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS DE DIETAS ADICIONADAS DE ORA-PRO-NÓBIS NA  
NUTRIÇÃO DE *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Nutrição da Universidade Federal  
do Pampa, como requisito parcial para obtenção  
do Título de Bacharel em Nutrição.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 4 de julho de 2023.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Tiago André Kaminski

Orientador

UNIPAMPA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marina Prigol

UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra

UNIPAMPA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Tiago André Kaminski, pela orientação, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Prigol pela coorientação. À instituição de ensino Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), ao Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas (LAFTAMBIO), em especial as doutorandas Dieniffer Espinosa Janner e Elize Musachio, por fim sou grata à todos pela atenção, paciência e dedicação.

## RESUMO

As folhas da *Pereskia aculeata*, planta popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, são utilizadas na alimentação devido ao seu valor nutricional e capacidade antioxidante. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antioxidantes e comportamentais da adição de farinha das folhas de ora-pro-nóbis na nutrição de *Drosophila melanogaster*. A farinha das folhas da planta foi incorporada nas proporções de 5, 10 e 20% às dietas experimentais, as moscas divididas em grupos de 50 moscas cada e expostas ao protocolo experimental durante 7 dias. Após, as moscas foram utilizadas para realizar análises *in vivo*, como de sobrevivência, longevidade, teste de consumo, peso corporal, geotaxia negativa e campo aberto; e *ex vivo*, como níveis de espécies reativas (ERs), peroxidação lipídica através do conteúdo de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ânion superóxido, tióis proteicos (PSH) tióis não proteicos (NPSH), atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A adição da ora-pro-nóbis à dieta não promoveu alterações significativas no consumo, peso corporal e sobrevivência em relação ao grupo controle. As moscas do grupo com adição de 10% da farinha de ora-pro-nóbis na dieta tiveram maior longevidade, o que sugere um efeito protetor da planta, retardando processos metabólicos nocivos como o estresse oxidativo, constatado pelas alterações dos indicadores de ERs, TBARS, ânion superóxido, NPSH, e atividade das enzimas CAT e SOD. O conjunto dos resultados demonstra os benefícios da ora-pro-nóbis nas diferentes concentrações testadas.

Palavras-chave: *Pereskia aculeata*, mosca, longevidade, capacidade antioxidante, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The leaves of *Pereskia aculeata*, a plant popularly known as ora-pro-nobis, are used in food due to their nutritional value and antioxidant capacity. This work aimed to evaluate the antioxidant and behavioral effects of adding flour from ora-pro-nobis leaves on the nutrition of *Drosophila melanogaster*. The flour from the leaves of the plant was incorporated in proportions of 5, 10 and 20% to the experimental diets, divided into groups of 50 flies each and exposed to the experimental protocol for 7 days. Afterwards, the flies were used to perform in vivo analyses, such as survival, longevity, consumption test, body weight, negative geotaxis and open field; and ex vivo, such as levels of reactive species (ERs), lipid peroxidation through the content of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), superoxide anion, protein thiols (PSH) non-protein thiols (NPSH) and activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The addition of ora-pro-nobis to the diet did not promote significant changes in consumption, body weight and survival in relation to the control group. The flies in the group with the addition of 10% ora-pro-nobis flour in the diet had greater longevity, which suggests a protective effect of the plant, delaying harmful metabolic processes such as oxidative stress, verified by changes in the indicators of ERs, TBARS, superoxide anion, NPSH, and activity of CAT and SOD enzymes. The results demonstrates the benefits of ora-pro-nobis in the different concentrations tested.

Keywords: *Pereskia aculeata*, fly, longevity, antioxidant capacity, oxidative stress.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....                        | <b>10</b> |
| <b>METODOLOGIA</b> .....                       | <b>11</b> |
| <b>PREPARAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA</b> .....       | <b>11</b> |
| <b>ENSAIO BIOLÓGICO</b> .....                  | <b>11</b> |
| <b>ANÁLISES <i>in vivo</i></b> .....           | <b>12</b> |
| <b>ANÁLISES <i>ex vivo</i></b> .....           | <b>13</b> |
| <b>RESULTADOS</b> .....                        | <b>14</b> |
| <b>DISCUSSÃO</b> .....                         | <b>17</b> |
| <b>CONCLUSÃO</b> .....                         | <b>19</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                       | <b>19</b> |
| <b>ANEXO A - Diretrizes para autores</b> ..... | <b>22</b> |



Este TCC está apresentado em formato de artigo científico. Sua elaboração segue as diretrizes para autores da revista *Research, Society and Development* (ANEXO A).

# Efeitos bioquímicos de dietas adicionadas de ora-pro-nóbis na nutrição de *Drosophila melanogaster*

## Biochemical effects of added ora-pro-nobis diets on *Drosophila melanogaster* nutrition

## Efectos bioquímicos de dietas añadidas de ora-pro-nóbis en la nutrición de *Drosophila melanogaster*

### Resumo

As folhas da *Pereskia aculeata*, planta popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, são utilizadas na alimentação devido ao seu valor nutricional e capacidade antioxidante. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antioxidantes e comportamentais da adição de farinha das folhas de ora-pro-nóbis na nutrição de *Drosophila melanogaster*. A farinha das folhas da planta foi incorporada nas proporções de 5, 10 e 20% às dietas experimentais, as moscas divididas em grupos de 50 moscas cada e expostas ao protocolo experimental durante 7 dias. Após, as moscas foram utilizadas para realizar análises *in vivo*, como de sobrevivência, longevidade, teste de consumo, peso corporal, geotaxia negativa e campo aberto; e *ex vivo*, como níveis de espécies reativas (ERs), peroxidação lipídica através do conteúdo de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ânion superóxido, tióis proteicos (PSH) tióis não proteicos (NPSH), atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A adição da ora-pro-nóbis à dieta não promoveu alterações significativas no consumo, peso corporal e sobrevivência em relação ao grupo controle. As moscas do grupo com adição de 10% da farinha de ora-pro-nóbis na dieta tiveram maior longevidade, o que sugere um efeito protetor da planta, retardando processos metabólicos nocivos como o estresse oxidativo, constatado pelas alterações dos indicadores de ERs, TBARS, ânion superóxido, NPSH, e atividade das enzimas CAT e SOD. O conjunto dos resultados demonstra os benefícios da ora-pro-nóbis nas diferentes concentrações testadas.

**Palavras-chave:** *Pereskia aculeata*; Mosca; Longevidade; Capacidade antioxidante; Estresse oxidativo.

### Abstract

The leaves of *Pereskia aculeata*, a plant popularly known as ora-pro-nobis, are used in food due to their nutritional value and antioxidant capacity. This work aimed to evaluate the antioxidant and behavioral effects of adding flour from ora-pro-nobis leaves on the nutrition of *Drosophila melanogaster*. The flour from the leaves of the plant was incorporated in proportions of 5, 10 and 20% to the experimental diets, divided into groups of 50 flies each and exposed to the experimental protocol for 7 days. Afterwards, the flies were used to perform *in vivo* analyses, such as survival, longevity, consumption test, body weight, negative geotaxis and open field; and *ex vivo*, such as levels of reactive species (ERs), lipid peroxidation through the content of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), superoxide anion, protein thiols (PSH) non-protein thiols (NPSH) and activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The addition of ora-pro-nobis to the diet did not promote significant changes in consumption, body weight and survival in relation to the control group. The flies in the group with the addition of 10% ora-pro-nobis flour in the diet had greater longevity, which suggests a protective effect of the plant, delaying harmful metabolic processes such as oxidative stress, verified by changes in the indicators of ERs, TBARS, superoxide anion, NPSH, and activity of CAT and SOD enzymes. The results demonstrates the benefits of ora-pro-nobis in the different concentrations tested.

**Keywords:** *Pereskia aculeata*; Fly; Longevity; Antioxidant capacity; Oxidative stress.

## Resumen

Las hojas de *Pereskia aculeata*, planta conocida popularmente como ora-pro-nobis, se utilizan en la alimentación por su valor nutritivo y capacidad antioxidante. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos antioxidantes y de comportamiento de la adición de harina de hojas de ora-pro-nobis en la nutrición de *Drosophila melanogaster*. La harina de las hojas de la planta se incorporó en proporciones de 5, 10 y 20% a las dietas experimentales, las moscas se dividieron en grupos de 50 moscas cada uno y se expusieron al protocolo experimental durante 7 días. Posteriormente, las moscas se utilizaron para realizar análisis *in vivo*, como supervivencia, longevidad, prueba de consumo, peso corporal, geotaxis negativa y campo abierto; y *ex vivo*, como niveles de especies reactivas (ER), peroxidación lipídica a través del contenido de sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS), anión superóxido, tioles proteicos (PSH), tioles no proteicos (NPSH), actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AChE), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). La adición de ora-pro-nobis a la dieta no promovió cambios significativos en el consumo, peso corporal y supervivencia en relación al grupo control. Las moscas del grupo con la adición de 10% de harina de ora-pro-nobis en la dieta tuvieron mayor longevidad, lo que sugiere un efecto protector de la planta, retrasando procesos metabólicos nocivos como el estrés oxidativo, verificado por cambios en los indicadores de ERs, TBARS, anión superóxido, NPSH y actividad de las enzimas CAT y SOD. El conjunto de resultados demuestra los beneficios de ora-pro-nobis en las diferentes concentraciones probadas.

**Palabras clave:** *Pereskia aculeata*; Mosca; Longevidad; Capacidad antioxidante; Estrés oxidativo.

## 1. Introdução

A *Pereskia aculeata*, popularmente chamada de ora-pro-nóbis, é uma planta com características de trepadeira da família das Cactáceas, nativa da América do Sul e Central e da América tropical, com distribuição natural do Nordeste ao Sul do Brasil (Sharif et al., 2013). A planta ora-pro-nóbis tem se popularizado no Brasil e também é conhecida por lobrobó ou carne de pobre, em razão do seu elevado teor proteico (Sharif et al., 2013; Takeiti et al., 2009).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010), a ora-pro-nóbis é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC), ou seja, possui potencial alimentício, mas não é usualmente utilizada na alimentação diária da população em geral, embora seu consumo pode ser comum em determinadas regiões (Cruz et al., 2020).

As folhas de ora-pro-nóbis, parte da planta predominantemente utilizadas como alimento, são consumidas na forma *in natura*, em saladas, bebidas e diversas formas de alimentos processados (Almeida & Corrêa 2012); também são desidratadas e transformadas em farinha, a qual pode ser incorporada em diversos produtos alimentícios (Manetta et al., 2023; Santos & Menegassi, 2021; Sommer et al., 2022). As folhas se destacam pela elevada concentração de fibras e proteínas, com valores relatados entre 12 e 55% de fibras e entre 15 e 28% de proteínas nas folhas desidratadas (Takeiti et al., 2009; Almeida et al., 2014; Wainstein Silva, 2019; Sommer et al. 2022). Em relação aos micronutrientes, estudos relatam quantidades elevadas dos minerais cálcio, magnésio, zinco e ferro, além de níveis significativos de vitaminas A, C e ácido fólico nas folhas (Almeida Filho & Cambraia, 1974; Wainstein Silva, 2019; Takeiti et al., 2009).

Além dos estudos que demonstram a relevância da composição química das folhas de ora-pro-nóbis, do ponto de vista nutricional, seu consumo é associado a diversos benefícios à saúde pela expressiva capacidade antioxidante, inclusive superior à de outros vegetais, devido aos elevados teores de compostos fenólicos, o que também a caracteriza como um alimento funcional (Augusta & Nascimento, 2013; Matilla & Hellstrom, 2007).

O organismo produz naturalmente espécies reativas, porém as substâncias antioxidantes podem impedir ou diminuir danos oxidativos às moléculas do DNA, proteínas ou lipídeos, através do sequestro das espécies reativas de oxigênio nocivas, causadoras do começo ou da progressão de patologias associadas ao estresse oxidativo (Sousa et al., 2014). Normalmente, o estresse oxidativo indica que há um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes e reparadoras, resultando em níveis de estado estacionário aumentados de macronutrientes celulares oxidados. Devido isso o(s) mecanismo(s)

de ação dos antioxidantes desenvolvem papel como agentes terapêuticos (Day, 2014).

Cada vez mais se tem utilizado antioxidantes sintéticos, cujo consumo em excesso podem causar malefícios à saúde, estudos *in vivo* têm relatado danos como lesões hepáticas, carcinomas e elevada proliferação do retículo endoplasmático (Freitas et al. 2012; Ramalho & Jorge 2006). Uma alternativa para isso pode ser inclusão de ingredientes com antioxidantes naturais, como frutos e vegetais contendo compostos fenólicos, com capacidade de promoverem a estabilidade dos radicais livres (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011).

Estudos realizados em ratos constataram que o consumo da farinha de ora-pro-nóbis tem capacidade de reduzir o ganho de gordura visceral em fêmeas com uma dieta regular (Souza et al., 2015), tanto quanto é efetivo para reduzir o percentual de ganho de peso, gordura visceral, níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL, VLDL e aumentar o HDL-c (Barbalho et al., 2016). Além disso, a planta não possui efeito tóxico na dose de até 5 g/Kg de peso corporal e apresenta reduzido efeito citotóxico (Silva, 2017).

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca de fruta, tem sido amplamente utilizada em protocolos experimentais e serve como um modelo para investigação de muitos processos de desenvolvimento celulares comuns em eucariotos superiores, incluindo humanos (Adams et al., 2000), sendo um meio de cultura bastante consolidado em estudos sobre estresse oxidativo e ainda não testado para o consumo da ora-pro-nóbis.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antioxidantes e comportamentais da adição de farinha das folhas de ora-pro-nóbis na nutrição de *Drosophila melanogaster*.

## 2. Metodologia

### 2.1 Preparação da matéria prima

#### 2.1.1 Obtenção das folhas da planta

De uma planta de ora-pro-nóbis cultivada na área urbana do município de Itaqui/RS, Brasil (latitude 29° 9' 9" Sul, longitude 56° 33' 3" Oeste), com auxílio de uma tesoura de poda, foram cortadas partes de galhos contendo folhas, colocadas em sacos plásticos de polietileno e imediatamente encaminhadas ao laboratório de Química da Universidade Federal do Pampa – campus Itaqui.

#### 2.1.2. Secagem e elaboração da farinha

No laboratório, as folhas foram manualmente separadas dos galhos, aquecidas em micro-ondas (ME28S, Electrolux) na potência alta por dois minutos, acondicionadas em pratos de alumínio e secas em estufa com circulação e renovação de ar (SL 102/480, Solab) a 60 °C até apresentarem aspecto seco e quebradiço (cerca de 16 horas). Posteriormente, as folhas desidratadas foram moídas em micromoinho (A11, IKA) para resultar na farinha de ora-pro-nóbis, a qual foi acondicionada em pote plástico de polietileno tereftalato (PET) e conservada a -18 °C até o momento da elaboração das dietas experimentais.

### 2.2 Ensaio biológico

#### 2.2.1 Estoque de *Drosophila melanogaster*

Foi utilizado nesse estudo moscas selvagens da espécie *Drosophila melanogaster* (linhagem Harwich), obtidas Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas a Moléculas Bioativas (LAFTAMBIO), da Universidade Federal do Pampa - campus Itaqui. As moscas foram mantidas em ambiente controlado com ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura de 25 °C ± 1, e 60% de umidade. As moscas foram alimentadas com dieta padrão composta por farinha de milho (76,59%), açúcar (7,23%), gérmen de trigo (8,51%), sal (0,43%), leite em pó (7,23%) e nipagin (0,08%).

#### 2.2.2 Desenho experimental

Foram utilizadas moscas com 1 a 4 dias de idade, de ambos os sexos, divididas em quatro grupos, com 50 moscas cada. Durante sete dias, as moscas foram e expostas às seguintes dietas experimentais:

- Controle (5 g de dieta padrão);
- 5% (5 g de dieta padrão adicionada de 0,25 g da farinha de ora-pro-nóbis);
- 10% (5 g de dieta padrão adicionada de 0,5 g da farinha de ora-pro-nóbis);
- 20% (5 g de dieta padrão adicionada de 1 g da farinha de ora-pro-nóbis).

Após o período de exposição às dietas, as moscas foram utilizadas para realizar análises *in vivo* e *ex vivo*, em que as moscas foram eutanasiadas, homogeneizadas e centrifugadas de acordo com o protocolo específico para produção das amostras, e o sobrenadante foi coletado para realização das análises bioquímicas.

## 2.3 Análises *in vivo*

### 2.3.1. Teste de consumo

O consumo alimentar foi analisado segundo Lushchak et al. (2012), com modificações. Os grupos, com 15 moscas cada, foram colocados em jejum por 30 minutos, posteriormente, foram expostos às dietas experimentais com adição de 0,5% FD&C azul não brilhante, para se alimentarem por 2 horas. Após o período de consumo, as moscas dos grupos foram congeladas separadamente. Os corpos inteiros das 15 moscas de cada grupo foram homogeneizados em 200 µL de HEPES 20 mM, pH 7,5, posteriormente levados à centrífuga a 14.000 rpm por 15 minutos. As moscas que se alimentaram das dietas sem o corante foram utilizadas como branco na densidade óptica. A leitura das amostras foi realizada no sobrenadante obtido, em comprimento de onda de 629 nm. Para essa análise, foram utilizados cinco experimentos independentes (n=5), e os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle.

### 2.3.2 Peso corporal

O peso corporal foi aferido conforme referido por Meichtry et al. (2020). O peso inicial foi obtido pela pesagem de 50 a 60 moscas antes do tratamento de 7 dias, após o tratamento, as moscas foram retiradas de seus respectivos tratamentos e as sobreviventes de cada grupo foram pesadas.

### 2.3.3 Geotaxia negativa

O teste de geotaxia negativa foi feito para analisar a capacidade de escalada da mosca, conforme descrito por Charpentier et al. (2014). Em cada ensaio foram utilizadas cinco moscas de cada grupo, as quais foram previamente imobilizadas em gelo e colocadas individual e verticalmente em tubo de ensaio com diâmetro de 1,5 cm. Após 10 minutos, as moscas foram levemente agitadas para descerem ao fundo do tubo de ensaio e foi cronometrado o tempo necessário para subirem até a marca de 8 cm na parede do tubo de ensaio. Este teste foi repetido 5 vezes, com intervalos de 60 segundos. Para essa análise, foram utilizados cinco experimentos independentes (n=5). Os resultados foram analisados de acordo com o tempo médio de cada escalada.

### 2.3.4 Campo aberto

Para a atividade motora e exploratória a tarefa de campo aberto foi realizada conforme descrito por Connolly (1966), com modificações realizadas por Musachio et al. (2020). Foram utilizadas cinco moscas de cada grupo, totalizando 20 moscas, as quais foram previamente imobilizadas no gelo, depois foram transferidas individualmente para placa de Petri dividida por quadrados medindo 1x1 cm cada. Após cerca de 5 minutos, foi avaliado o número de cruzamentos entre os quadrados por cada mosca durante 60 segundos. O teste foi realizado duas vezes individualmente e foi calculado a média destes dados. Para essa análise, foram utilizados cinco experimentos independentes (n=5).

### 2.3.5 Sobrevivência e longevidade

A sobrevivência (taxa de mortalidade) foi avaliada pela contagem do número de moscas mortas a cada 24 horas durante 7 dias de exposição. A longevidade das moscas foi avaliada conforme descrito por Farombi et al. (2018), sendo adicionadas 50 moscas por grupo aos seus respectivos frascos de tratamento. A cada dois dias, as moscas eram transferidas para novos frascos contendo as respectivas dietas. Em geral, as moscas são trocadas de frascos a cada 7 dias, no entanto, foi necessário realizar a

troca a cada 2 dias porque, mesmo adicionando nipagin, ocorreu a proliferação de fungos, a partir do terceiro dia, nas dietas contendo ora-pro-nóbis. As moscas ficaram expostas ao longo de suas vidas, e o número de moscas mortas foi registrado a cada 24 horas. A observação realizada até o sétimo dia foi utilizada para traçar a curva de sobrevivência, depois foi avaliada a longevidade, com protocolo inicial igual ao da sobrevivência, porém as moscas foram contabilizadas diariamente até que não restasse nenhuma mais viva. Em ambos os testes foram realizados três experimentos independentes ( $n = 3$ ) para cada um.

## 2.4. Análises *ex vivo*

### 2.4.1 Acetilcolinesterase (AChE)

Conforme o método descrito por Ellmann et al. (1961), foram homogeneizados e centrifugados 10 corpos inteiros das moscas. Para a leitura, em uma cubeta foram colocados 950  $\mu\text{L}$  de MIX (8 mL de tampão Kpi, 1M pH 8,0 sem EDTA, 6 mL de água destilada e 2 mL de DTNB), 50  $\mu\text{L}$  de amostra e 25  $\mu\text{L}$  de acetiltiocolina 7,25 mM (2,1 mg/mL). A leitura foi realizada em comprimento de onda de 412 nm por 120 segundos. Para essa análise foram utilizados cinco experimentos independentes ( $n=5$ ). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol AcSch/h/mg}$  de proteína.

### 2.4.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

De acordo com o método proposto por Kostyuk e Potapovich (1989), foram separados 10 corpos inteiros de moscas de cada grupo, os quais foram homogeneizados com adição de 500  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES 20 mM (pH 7,0) por 60 segundos. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm/10 minutos a 4 °C. Para a leitura, em uma cubeta foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de amostra diluída, 1 mL de MIX (50 mL de tampão Kpi 0,025 M/EDTA 0,1 mM pH 10, 65  $\mu\text{L}$  de TEMED) e 50  $\mu\text{L}$  de quercetina. Os resultados foram expressos em termos da quantidade de proteína necessária para 50% da inibição da oxidação da quercetina. Quatro experimentos independentes foram realizados ( $n=4$ ). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína.

### 2.4.3 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi medida conforme descrito por Aebi (1984), com modificações. Foram separados 10 corpos inteiros de moscas de cada grupo e homogeneizados com adição de 500  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES 20 mM (pH 7,0) por 60 segundos. Para a leitura, em uma cubeta foram colocados 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 2 mL de MIX (10 mL tampão Kpi 0,25 M/EDTA 2,5 mM pH 7,0, 35 mL de água, 43  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 30% e 10  $\mu\text{L}$  Triton X100). Para essa análise, foram realizados cinco experimentos independentes ( $n=5$ ). A atividade enzimática foi monitorada por 2 minutos em comprimento de onda de 240 nm e expressa em U/mg de proteína.

### 2.4.4 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi analisada pela estimativa das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme método descrito por Ohkawa et al. (1979), com modificações. Foram utilizadas 20 moscas de cada grupo, que tiveram o corpo inteiro homogeneizado em 1.000  $\mu\text{L}$  de HEPES 20 mM (pH 7,0), posteriormente foi centrifugado a 1000 rpm/10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e adicionado de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,8%, pH 3,2), tampão de ácido acético (20%, pH 3,4) e sulfato de sódio (SDS 8,1%). Logo após, as amostras foram incubadas por duas horas a 95 °C e mediu-se a absorbância em um leitor de microplacas em comprimento de onda de 532 nm. Para essa análise foram realizados seis experimentos independentes ( $n=6$ ). Os valores de TBARS foram normalizados por concentração de proteína e expressos em nmol MDA/mg proteína.

### 2.4.5 Teor de tióis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH)

A determinação de tiol não proteico (NPSH) e proteico (PSH) foi estimada conforme descrito por (Ellman, 1959). Resumidamente, vinte moscas foram homogeneizadas em 350  $\mu\text{L}$  de tampão Tris (pH 8,0) e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min. Para as medidas de tiol proteico (PSH), utilizou-se o sobrenadante (o pellet foi reservado para uso posterior) o qual foi pipetado na microplaca, e após adicionou-se 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), após aguardou-se 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz e a leitura foi realizada em leitor de placas a 412 nm. Para medições de tiol não proteico das amostras anteriores, o pellet foi ressuspenso em tampão Tris/HCl 0,5 M pH 8,0, o sobrenadante foi removido e adicionado a

5 mM DTNB e deixado 15 minutos à temperatura ambiente protegido da luz e a leitura foi no leitor de placas a 412 nm.

#### 2.4.6 Quantificação do ânion superóxido

Conforme descrito por Morabito et al. (2010), foram homogenizadas 10 moscas por grupo, em 500 µL de tampão HEPES 20 mM (pH 7,0), por 60 segundos. O homogenato foi centrifugado 2.000 rpm por 5 minutos. Foram retiradas alíquotas de 90 µL do sobrenadante e transferidas para um *eppendorf* escuro (embalado em papel alumínio), juntamente com 10 µL de azul terazolium cloreto (NBT), onde permaneceram incubados a 37 °C durante 3 horas. Na sequência, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm. Do *eppendorff*, foram descartados 80 µL do sobrenadante e adicionado 80 µL de DMSO. As amostras foram incubadas a 37 °C por 20 minutos para dissolver os cristais de formazan. O conteúdo foi transferido para microplacas, onde a leitura foi realizada sob comprimento de onda de 550 nm. Para essa análise foram realizados cinco experimentos independentes (n=5) e os resultados expressos como porcentagem em relação ao grupo controle.

### 2.5 Quantificação de proteína

As análises de atividade de SOD, CAT, quantificação de NPS e MDA, tiveram os resultados finais corrigidos pelo valor de proteína da amostra. Para isso, foi utilizado soro bovino (BSA) como proteína padrão, de acordo com o método de Bradford (1976).

### 2.6. Análise dos resultados

Os dados foram analisados no software estatístico GraphPad Prism versão 8 (San Diego, CA, EUA), utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição gaussiana, a homocedasticidade foi verificada usando o teste de Bartlett. O teste de Dunn foi utilizado para dados que apresentaram distribuição não normal ou variância heterogênea, enquanto o teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para dados com distribuição normal e homocedástica. Todos os valores foram expressos como média (s) ± erro padrão da média (SEM). Os resultados foram apresentados em gráficos de barras, mostrando a comparação de diferentes concentrações de ora-pro-nóbis ao grupo controle. Para as curvas de sobrevivência e a longevidade foi utilizado o teste log-rank de Mantel-Cox. Em todas as análises a diferença estatística foi considerada significativa quando  $P < 0,05$ .

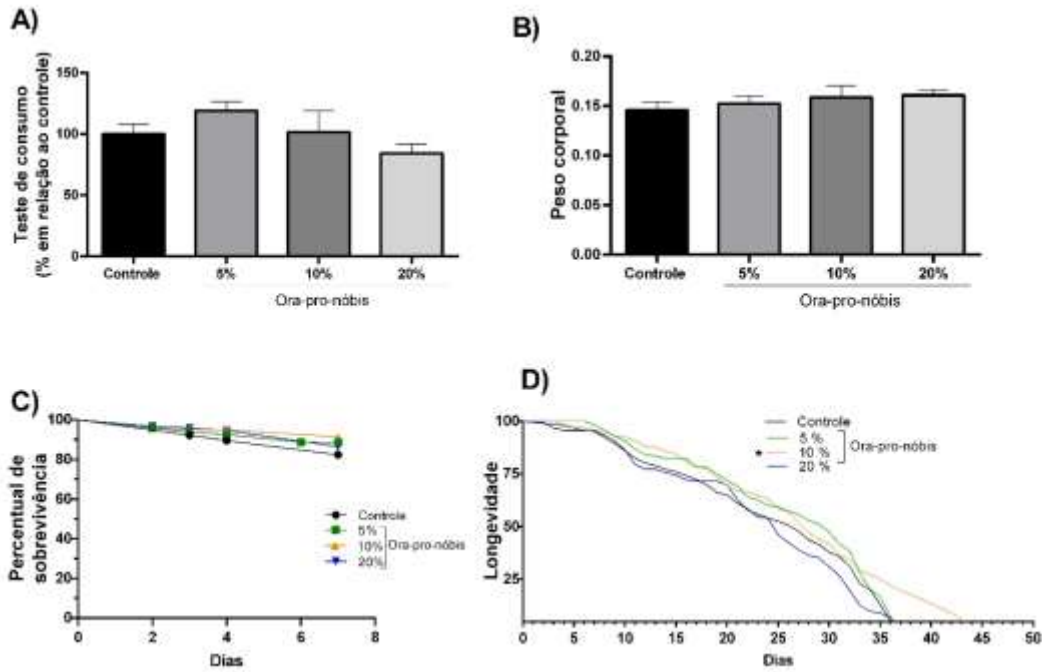
## 3. Resultados

### 3.1 Teste de consumo, peso corporal, sobrevivência a exposição de sete dias e longevidade

Inicialmente, foi observado se as moscas estavam consumindo o alimento contendo diferentes concentrações de ora-pro-nóbis (Figura 1A). As moscas demonstraram boa aceitação da adição de farinha de ora-pro-nóbis na dieta em todas as concentrações (5, 10 e 20%), pois não houve diferença estatística dos grupos tratados em relação ao controle. Da mesma forma, não foi evidenciado nenhuma alteração no peso corporal das moscas (Figura 1B).

Também foi observada a sobrevivência das moscas durante sete dias (Figura 1C), em que as dietas contendo ora-pro-nóbis, nas concentrações de 5, 10 e 20%, não diferiram significativamente do grupo controle. Já na longevidade (Figura 1D), as moscas que consumiram a dieta contendo 10% de farinha de ora-pro-nóbis viveram apresentaram maior longevidade, quando comparado ao grupo controle ( $P = 0,0019$ ).

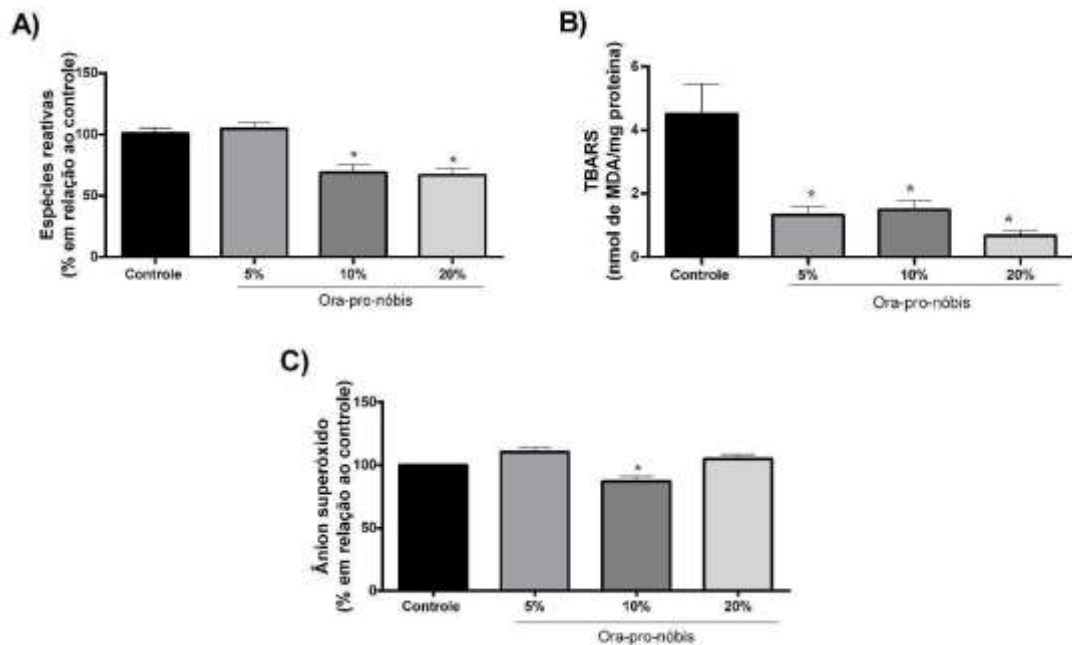
**Figura 1.** Avaliação do consumo (A), peso corporal (B), sobrevivência (C) e longevidade (D) de *Drosophila melanogaster* expostas por sete dias a dietas contendo a adição de 5, 10 e 20% de farinha de ora-pro-nóbis



Os gráficos em barras expressam a comparação entre diferentes concentrações de ora-pro-nóbis (5, 10 e 20%, separadamente), ao grupo controle. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As curvas de sobrevivência e longevidade foram comparadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. \*Indica diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

### 3.2 Determinação de indicadores de estresse oxidativo

**Figura 2.** Quantificação de espécies reativas (A), malondialdeído (MDA) (B) e ânion superóxido (C) em moscas *Drosophila melanogaster*, expostas durante sete dias a dietas contendo concentrações de 5, 10 e 20% de ora-pro-nóbis



Os gráficos em barras expressam a comparação entre diferentes concentrações de ora-pro-nóbis (5, 10 e 20%, separadamente), ao grupo controle. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). \*Indica diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

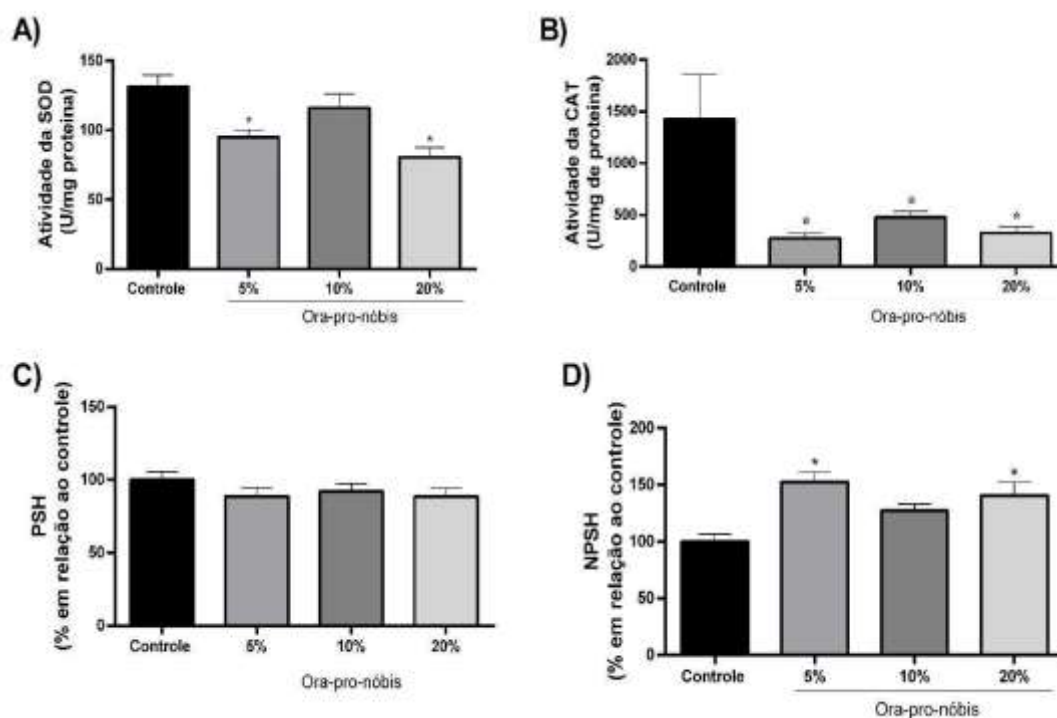


Em relação à produção de espécies reativas, as moscas expostas a dietas contendo as concentrações de 10 e 20% de ora-pro-nóbis produziram uma menor quantidade de espécies reativas, quando comparadas ao grupo controle (Figura 2A) ( $P = 0,0012$  e  $P = 0,0005$ , respectivamente). A peroxidação lipídica também foi avaliada pelo método de quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), nesse caso o malondialdeído (MDA) (Figura 2B), sendo observado que, em todas as concentrações de ora-pro-nóbis (5, 10 e 20%), houve uma diminuição nos níveis de MDA quando comparados ao grupo controle ( $P = 0,026$ ,  $P = 0,0040$  e  $P = 0,0004$ , respectivamente). Já na quantificação dos níveis de ânion superóxido, foi possível identificar que o organismo das moscas que receberam a dieta contendo 10% de farinha de ora-pro-nóbis produziram menor quantidade em relação ao grupo controle ( $P = 0,0454$ ) (Figura 2C).

### 3.3 Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas

Como defesa antioxidante enzimática, foi avaliada a atividade da enzima SOD, na qual foi observado que as moscas expostas às concentrações de 5 e 20% de ora-pro-nóbis na dieta obtiveram redução da atividade antioxidante, em comparação ao grupo controle ( $P = 0,0236$  e  $P = 0,0016$ , respectivamente) (Figura 3A). Quanto à CAT, as moscas expostas a todas as concentrações de ora-pro-nóbis (5, 10 e 20%) apresentaram redução na atividade dessa enzima quando comparadas ao grupo controle ( $P = 0,0071$ ,  $P = 0,0298$  e  $P = 0,0102$ , respectivamente) (Figura 3B). As defesas antioxidantes não enzimáticas observadas no estudo foram os níveis de tióis proteicos o NPS e não proteicos (NPSH). Para esses, não houve diferença estatística na análise de quantificação de PSH (Figura 3C), mas foi observado que as moscas expostas às concentrações 5 e 20% apresentaram níveis aumentados de NPSH em comparação ao grupo controle ( $P = 0,0019$  e  $P = 0,0149$ , respectivamente) (Figura 3D).

**Figura 3.** Efeito das dietas contendo concentrações de 5, 10 e 20% de ora-pro-nóbis sobre defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas de *Drosophila melanogaster*

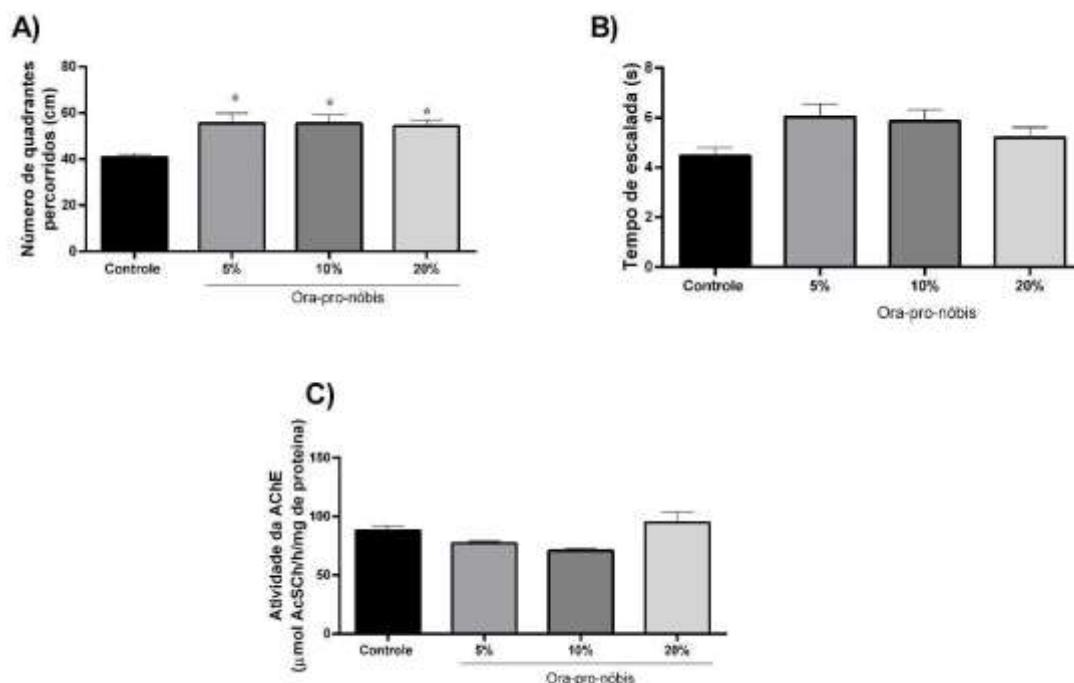


(A) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT). Quantificação dos níveis de (C) tióis proteicos (PSH) e (D) tióis não proteicos (NPSH). Os gráficos em barras expressam a comparação entre diferentes concentrações de ora-pro-nóbis (5, 10 e 20%, separadamente), ao grupo controle. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). \*Indica diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

### 3.4 Testes comportamentais e atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

No teste de campo aberto as moscas alimentadas com as dietas contendo ora-pro-nóbis (5, 10 e 20%) tiveram maior movimentação dentro da arena de teste, comparada ao grupo controle, na qual foi quantificada pelo número de cruzamentos pelos quadrados que possuíam 1 cm<sup>2</sup> cada (Figura 4 A). No entanto, no teste de geotaxia negativa não houve diferença estatística significativa dos grupos com ora-pro-nóbis, em relação ao controle (Figura 4B). E, quanto à AChE, também não foi constatada nenhuma alteração na atividade da enzima nos grupos que consumiram ora-pro-nóbis, quando comparados ao grupo controle (Figura 4C).

**Figura 4.** Avaliação da capacidade exploratória pelo teste de campo aberto (A), locomotora pelo teste de geotaxia negativa (B) e atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (C) em *Drosophila melanogaster* expostas durante sete dias a dietas com adição de 5, 10 e 20% de farinha ora-pro-nóbis



Os gráficos em barras expressam a comparação entre diferentes concentrações de ora-pro-nóbis (5, 10 e 20%, separadamente), ao grupo controle. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM). \*Indica diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

#### 4. Discussão

Nossos resultados mostram o efeito da adição de ora-pro-nóbis na dieta, no teste de consumo alimentar nas moscas, onde não foi observada diferença na quantidade ingerida por elas, demonstram uma boa aceitação e não aversão das dietas contendo 5%, 10% e 20% de farinha de ora-pro-nóbis. Esse resultado garante que todos os efeitos observados aqui, podem ser atribuídos à ora-pro-nóbis. Quanto ao peso das moscas, também não foi alterado, e isso pode ser atribuído ao consumo igualitário entre os grupos. O teste de sobrevivência certificou que o tempo de exposição foi seguro em relação às concentrações, pois também não houve diferença dos grupos tratados em relação ao controle. A dieta enriquecida com a farinha de ora-pro-nóbis, mesmo em alta concentração (20%), não afetou a taxa de mortalidade das moscas (Figura 1B), o que demonstra ausência de toxicidade até essa concentração. Esses primeiros dados nos certificam que é possível a realização do estudo utilizando essas quantidades de farinha de ora-pro-nóbis para avaliar as condições basais do status redox do organismo das moscas.

Os dados obtidos dos testes comportamentais sugerem que não houve efeito negativo na atividade locomotora das moscas. A atividade da enzima AChE, que não diferiu significativamente entre as dietas, sugere que a adição ora-pro-nóbis não compromete a função neurológica das moscas. O teste comportamental de geotaxia negativa, que visa verificar a capacidade de escalada das moscas e que é um marcador de dano, também não apresentou diferença significativa entre as dietas testadas.

Todavia, no teste de campo aberto, as moscas das dietas contendo ora-pro-nóbis tiveram um número de cruzamentos significativamente superior ao das moscas alimentadas com a dieta controle. Os efeitos antioxidante estão associados à maior locomoção das moscas, já que eles trazem vitalidade para a saúde das mesmas, assim proporcionando mais energia e integridade corporal, dentre alguns efeitos podemos citar o potencial anti-inflamatório e cicatrizante de ora-pro-nóbis observados em alguns estudos (Pinto, 2017; Sartor et al., 2010), o que auxilia para menor desgaste físico e recuperação de tecidos.

Ao analisar a longevidade, a concentração intermediária da planta obteve melhor resultado, o consumo da dieta adicionada de 10% prolongou significativamente a vida de *Drosophila melanogaster*, apesar de os outros grupos não apresentarem diferença significativa, acredita-se que as moscas alimentadas de ora-pro-nóbis obtiveram melhor qualidade de vida útil, diante dos efeitos benéficos e protetores contra doenças que o consumo da planta pode proporcionar, como pode-se ver nos resultados do presente estudo.

A análise feita para quantificar os níveis de espécies reativas (ER) mostrou que, em moscas expostas a dietas contendo as concentrações de 10% e 20% de ora-pro-nóbis, a quantidade de espécies reativas foi menor em comparação ao grupo controle, sendo as espécies reativas utilizadas para eliminar agentes agressores, se houvesse aumento exacerbado desta espécie, poderia resultar desequilíbrio e ocasionar estresse oxidativo, sendo assim, a diminuição de ER é benéfica (Vasconcelos et al., 2007).

Os níveis de TBARS foram expressivamente e significativamente menores nas dietas contendo a farinha de ora-pro-nóbis (Figura 2A), o que indica melhorias na relação oxidação-redução das células das moscas, com diminuição das espécies reativas em relação às moscas alimentadas com a dieta controle. Os baixos níveis de TBARS e ER resultaram em menores atividades das enzimas com função antioxidante, como demonstrado no resultado da enzima SOD, que apesar da concentração intermediária (10%) não diferir significativamente da dieta controle, as dietas contendo 5 e 20% de ora-pro-nóbis tiveram redução significativa da atividade da enzima SOD em comparação ao controle. O fato da quantificação de ânion superóxido ter sido menor no grupo que consumiu a dieta adicionada de 10% de ora-pro-nóbis, ao mesmo tempo em que o grupo apresentou maior atividade da enzima SOD, indica que a enzima está catalisando a dismutação do ânion superóxido para oxigênio e peróxido de hidrogênio (Ferreira & Matsubara, 1997). O grupo com 10% de ora-pro-nóbis na dieta, onde a enzima SOD teve maior atividade e menor quantificação de ânion superóxido, também apresentou maior longevidade.

A diminuição da atividade das enzimas antioxidantes sugere que as essas foram menos demandadas nas moscas que tiveram a adição de ora-pro-nóbis na dieta, que reduziu as possibilidades de estresse oxidativo devido à menor quantidade de espécies reativas. Peng et al. (2012) e Niraula et al. (2018) avaliaram a adição de mirtilo e erva-mate, respectivamente, em dietas de *Drosophila melanogaster*, mas não relataram diferenças significativas na atividade das enzimas SOD e CAT, diferente do presente estudo.

Quanto à quantificação de tióis proteicos (PSH), não obteve diferença significativa, entretanto, houve maior presença de tióis não-proteicos (NPSH), observada nas moscas das dietas contendo 5% e 20% de ora-pro-nóbis, esse aumento pode ser interpretado como forma de proteção, já que houve diminuição de espécies reativas e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Destaca-se que tanto na presença de NPSH, como na atividade de SOD, as moscas da dieta com 10% de ora-pro-nóbis não tiveram diferenças significativas nesses parâmetros em relação às moscas do grupo controle. Em ambos os casos, os gráficos apresentaram uma curva de resposta em forma de “U” ou “U” invertido, as quais são frequentemente observadas em estudos sobre efeitos farmacológicos de diferentes compostos em diversos modelos experimentais (Akwa et al., 2001; Levin et al., 2014; Nazario et al., 2015; Janner et al., 2021).

O conjunto dos resultados demonstrados acima sugere menor estresse oxidativo nas moscas que tiveram adição de ora-pro-nóbis na dieta, o que pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante na farinha da planta. Sommer et al. (2022) encontraram 1201,86 mg de ácido gálico equivalente/100 g e 3803,19 µM Trolox/100 g de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, respectivamente, em uma farinha de ora-pro-nóbis elaborada pelo mesmo procedimento e obtida na mesma localidade do presente estudo. Arena et al. (2023), que estudaram a obtenção de concentrados

proteicos a partir das folhas de ora-pro-nóbis, relataram capacidade antioxidante ainda superior, de 4193,79  $\mu\text{M}$  Trolox/100 g de uma farinha de ora-pro-nóbis. Outro estudo, de Santana et al. (2018), demonstraram a quantidade total de compostos fenólicos presentes na farinha em pó da planta colhida em Rio Verde De Mato Grosso/MS, em 132,00 EAG/100 g, que apresentaram 89,76% em atividade antioxidante. Entretanto, Sousa et al. (2014), que analisaram plantas de Uberlândia/MG, o valor variou de 95,6 a 117, 8 mg EAG/100 g, essas variações podem ocorrer devido ao manejo da planta e condições climáticas.

## 5. Conclusão

Os resultados obtidos contribuem, de forma favorável e promissora, para o uso da ora-pro-nóbis na alimentação. A adição da farinha da planta à dieta exerce um efeito protetor no organismo, retardando processos metabólicos nocivos, como o estresse oxidativo, constatado pela avaliação dos indicadores de ERs, TBARS, ânion superóxido, NPSH e atividade das enzimas CAT e SOD, o que pode ter contribuído para o aumento da longevidade das moscas.

A concentração de 5% da farinha de ora-pro-nóbis na dieta foi suficiente para reduzir o estresse oxidativo, sem diferir das maiores concentrações testadas (10 e 20%) nos indicadores TBARS e atividade da CAT. Pode-se concluir que é possível usufruir dos benefícios da ora-pro-nóbis sem a necessidade de consumir altas doses da planta, pois até a concentração de 20% não há potencialização dos efeitos positivos, embora também não apresente toxicidade.

## Referências

- Adams, M. D. et al. (2020). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105, 121-126.
- Almeida Filho, J. & Cambraia, J. (1974). Estudo do valor nutritivo do ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller). *Revista Ceres*, 21(114), 105-111.
- Almeida, M. E. F. & Corrêa, A. D. (2012). Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. *Ciência Rural*, 42(4), 751-756.
- Almeida, M. E. F.; Junqueira, A. M. B.; Simão, A. A. & Corrêa, A. D. (2014). Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como Ora-pro-nóbis. *Bioscience Journal*, 30(3), 431-439.
- Arena, R. V. P.; Ribeiro, P. F. A. & Kaminski, T. A. (2023). Obtenção e caracterização físico-química de concentrados proteicos das folhas de ora-pro-nóbis *Research, Society and Development*, 12(6), e14112642058.
- Augusta, I. M. & Nascimento, K. O. (2013) Avaliação do teor de compostos fenólicos a atividade antioxidante de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.). *Higiene Alimentar*; 27(218/219), 478-481.
- Akwa, Y.; Ladurelle, N.; Covey, D. F. & Baulieu, E. E. (2001). The synthetic enantiomer of pregnenolone sulfate is very active on memory in rats and mice, even more so than its physiological neurosteroid counterpart: distinct mechanisms? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 14033-14037.
- Barbalho, S. M.; Guiguer, É. L.; Marinelli, P. S.; Do Santos Bueno, P. C.; Pescinini-Salzedas, L. M.; Dos Santos, M. C. B.; Oshiiwa, M.; Mendes, C. G.; De Menezes, M. L.; Nicolau, C. C. T.; Otoboni, A. M., & De Alvares Goulart, R. (2016). *Pereskia aculeata* Miller Flour: Metabolic Effects and Composition. *Journal of Medicinal Food*, 19(9), 890-894.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Charpentier, G.; Louat, F.; Bonmatin, J.-M.; Marchand, P. A.; Vanier, F.; Locker, D. & Decoville, M. (2014). Lethal and sublethal effects of imidacloprid, after chronic exposure, on the insect model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science & Technology*, 48(7), 4096-4102.
- Connolly, K. (1966). Locomotor activity in *drosophila*. II. Selection for active and inactive strains. *Animal Behaviour*, 14(4), 444-449.
- Cruz, A. F.; Savicki, A.; Frentzel, A. E.; Adam, I. P.; Prado, L. O.; Franquedo, L. & Balbi, M. E. (2020). Plantas alimentícias não convencionais: utilização das folhas de "ora-pronóbis" (*Pereskia aculeata* Miller Cactaceae) no consumo humano. *Visão Acadêmica*, 21(3), 19-33.
- Day, B. J. (2014). Antioxidant therapeutics: Pandora's box. *Free Radical Biology & Medicine*, 66, 58-64.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr., V. & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Farombi, E. O.; Abolaji, A. O.; Farombi, T. H.; Oropo, A. S.; Owoje, O. A. & Awunah, M. T. (2018). *Garcinia kola* seed biflavonoid fraction (Kolaviron), increases longevity and attenuates rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 145, 39-45.

- Ferreira, A. L. A. & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 61–68.
- Freitas, E. R.; Borges, Â. S.; Trevisan, M. T. S.; Watanabe, P. H.; Cunha, A. L.; Pereira, A. L. F.; Abreu, V. K. & Nascimento, G. A. J. (2012). Extratos etanólicos da manga como antioxidantes para frangos de corte. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(8), 1025–1030.
- Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.
- Janner, D. E.; Gomes, N. S.; Poetini, M. R.; Poletto, K. H.; Musachio, E. A. S.; Almeida, F. P.; de Matos Amador, E. C.; Reginaldo, J. C.; Ramborger, B. P.; Roehrs, R.; Prigol, M. & Guerra, G. P. (2021). Oxidative stress and decreased dopamine levels induced by imidacloprid exposure cause behavioral changes in a neurodevelopmental disorder model in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology*, 85, 79–89.
- Kostyuk, V. A. & Potapovich, A. I. (1989). Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry International*, 19(5), 1117–1124.
- Levin, R.; Peres, F. F.; Almeida, V.; Calzavara, M. B.; Zuardi, A. W.; Hallak, J. E. C.; Crippa, J. A. S. & Abílio, V. C. (2014). Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: the SHR strain. *Frontiers in pharmacology*, 5(10), 1-10.
- Lushchak, O. V.; Gospodaryov, D. V.; Rovenko, B. M.; Glovyak, A. D.; Yurkevych, I. S.; Klyuba, V. P.; Shcherbij, M. V. & Lushchak, V. I. (2012). Balance between macronutrients affects life span and functional senescence in fruit fly *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology. Biological Sciences & Medical Sciences*, 67(2), 118–125.
- Manetta, G. B.; Romano, B. C.; Costa, T. M. B. & Triffoni-Melo, A. T. (2023). Utilização de farinha de Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* miller) em preparação de biscoito de polvilho. *Brazilian Journal of Development*, 9(1), 1494-1508.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2010). *Hortalças não convencionais*. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108985/1/Cartilha-Hortalicas-nao-convencionais.pdf>.
- Mattila, P. & Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 152-160.
- Meichtry, L. B.; Poetini, M. R.; Dahleh, M. M. M.; Araujo, S. M.; Musachio, E. A. S.; Bortolotto, V. C.; de Freitas Couto, S.; Somacal, S.; Emanuelli, T.; Gayer, M. C.; Roehrs, R.; Guerra, G. P. & Prigol, M. (2020). Addition of Saturated and Trans-fatty Acids to the Diet Induces Depressive and Anxiety-like Behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*, 443, 164–175.
- Morabito, C.; Rovetta, F.; Bizzarri, M.; Mazzoleni, G.; Fanò, G. & Mariggì, M. A. (2010). Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(4), 579–589.
- Nazario, L. R.; Antonioli Junior, R.; Capiotti, K. M.; Hallak, J. E. C.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S.; Bonan, C. D. & Silva, R. S. (2015). Caffeine protects against memory loss induced by high and non-anxiolytic dose of cannabidiol in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 135, 210–216.
- Niraula, P.; Ghimire, S.; Lee, H. & Kim, M. S. (2018). Ilex paraguariensis Extends Lifespan and Increases an Ability to Resist Environmental Stresses in *Drosophila*. *Rejuvenation Research*, 21(6), 497-505.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N. & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Peng, C.; Zuo, Y.; Kwan, K. M.; Liang, Y.; Ma, K. Y.; Chan, H. Y. E.; Huang, Y.; Yu, H. & Chen, Z-Y. (2012). Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 47(2), 170-178.
- Pinto, N. C. C. (2017). *Estudo das atividades anti-inflamatória e cicatrizante das folhas de Pereskia aculeata* Miller (*Cactaceae*). [Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/Genética e Biotecnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora].
- Ramalho, V. C. & Jorge, N. (2006). Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Química Nova*, 29(4), 755–760.
- Santana, C. S.; Kwiatkowski, A.; Queiros, A. M.; Souza, A. M. S. & Minas, R. S. (2018). Desenvolvimento de Suplemento Alimentar Utilizando Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*). *Cadernos de Agroecologia*, 13(2), 1–10.
- Santos, V. L. C. D. & Menegassi, B. (2021). Adição de farinha de Ora-Pro-Nóbis em pães: possibilidades de incremento proteico e de fibras na rotina alimentar brasileira. *Brazilian Journal of Health Review*, 6(4), 26031-26048.
- Sartor, C. F. P.; Amaral, V.; Guimarães, H. E. T.; Barros, K. N.; Felipe, D. F.; Cortez, L. E. R. & Veltrini, V. C. (2010). Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*. *Revista Saúde e Pesquisa*, 3(2), 149-154.
- Sharif, K. M.; Rahman, M. M.; Zaidul, I. S. M.; Jannatul A.; Akanda M. J. H.; Mohamed, A. & Shamsudin S. H. (2013). Pharmacological relevance of primitive leafy Cactuses *Pereskia*. *Research Journal of Biotechnology*, 8(12), 134-142.
- Silva, D. O. (2017). *Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e de características fenológicas e físico-químicas da planta Pereskia aculeata*. [Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas].
- Sommer, M. C.; Ribeiro, P. F. A. & Kaminski, T. A. (2022). Obtenção e caracterização físico-química da farinha de ora-pro-nóbis. *Brazilian Journal of Health Review*, 5(2), 6878-6892.
- Souza, M. S. S.; Barbalho, S. M.; Guiguer, E. L.; Araújo, A. C.; Bueno, P. C. S.; Farinazzi-Machado, F. M. V.; Lima, L. M. L.; Silva, B. C. & Mendes, C. G. (2015). Effects of *Pereskia aculeata* Miller on the biochemical profiles and body composition of wistar rats. *Journal of Biosciences and Medicines*, 3(7), 82-89.
- Sousa, R. M. F.; Lira, C. S.; Rodrigues, A. O.; Morais S. A. L.; Queiroz, C. R. A. A.; Chang, R.; Aquino, F. J. T.; Muñoz, R. A. A. & Oliveira A. (2014). Atividade antioxidante de extratos de folhas da Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos *in vitro*. *Bioscience Journal*,

Takeiti, C. Y.; Antonio, G. C.; Motta, E. M. P.; Collares-Queiroz, F. P. & Park, K. J. (2009). Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *International journal of food sciences and nutrition*, 60(1), 148–160.

Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S. & Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30(5), 1323–1338.

Wainstein Silva, L. (2019). *Potencial tecnológico das folhas da ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Miller): Uma Revisão*. [Trabalho de Conclusão de Curso, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis].

## ANEXO A – Diretrizes para autores

### 1) Estrutura do texto:

- Título em Português, Inglês e Espanhol.
- Os autores do artigo (devem ser colocados nesta sequência: nome, ORCID, instituição, e-mail). OBS.: O número do ORCID é individual para cada autor, e ele é necessário para o registro no DOI, e em caso de erro, não é possível realizar o registro no DOI).
- Resumo e Palavras-chave em português, inglês e espanhol (o resumo deve conter objetivo do artigo, metodologia, resultados e conclusão do estudo. Deve ter entre 150 a 250 palavras);
- Corpo do texto (deve conter as seções: 1. Introdução, na qual haja contextualização, problema estudado e objetivo do artigo; 2. Metodologia utilizada no estudo, bem como autores de suporte a metodologia; 3. Resultados (ou alternativamente, 3. Resultados e Discussão, renumerando os demais subitens); 4. Discussão e, 5. Considerações finais ou Conclusão);
- Referências: (Autores, o artigo deve ter no mínimo 20 referências as mais atuais possíveis. Tanto a citação no texto, quanto no item de Referências, utilizar o estilo de formatação da APA - American Psychological Association. As referências devem ser completas e atualizadas. Colocadas em ordem alfabética crescente, pelo sobrenome do primeiro autor da referência. Não devem ser numeradas. Devem ser colocadas em tamanho 8 e espaçamento 1,0, separadas uma das outras por um espaço em branco).

### 2) Layout:

- Formato Word (.doc);
- Escrito em espaço 1,5 cm, utilizando Times New Roman fonte 10, em formato A4 e as margens do texto deverão ser inferior, superior, direita e esquerda de 1,5 cm.;
- Recuos são feitos na régua do editor de texto (não pela tecla TAB);
- Os artigos científicos devem ter mais de 5 páginas.

### 3) Figuras:

O uso de imagens, tabelas e as ilustrações deve seguir o bom senso e, preferencialmente, a ética e axiologia da comunidade científica que discute os temas do manuscrito. Obs: o tamanho máximo do arquivo a ser submetido é de 10 MB (10 mega).

As figuras, tabelas, quadros etc. (devem ter sua chamada no texto antes de serem inseridas. Após a sua inserção, deve constar a fonte (de onde vem a figura ou tabela...) e um

parágrafo de comentário no qual se diga o que o leitor deve observar de importante neste recurso. As figuras, tabelas e quadros... devem ser numeradas em ordem crescente. Os títulos das tabelas, figuras ou quadros devem ser colocados na parte superior e as fontes na parte inferior.

#### 4) Autoria:

O arquivo em word enviado (anexado) no momento da submissão NÃO deve ter os nomes dos autores.

Todos os autores precisam ser incluídos apenas no sistema da revista e na versão final do artigo (após análise dos pareceristas da revista). Os autores devem ser registrados apenas nos metadados e na versão final do artigo (artigo final dentro do template) em ordem de importância e contribuição na construção do texto. OBS.: Autores escrevam o nome dos autores com a grafia correta e sem abreviaturas no início e final artigo e também no sistema da revista.

O artigo pode ter no máximo 7 autores. Para casos excepcionais é necessário consulta prévia à Equipe da Revista.

#### 5) Comitê de Ética e Pesquisa:

Pesquisas envolvendo seres humanos devem apresentar aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.

#### 6) Vídeos tutoriais:

- Cadastro de novo usuário: <https://youtu.be/udVFytOmZ3M>
- Passo a passo da submissão do artigo no sistema da revista: <https://youtu.be/OKGdHs7b2Tc>

#### 7) Exemplo de referências em APA:

- Artigo em periódico:

Gohn, M. G. & Hom, C. S. (2008). Abordagens Teóricas no Estudo dos Movimentos Sociais na América Latina. *Caderno CRH*, 21(54), 439-455.

- Livro:

Ganga, G. M. D.; Soma, T. S. & Hoh, G. D. (2012). *Trabalho de conclusão de curso (TCC) na engenharia de produção*. Atlas.

- Página da internet:

Amoroso, D. (2016). *O que é Web 2.0?* <http://www.tecmundo.com.br/web/183-o-que-e-web-2-0->

8) A revista publica artigos originais e inéditos que não estejam postulados simultaneamente em outras revistas ou órgãos editoriais.



9) Dúvidas: Quaisquer dúvidas envie um e-mail para [rsd.articles@gmail.com](mailto:rsd.articles@gmail.com) ou [dorlivete.rsd@gmail.com](mailto:dorlivete.rsd@gmail.com) ou WhatsApp (55-11-98679-6000).