

UNIVERSIDADE VILA VELHA - UVV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E ALTITUDE NO PERFIL
FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DA**
Pereskia aculeata

ALINE ROSEIRO CARVALHO

VILA VELHA
JULHO/2024

UNIVERSIDADE VILA VELHA - UVV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E ALTITUDE NO PERFIL
FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DA**
Pereskia aculeata

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do grau de Mestra em Biotecnologia Vegetal.

ALINE ROSEIRO CARVALHO

VILA VELHA
JULHO/2024

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C331i Carvalho, Aline Roseiro.
 Influência da sazonalidade e altitude no perfil fitoquímico,
 antioxidante e citotóxico das folhas da Pereskia aculeata / Aline
 Roseiro Carvalho– 2024.

 47 f. : il.

 Orientadora: Denise Coutinho Endringer.
 Dissertação (mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade
Vila Velha 2024.
 Inclui bibliografias.

 1. Biotecnologia vegetal. 2. Antioxidante - Plantas.
 3. Fotoquímico. I. Endringer, Denise Coutinho. II. Universidade Vila
 Velha. III. Título.

CDD 660.60

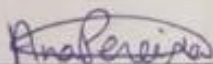
ALINE ROSEIRO CARVALHO

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E ALTITUDE NO PERFIL
FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DA
Pereskia aculeata.**

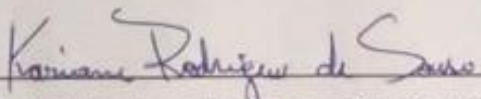
Dissertação/Tese apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia Vegetal, para a
obtenção do grau de Mestre (a) em
Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em, 30 de julho de 2024.

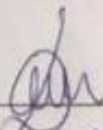
Banca Examinadora:



Dr (a). Ana Claudia Hertel (MULTIVIX)



Dr (a). Kariane Rorigues Sousa (UVV)



Dr (a). Denise Coutinho Endringer (UVV)

Orientador (a)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente rendo graças a Deus, que em sua infinita bondade me sustenta todos os dias, direciona meus passos, me abençoando com muito mais do que sou merecedora.

A minha mãe Alice e minha filha Emanueli, por todo amor revelado através do apoio constante em todos os momentos. Por serem as minhas maiores incentivadoras, me impulsionando a lugares mais altos e nunca me deixando desistir. Toda vitória que tive até o momento o mérito é compartilhado com vocês.

As queridas amigas que tive o prazer de conhecer ao longo desses dois anos. Em especial a Débora por toda disponibilidade em ajudar, compartilhar, ensinar e aprender juntas sem olhar hora, dia ou circunstância. Por dividir comigo alegrias e tristezas. Sou imensamente grata a você por tudo.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Denise Coutinho Endringer, agradeço por toda paciência e dedicação dispensadas em cada orientação, pela persistência e por todos os conselhos dados com amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Márcio Fronza e a Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Hertel por permitirem que seus laboratórios estivessem à disposição e pelo conhecimento compartilhado em todos os momentos que precisei.

Agradeço a UVV e todos os professores e funcionários do PPGBV e do Biopráticas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA

LISTA DE FIGURA

RESUMO

ABSTRACT

1.	CAPÍTULO 1.....	12
1.1	INTRODUÇÃO	12
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
1.2.1	BIODIVERSIDADE DA VEGETAÇÃO NO BRASIL.....	13
1.2.2	PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS - PANC	13
1.2.3	ORA-PRO-NÓBIS	15
1.2.4	COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL.....	17
1.2.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	18
1.2.6	CITOTOXIDADE	20
1.2.7	SAZONALIDADE E ALTITUDE	20
1.3	OBJETIVOS	22
1.3.1	OBJETIVO GERAL	22
2	CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO A BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY - ID DO MANUSCRITO BAPT-2024-0607	23
2.1	ABSTRACT	24
2.2	INTRODUCTION.....	24
2.3	MATERIALS AND METHODS	25
2.3.1	PLANT MATERIAL AND PREPARATION OF EXTRACTS.....	25
2.3.2	DETERMINING THE CENTESIMAL COMPOSITION.....	25
2.3.3	DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS.....	25
2.3.4	CHEMICAL TESTS TO DETERMINE ANTIOXIDANTE ACTIVITY.....	26
2.3.5	CELL LINEAGES AND CELL CULTURE	26
2.3.6	CELL VIABILITY TEST (MTT)	27
2.3.7	BIOLOGICAL TESTS TO DETERMINE ANTIOXIDANTE ACTIVITY	27
2.3.8	STATISTICAL ANALYSIS.....	28
2.4	RESULTS.....	28
2.4.1	CENTESIMAL COMPOSITION.....	28
2.4.2	CHEMICAL ANTIOXIDANT ACTIVITY	30
2.4.3	CELL VIABILITY (MTT)	32

2.4.4 BIOLOGICAL ANTIOXIDANTE ACTIVITY	32
2.5 DISCUSSION.....	34
2.5.1 CENTESIMAL COMPOSITION	34
2.5.2 CELL VIABILITY	35
2.5.3 BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY.....	35
2.6 CONCLUSION.....	37
2.7 ACKNOWLEDGMENTS.....	38
2.8 REFERENCES	38
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Comparação das medidas de composição centesimal das folhas da *P. aculeata* entre coletas realizadas em diferentes regiões e total em função da sazonalidade.

TABELA 2: Comparação das medidas de composição centesimal das folhas da *P. aculeata* entre diferentes estações do ano e total em função de diferentes altitudes.

TABELA 3: Comparação das medidas de atividade antioxidante química, compostos fenólicos e flavonoides das folhas da *P. aculeata* entre coletas realizadas em diferentes regiões e total em função da sazonalidade.

TABELA 4: Comparação das medidas de atividade antioxidante química, compostos fenólicos e flavonoides das folhas da *P. aculeata* entre diferentes estações do ano e total em função de diferentes altitudes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: *Pereskia aculeata* Miller.

FIGURA 2: Distribuição geográfica do gênero *Pereskia* no Brasil.

FIGURA 3: Efeito dos extratos das folhas da *P.aculeata* em função da sazonalidade e altitude avaliados na concentração de 187,5µg/ml sobre a inibição da produção dos radicais livres NO e O₂•- em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

RESUMO

CARVALHO, Aline Roseiro, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, julho de 2024. **Influência da sazonalidade e altitude no perfil fitoquímico, antioxidante e citotóxico das folhas da *Pereskia aculeata*.** Orientadora: Denise Coutinho Endringer.

A *Pereskia aculeata* é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC) de alto valor nutricional e ação antioxidante. Entre fatores que alteram o metabolismo vegetativo, destaca-se a sazonalidade e altitude. Com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil fitoquímico, o potencial antioxidante e citotóxico das folhas de *P. aculeata* em função da sazonalidade e altitude. Métodos: Realizou-se análise centesimal e quantificação de compostos fenólicos e flavonoides. A atividade antioxidante química foi avaliada pelos métodos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DHPP), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) e 2,2'-azinobis - (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) (ABTS), já a atividade intracelular foi constatada pela inibição de óxido nítrico (NO), superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Resultados: As folhas frescas apresentaram alto teor de umidade (88,27%) no inverno, as proteínas não se mostraram influenciadas pela sazonalidade e os melhores valores de cinza (3,03%), lipídeos (0,72%) e proteínas (3,34%) estão nas altitudes medianas. Os compostos fenólicos e flavonoides não apresentaram influência da sazonalidade, sendo as maiores produções no verão. Os flavonoides apresentaram maiores produções em altitudes elevadas (1,99 mg EC g⁻¹ MS). As melhores atividades antioxidantes químicas estão no verão (DPPH 2,24 µg/ml e FRAP 0,30 µg/ml) e em altitudes medianas (DPPH 1,4 µg/ml e ABTS 0,32 µg/ml). Contrastando com os efeitos intracelulares que apresentaram maior redução de NO, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 no verão e em altitudes elevadas. Os extratos não apresentaram citotoxicidade. Conclusão: Pode-se observar que plantas coletadas no verão e altitudes elevadas apresentam um melhor perfil antioxidante, não apresentando influência em seu perfil fitoquímico e citotóxico.

Palavras-chaves: *Pereskia aculeata*, Sazonalidade, Altitude, Composição Centesimal, Antioxidante, Citotoxicidade.

ABSTRACT

CARVALHO, Aline Roseiro, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, July 2024. **Influence of seasonality and altitude on the phytochemical, antioxidant and cytotoxic profile of *Pereskia aculeata* leaves**. Supervisor: Denise Coutinho Endringer.

Pereskia aculeata is considered an unconventional food plant (UFP) with high nutritional value and antioxidant action. Among the factors that alter vegetative metabolism, seasonality and altitude stand out. The aim of this study was to evaluate the phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic potential of *P. aculeata* leaves as a function of seasonality and altitude. Methods: Proximate analysis and quantification of phenolic and flavonoid compounds were performed. The chemical antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DHPP), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) methods, while the intracellular activity was verified by the inhibition of nitric oxide (NO), superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Cytotoxicity was evaluated by the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Results: Fresh leaves showed high moisture content (88.27%) in winter, proteins were not influenced by seasonality and the best ash (3.03%), lipid (0.72%) and protein (3.34%) values were at medium altitudes. Phenolic compounds and flavonoids were not influenced by seasonality, with the highest productions in summer. Flavonoids showed higher productions at high altitudes (1.99 mg EC g⁻¹ DM). The best chemical antioxidant activities were in summer (DPPH 2.24 µg/ml and FRAP 0.30 µg/ml) and at medium altitudes (DPPH 1.4 µg/ml and ABTS 0.32 µg/ml). In contrast to the intracellular effects that showed a greater reduction in NO, $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 in summer and at high altitudes, the extracts did not show cytotoxicity. Conclusion: It can be observed that plants collected in summer and at high altitudes have a better antioxidant profile, with no influence on their phytochemical and cytotoxic profile.

Keywords: *Pereskia aculeata*, Seasonality, Altitude, Centesimal composition, Antioxidant, Cytotoxicity.

1. CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A *Pereskia aculeata*, conhecida popularmente como “Ora-pro-nóbis”, é uma cactácea com grande importância alimentícia e medicinal, cuja propagação ocorre facilmente por estaquia caular ou por sementes, apresenta adaptação a climas e solos variados, tem baixa necessidade hídrica com rápido e vigoroso crescimento (Cunha et al., 2021). No âmbito medicinal a grande vantagem desta planta está na atuação redutiva dos processos inflamatórios, na recuperação de pele e nas ações antitumorais e antimicrobiana (Ortiz et al., 2023).

No contexto nutricional ela é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC) com alto teor de proteínas, fibras, vitaminas e minerais (Moraes, 2020) cabe salientar que, essa cactácea possui proteína de boa qualidade com cerca de 85% de digestibilidade, com elevados teores de aminoácidos essenciais como a lisina, leucina e valina. Apresentando um importante papel na prevenção e tratamento de condições relacionadas a deficiências proteicas, sendo conhecida como carne verde ou carne dos pobres (Sommer et al., 2022). Outro aspecto positivo é a baixa quantidade de lipídios, podendo ser utilizadas em dietas hipocalóricas. Vale ressaltar que devido a sua baixa toxicidade diversas preparações podem ser produzidas e consumidas com suas folhas como, por exemplo, saladas, farinhas, refogados, tortas e massas (Francelin et al., 2018). Sendo assim, é considerada um complemento nutricional que contribui para o alcance das necessidades nutricionais diárias além de fornecer substâncias bioativas benéficas ao organismo, apresentando ações antioxidantes (Oliveira et al., 2019; Sato et al., 2018).

Algumas substâncias bioativas importantes que são amplamente encontradas nos vegetais são os compostos fenólicos e flavonoides que apresentam ações antioxidante provavelmente por inibirem a peroxidação lipídica, a lipoxigenase, sequestrar radicais livres e quelar alguns metais (Oliveira et al., 2019). Os antioxidantes quando adicionados à alimentação agem reduzindo o risco de desenvolvimento de diversas doenças degenerativas (Garcia et al., 2019).

É de grande importância ressaltar que toda composição química dos vegetais e atividade dos metabolitos podem sofrer alterações devido a diversos fatores, como por exemplo a sazonalidade climática e variações de altitude. Vargas et al., (2017) relata que a ocorrência dessas alterações geralmente se justifica por diversos fatores

distintos às estações do ano como, por exemplo, temperatura, umidade, luz, incidência de pragas e disposição de minerais no solo. Enquanto a altitude tem uma influência direta sobre fatores como a temperatura, radiação, padrão de distribuição de chuvas, composição dos solos e na pressão parcial dos gases, fatores estes que interferem diretamente na velocidade das reações enzimáticas, que afetam processos relevantes como a respiração e fotossíntese das plantas (Portella, 2021.)

Por essa razão, tornam-se fundamental, estudos que realizem uma análise química, bioativa e citotóxica da *Ora-pro-nóbis* evidenciando a influência que a sazonalidade e altitude exercem sobre suas características. Tal conhecimento viabiliza traçar processos biotecnológicos para desenvolver genótipos otimizados em diferentes climas e regiões que levem em consideração as características edafoclimáticas. Esses dados também podem ajudar a orientar os agricultores e selecionar cultivares mais adequados, bem como fornecer informações sobre estratégias para programas de melhoramento genético.

A fim de explorar a influência da sazonalidade e altitude sobre o perfil fitoquímico, antioxidante e citotóxico das folhas da *P. aculeata* o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo considerando essas variantes.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Biodiversidade da vegetação no Brasil

O Brasil apresenta uma grande extensão territorial que engloba diversas zonas climáticas o que por sua vez favorece o desenvolvimento das mais vastas espécies de vida. A biodiversidade brasileira é composta por mais de 46mil espécies vegetais atualmente conhecidas e distribuídas em todos os seis biomas do país: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Brasil, 2022). A flora brasileira se destaca com importante papel nas indústrias de alimentos, cosméticos, herbicidas e como a principal fonte renovável para o desenvolvimento de novos fármacos. O potencial químico bem como a diversidade estrutural das substâncias naturais encontradas nas plantas brasileiras tem recebido atenção especial dos pesquisadores que buscam contribuir com o avanço da ciência e da tecnologia (Filho, 2010).

1.2.2 Plantas Alimentícias não convencionais - PANC

Existem inúmeras plantas que ainda não foram completamente estudadas pela comunidade técnico-científica e exploradas pela sociedade, algumas são

denominadas plantas alimentícias não convencionais (PANC) e o fato de não serem completamente conhecidas pela sociedade resulta em um consumo regional e limitado (Brasil, 2010). O Brasil apresenta uma matriz agrícola de monoculturas e padrões alimentares industrializados, e esses fatores também contribuem para o desconhecimento e a não utilização de diversas espécies botânicas nativas que apresentam relevante potencial econômico e nutricional (Paschoal et al., 2016).

No Brasil existem cerca de 3 mil espécies documentadas de PANC e internacionalmente elas são conhecidas como espécies negligenciadas ou subutilizadas (Neglected and Underutilized Species – NUS), onde os estudos estão relacionados à Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) e a estratégias de combate à fome e pobreza (Oliveira et al., 2018; Liberato et al., 2019).

As PANCs são consideradas alimentícias pois possuem partes que podem ser introduzidas na alimentação humana como, por exemplo, as raízes, tubérculos, rizomas, talos, flores, folhas, frutos, bulbos e sementes. Porém, geralmente, não estão inseridas no cardápio convencional de determinadas populações (Kinupp et al., 2007). Elas apresentam um aproveitamento total ou parcial e não são difíceis de serem encontradas, normalmente são vistas em quintais e terrenos abandonados sendo geralmente confundidas com matos ou ervas daninhas (Pereira et al., 2020).

Essas plantas contribuem para a biodiversidade alimentar, para o fortalecimento da segurança alimentar e nutricional (SAN), para geração de renda e sustentabilidade (Jacob, 2020).

Sendo assim as PANCs caracterizam-se como uma ótima alternativa para melhorar qualitativamente a alimentação da população de baixa renda, visto que, são baratas, de fácil cultivo e geralmente apresentam valores nutricionais e compostos bioativos eficazes terapeuticamente no tratamento de diversas doenças e na manutenção do organismo (Moraes et al., 2020).

Seu consumo geralmente está associado a benefícios que promovem proteção à saúde, tendo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e anticancerígenos, que são atribuídos aos constituintes fitoquímicos presentes nessas plantas, como compostos fenólicos, vitaminas, carotenoides, flavonoides e minerais (Oliveira, et al., 2019(a)). As PANCs geralmente apresentam teores de nutrientes significativamente maiores que as plantas convencionais, com isto, uma dieta contendo tais hortaliças pode fornecer maior valor nutricional referente aos macros e micronutrientes (Rodrigues et al., 2018).

Vale ressaltar que a utilização das PANCs faz parte da cultura, das práticas agrícolas e da identidade das muitas regiões do planeta, com isso a utilização do termo pode variar de região para região, ou seja, determinada planta pode ou não ser convencional em determinada região, por exemplo, plantas amazônicas não são convencionais para um paulista, porém são convencionais para um morador de Belém ou Manaus (Ranieri, 2017).

Dentre as PANCs a *P. aculeata* vem se destacando com cada vez mais visibilidade por possui propriedades fitoterápicas, elevado valor nutricional e ser de fácil cultivo (Vargas et al., 2017).

1.2.3 Ora-pro-nóbis

A *P. Aculeata* popularmente conhecida como Ora-pro-nóbis, expressão que vem do latim e significa “Rogai por nós”, é um vegetal que apresenta a seguinte classificação taxonômica: reino Plantae, classe Magnoliopsida, ordem Caryophyllales, família Cactaceae, gênero *Pereskia* e espécies *Pereskia aculeata* Miller e *Pereskia grandifolia* How (Almeida et al., 2014)

Seu cultivo é fácil e simples, com elevada produtividade, fácil propagação e adaptação em diferentes climas e solos variados, apresenta resistência à elevadas temperaturas, pouca tolerância ao encharcamento do solo conferindo baixa necessidade hídrica, baixa incidência de pragas e baixa necessidade de fertilização. Possui folhas desenvolvidas, suculentas, lisas, largas, com coloração verde-escura, medindo cerca de 10 cm de comprimento, suas flores são pequenas e brancas com centro alaranjado, os frutos também são pequenos e amarelados, e em seu caule existe a presença de pseudo espinhos (Figura 1), (Silva et al., 2017; Moraes et al., 2019).

Figura 1 – *Pereskia aculeata* Miller



Fonte: Elaborado pelo autor

Sua floração acontece entre os meses de janeiro e abril, enquanto a formação dos frutos ocorre entre junho e julho (Rodrigues et al., 2019).

A Ora-pro-nóbis possui características de trepadeira, sendo uma planta perene, com crescimento típico de arbusto e originária das Américas. Nacionalmente pode ser encontrada nas regiões Sudeste, Sul, partes da região nordeste e Centro-Oeste, especialmente na região de Minas Gerais em Sabará, onde seu consumo é bastante famoso e, provavelmente, já é considerado convencional. A depender das regiões pode ser conhecida popularmente como cereja-de-barbados, lobrobó, cipósanto, trepadeira-limão, groselha-da-américa, espinho-de-santo-antônio e rosamadeira (Figura 2), (Moraes et al., 2019; Ranieri, 2017).

Figura 2 – Distribuição geográfica do gênero *Pereskia* no Brasil



Fonte: Flora do Brasil 2020, 2018

Em relação ao seu consumo torna-se relevante evidenciar que suas folhas são ricas em proteínas de boa digestibilidade, aminoácidos essenciais (lisina, leucina e valina), minerais (cálcio, magnésio, manganês, zinco e ferro), vitaminas (A, C e ácido fólico) e compostos bioativos com ação antioxidante (Lago et al., 2019). Seu consumo regular contribui significativamente para evitar e prevenir uma série de distúrbios crônico-degenerativos, por meio de sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Francisco, 2018).

A ausência de toxicidade e o elevado teor de proteínas das folhas vem elevando o uso da espécie nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e tecnológicas (Silva et al., 2017; Amaral, 2018).

Dessa forma, pode-se perceber o grande potencial da *P. aculeata* frente a uma nutrição alternativa, complementar e econômica (Cruz et., al., 2020).

1.2.4 Composição Nutricional

A composição nutricional de um alimento é essencial para entender o seu valor nutricional. Ela abrange as quantidades de macro e micronutrientes presentes neste alimento, ou seja, verifica a quantidade de carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, minerais, fibras e água contidas neste alimento (Primitivo et al., 2022). Uma das formas de identificação da composição nutricional dos alimentos é a análise da composição centesimal, que é uma ferramenta fundamental na avaliação da qualidade nutricional dos alimentos que expressa a proporção dos nutrientes em relação ao peso de 100g do produto analisado (Siqueira et al., 2023).

O conhecimento sobre a composição nutricional dos alimentos consumidos é de suma importância para a realização de uma orientação nutricional eficaz baseada na utilização de elementos visando o desenvolvimento local e diversificação da alimentação, em contrapartida proporcionando a massificação de dietas monótonas e desequilibradas (Taco, 2011).

A identificação da composição centesimal pode ser realizada através de diversos métodos como o de GoldFish para quantificação de lipídios usando como líquido extrator hexano ou éter de petróleo, umidade em estufa ventilada, minerais por incineração e proteínas pelo método Kjeldahl (Aoac, 2019).

Esta composição também sofre variações devido a inúmeros fatores internos e externos a planta, como por exemplo, origem e localização geográfica, métodos de cultivos, processamentos industriais e fatores ambientais como as variações climáticas. Essas variações acarretam implicações diretas na segurança alimentar e nutricional da população (Vargas et al., 2017).

A *P. aculeata* tem sido objeto de diversos estudos devido ao seu significativo valor nutricional. As análises de sua composição nutricional revelaram um perfil rico em proteínas de alta qualidade por apresentarem excelente digestibilidade e presença de aminoácidos essenciais, como lisina e triptofano, fibras dietéticas, vitaminas (como A, C e do complexo B) e minerais (incluindo cálcio, ferro e magnésio), identificando assim

notáveis propriedades nutricionais (Sommer et al., 2022). Além disso, destacasse a presença de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, contribuindo significativamente para a saúde cardiovascular, a melhoria do sistema imunológico e a prevenção de doenças crônicas, evidenciando um relevante potencial como um alimento funcional promissor possivelmente ocasionado devido à presença desses compostos bioativos (Nogueira et al., 2023).

1.2.5 Atividade Antioxidante

Os compostos bioativos antioxidantes são metabolitos oriundos do metabolismo secundário das plantas, definidos como quaisquer substâncias químicas presentes nos alimentos que retarda, previne ou remove o dano oxidativo para uma molécula alvo. Fazem parte desses compostos uma variedade de moléculas, como os polifenóis, carotenoides, flavonoides, ácidos graxos ômega, fitoesteróis, ácido ascórbico entre outros (Gulcin, 2020). E estes apresentam inúmeras propriedades benéficas ao organismo como, por exemplo, atividades antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias, antifúngicas, antibactericidas entre outras (Souza et al., 2016; Pinto et al., 2015; Pinto et al., 2016).

Garcia et al. (2019) analisando as folhas da Ora-Pro-Nóbis advindas da região de Joinville, Santa Catarina encontraram a presença de diversos compostos fenólicos, como por exemplo, derivados do ácido cafeico e flavonoides derivados de glicosídeo de quercetina, kaempferol e isorhamnetina, sendo o Ácido Cafeico correspondente a 49% do conteúdo total de fenólicos. Em contrapartida Souza (2014) ao analisar os fenólicos do extrato de folhas secas da Ora-Pro-Nóbis cultivadas na região de Viamão, Rio Grande do Sul (30°7'16.17"S 51°05'09.12"O) verificou a presença do Ácido Clorogênico, Ácido P-cumárico e do Ácido Ferúlico. A presença desses ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados nas amostras indica que elas podem possuir uma alta atividade antioxidante, embora seja necessária a realização de mais análises comprobatórias.

A atividade antioxidante desses compostos é particularmente uma propriedade importante, pois ajuda a reduzir os danos oxidativos que todos os componentes celulares estão sujeitos a sofrer. As proteínas, os lipídios e os ácidos nucleicos são exemplos relevantes de moléculas que apresentam alterações funcionais quando oxidadas por agentes causadores de danos oxidativos como os radicais livres (Cetin Cakmak & Gulcin, 2019; Huyut et al., 2017; Oztaskin et al., 2017).

Os radicais livres, por definição, são átomos ou moléculas altamente reativas, que contêm número ímpar de elétrons na última camada eletrônica e este não emparelhamento de elétrons da última camada é que lhes confere esta alta reatividade, tornando-os ávidos por retornar ao estado de equilíbrio eletrônico. Os compostos bioativos com atividade antioxidante participam desta reação química através da doação de elétrons proporcionando o emparelhamento dos elétrons permitindo que ele retorne ao estado de equilíbrio eletrônico (Liguori et al., 2018; Gulcin, 2012)

Diversas são as metodologias existentes para identificar a presença desses compostos bioativos e avaliar a atividade antioxidante dessas substâncias. Métodos químicos e biológicos são amplamente empregados para determinar a capacidade antioxidante das amostras, visando compreender seu papel na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Os métodos químicos frequentemente utilizados para mensurar a atividade antioxidante das plantas são descritos por meio de técnicas espectrofotométricas como DPPH e ABTS que baseiam-se no mecanismo de ação relacionado ao sequestro dos radicais livres, e o FRAP que está relacionado ao mecanismo de redução férrica (Alves, 2020).

O DPPH é um método que tem como base a redução da absorbância a 517nm do radical DPPH por antioxidantes presentes nas amostras (Kim et al., 2002 e Moraes et al., 2020). A concentração necessária do antioxidante para reduzir 50% do radical livre DPPH denomina-se IR_{50} sendo que quanto menor o IR_{50} , maior a atividade antioxidante das amostras (Dorman et al., 2003). Já o ABTS é um ensaio que age por meio da reação com persulfato de potássio com absorbâncias de 734nm. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do ABTS⁺ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional, apresentando uma coloração azul esverdeado (Henriquez et al., 2002). O FRAP se baseia na habilidade que os antioxidantes apresentam de reduzirem, em meio ácido, o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul (Ferreira et al., 2016).

Quando se almeja analisar a biologia celular os métodos químicos utilizados isoladamente não são os mais indicados, visto que não predizem as reações biológicas que ocorrem de forma intracelulares, os mecanismos envolvidos com as ações antioxidantes a nível intracelular geralmente estão ligados a mecanismo enzimáticos, através da ação das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, essas enzimas podem atuar prevenindo e/ou controlando a

formação de radicais livres e, por consequência, a ocorrência dos danos oxidativos (Alves, 2020).

Dentre os métodos existentes para avaliação da atividade antioxidante intracelular podemos citar os ensaios de quantificação dos radicais livres Superóxido e Óxido Nítrico. Além dos ensaios com o Peróxido de hidrogênio que avaliam os danos que este composto pode acarretar as linhagens de células testadas (Peisino, 2018). Embora o peróxido de hidrogênio não seja um radical livre, exerce um papel importante no quadro de estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares e facilmente se converter em um radical hidroxil, sendo esta propriedade seu maior efeito deletério as células (Cercato, 2021).

1.2.6 Citotoxicidade

Os métodos de culturas celulares representam uma importante contribuição para estudos de absorção, metabolismo e toxicidade, de diferentes substâncias (Trotter et al., 1993; De Angelis et al., 1994 e During et al., 2004).

A citotoxicidade da *P. aculeata* comumente é avaliada por meio do ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio] para a determinação da viabilidade celular. Este ensaio avalia a viabilidade celular baseado em uma reação colorimétrica onde o MTT penetra nas mitocôndrias metabolicamente viáveis sendo clivado pela enzima succinato desidrogenase (NADPH), gerando cristais de formazana. A formação desses cristais é diretamente proporcional ao número de células viáveis do experimento (Garcia et al., 2015).

Silva et., al., (2017) em pesquisa sobre a toxicidade da *P. aculeata* relataram baixa toxicidade da planta quando administrada por via oral enquanto Maciel et., al., (2023) em pesquisas com as linhagens celulares epiteliais Queratinocitos (HaCaT) e Fibroblastos (L929), encontraram viabilidade celular acima de 70% em todas as concentrações testadas. O que Segundo a ISO 10993-5 (2009) é um achado favorável, visto que uma amostra tem efeito citotóxico quando apresenta redução da viabilidade celular em mais de 30%, o que não foi observado neste estudo para nenhum dos extratos, onde a viabilidade foi mantida acima de 70%.

1.2.7 Sazonalidade e Altitude

Podemos evidenciar uma importante relação entre a sazonalidade e as variações de altitude, isso porque a altitude influencia diretamente no controle e nos padrões de

diversos fatores sazonais, como por exemplo, na amplitude térmica diária, na alteração dos níveis de precipitação, na velocidade dos ventos, na qualidade e composição química do solo, na pressão atmosférica, na condição da cobertura de nuvens e na intensidade de radiação. Um dos principais fatores sazonais de grande importância que sofre influência das variações de altitude é a temperatura, que geralmente tende a decrescer à medida que a altitude aumenta.

Esses fatores quando associados podem alterar os aspectos morfológicos, fisiológicos, e genéticos das plantas, seu crescimento e desenvolvimento ótimo só podem ser alcançados se os diversos processos envolvidos no metabolismo e no desenvolvimento estiverem em harmonia (Portella,2021).

Todos esses ajustes pelos quais as plantas passam com a finalidade de evitar, tolerar e até mesmo resistir a presença dessas adversidades encontradas no meio, produzem alterações não somente em sua composição, mas também no seu nível de atividade produtiva dos metabolitos primários e secundários, conhecidos como compostos fitoquímicos, (Souza & Luttge, 2015 e Figueiredo, 2010).

Gobbo-Neto e Lopes (2007) apontam variações acarretadas pela sazonalidade na produção de praticamente todas as classes de metabolitos secundários, como por exemplo, óleos essenciais, ácidos fenólicos, saponinas, flavonoides, alcaloides entre outros. Segundo Figueiredo (2010) a produção desses metabólicos realmente é influenciada por diversos fatores como as variações climáticas e fatores ambientais.

As alterações nos metabolismos das plantas evidenciadas nas diversas variações de altitudes e estações do ano ocorrem não somente pelo fato de que os compostos fenólicos são agentes de defesa produzidos pelas plantas contra vários tipos de estresses causados por patógenos ou condições ambientais adversas, como o estresse oxidativo. Mas também pelo fato de que as funções metabólicas das plantas se encontram em plena atividade a partir da primavera até final do verão, período de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas, neste período ocorre uma grande síntese e armazenamento dos compostos bioativos, que por consequência, melhora a atividade antioxidante das plantas (Sartoretto,2020).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da sazonalidade climática e diferentes altitudes no perfil fitoquímico, antioxidante e citotóxico das folhas da *P. aculeata*.

1.3.2 Objetivos Específicos

A – Identificar a composição centesimal quantificando umidade, cinzas, proteínas e lipídeos por métodos específicos;

B – Quantificar o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides utilizando métodos colorimétricos;

C – Avaliar a atividade antioxidante química através dos ensaios de FRAP, DPPH, ABTS;

D – Avaliar a atividade antioxidante biológica por meio dos ensaios de quantificação de redução de Óxido Nítrico, Superóxido e Peróxido de Hidrogênio em linhagens celulares de macrófagos murinos RAW 264.7;

E – Identificar a citotoxicidade por meio do ensaio MTT com linhagens celulares de fibroblastos L929 e macrófagos murinos RAW 264.7

2 CAPÍTULO 2 – Artigo Científico submetido a Brazilian Archives of Biology and Technology - ID do manuscrito BAPT-2024-0607

Original Article

Influence of seasonality and altitude on the phytochemical, antioxidant and cytotoxic profile of *Pereskia aculeata* leaves.

Aline Roseiro Carvalho¹

<https://orcid.org/0009-0009-3590-6850>

Débora Correia Santana¹

<https://orcid.org/0000-0003-1971-0785>

Tamires Cruz dos Santos²

<https://orcid.org/0000-0002-7612-3897>

Marcio Fronza¹

<https://orcid.org/0000-0002-7316-8598>

Denise Coutinho Endringer¹

<https://orcid.org/0000-0001-9396-2097>

¹Vila Velha University, Department of Plant Biotechnology, Vila Velha, Espírito Santo, Brazil. ²Vila Velha University, Department of Pharmaceutical Sciences, Vila Velha, Espírito Santo, Brazil.

Editor-in-chief: (filled in by the administrator.)

Associate Editor: (Filled in by the administrator.)

Received: DD-MM-YYYY; Accepted: DD-MM-YYYY. (Filled in by the administrator.)

*Correspondence: alineroeirocarvalho@gmail.com; Tel.: +55-27- 998530647

HIGHLIGHTS

- Centesimal composition is not significantly influenced by seasonality;
- During the summer and at high altitudes, they have better antioxidant activity;
- Total phenolic compounds were not influenced by seasonality and altitude;
- Seasonality and altitude do not influence the plant's cytotoxic profile.

2. 1 ABSTRACT

Pereskia aculeata is an unconventional food plant with high nutritional value and antioxidant action. Seasonality and altitude are among the factors that alter vegetative metabolism. This study aimed to evaluate the phytochemical profile, antioxidant, and cytotoxic potential of *P. aculeata* leaves as a function of seasonality and altitude. Methods: Centesimal analysis (moisture, ash, proteins, and lipids) was carried out using specific methods, and phenolic compounds and flavonoids were quantified using colorimetric methods. Chemical antioxidant activity was measured using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DHPP), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-azinobis - (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) (ABTS) methods, and intracellular activity was verified through the inhibition of nitric oxide (NO), superoxide (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Cytotoxicity was assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Results: The fresh leaves had a high moisture content of 88.27% in winter, the proteins were not influenced by seasonality, and the best values for ash (3.03%), lipids (0.72%), and proteins (3.34%) were in the middle latitudes. Seasonality did not influence Phenolic compounds and flavonoids, but the highest yields were in summer. Flavonoids showed higher production at higher altitudes (1.99 mg EC g⁻¹ MS). The best chemical antioxidant activities are in summer (DPPH 2.24 µg/ml and FRAP 0.30 µg/ml) and at medium altitudes (DPPH 1.4 µg/ml and ABTS 0.32 µg/ml). In contrast to the intracellular effects, there is a more significant reduction in NO, O₂⁻ and H₂O₂ in summer and at high altitudes. The extracts showed no cytotoxicity. Conclusion: Plants harvested in the summer and at high altitudes showed the best antioxidant profile, with no influence on the other profiles.

Keywords: *Pereskia aculeata*, Seasonality, Altitude, Centesimal Composition, Antioxidant, Cytotoxicity.

2.2 INTRODUCTION

Pereskia aculeata, popularly known as "Ora-pro-nóbis," is a cactaceous plant with great food and medicinal importance, which propagates easily by stem cuttings or seeds, adapts to varied climates and soils, has low water requirements, and grows quickly and vigorously. [1]. In the medicinal field, this plant's great advantage lies in its ability to reduce inflammatory processes and recover skin. It also has anti-tumor and anti-microbial properties [2].

In the nutritional context, it is considered an unconventional food plant with a high content of protein, fiber, vitamins, and minerals [3] it should be noted that this Cactaceae has good quality protein with around 85% digestibility, with high levels of essential amino acids such as lysine, leucine and valine. It plays a vital role in the prevention and treatment of conditions related to protein deficiencies and is known as green meat or meat of people with low incomes [4]. Another positive aspect is its low lipid content, which can be used in low-calorie diets. Due to its low toxicity when ingested orally, various preparations can be produced with its leaves, such as salads, flours, stews, pies, and pasta [6]. As such, it is considered a nutritional supplement that contributes to meeting daily nutritional needs and provides bioactive substances that benefit the body, showing antioxidant actions [7,8].

Some important bioactive substances widely found in vegetables are phenolic compounds and flavonoids. These have antioxidant action by inhibiting lipid peroxidation and lipooxygenase, sequestering free radicals, and chelating some metals. When added to the diet, antioxidants reduce the risk of developing various degenerative diseases [9].

It is important to note that various factors, such as seasonality and altitude, can alter all this chemical composition and metabolite activity. Vargas [10] reports that these changes are generally due to various factors other than the seasons, such as temperature, humidity, light, the incidence of pests, and the arrangement of minerals in the soil. At the same time, altitude directly influences factors such as temperature, radiation, rainfall distribution patterns, soil composition, and the partial pressure of gases. These factors directly interfere with the speed of enzymatic reactions, which affect relevant processes such as plant respiration and photosynthesis [11].

For this reason, studies that carry out a chemical, bioactive and cytotoxic analysis of *Ora-pro-nóbis* highlighting the influence that seasonality and altitude have on its characteristics, are essential. This knowledge makes it possible to design biotechnological processes to develop genotypes optimized for different climates and regions, considering soil and climate characteristics. This data can also help farmers produce and select more suitable cultivars and provide information on strategies for genetic improvement programs.

The aim of this work was to conduct a comparative study considering the summer and winter climatic seasons when collecting plant material at three different altitudes to explore the influence of seasonality and altitude on the phytochemical, antioxidant, and cytotoxic profile of *P. aculeata* leaves.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Plant material and preparation of extracts

The leaves of *P. aculeata* were collected during the summer and winter seasons, in January and July 2023, in three municipalities in Espírito Santo at different altitudes: Rio Novo do Sul, Cariacica and Domingos Martins. The geographical coordinates were 20°52'17.8"S 40°56'48.8"W, 14m above sea level; 20°15'08.8"S 40°25'40.4"W, 76m above sea level and 20°21'47.4"S 40°38'20.2"W, 295m above sea level, respectively. The species were identified and deposited in the VIES Herbarium of the Federal University of Espírito Santo and all the experiments were carried out in the Laboratories of the Biopráticas Complex of the Vila Velha University (20°21'01"S 40°18'02"W).

To prepare the ethanolic extracts, the plant material was sanitized, weighed, and macerated with the extracting solvent 70% ethanol in a ratio of 1:10. The extract was then vacuum filtered, rota evaporated, and freeze-dried to obtain the dry matter. The freeze-dried extracts were then resuspended according to the specific methods of each methodology used.

2.3.2 Determining the centesimal composition

The centesimal characterization was carried out on the fresh samples, and all the analyses were carried out in triplicate, with the results expressed in a sample of 100 g. Moisture content was analyzed using the gravimetric method with oven drying at 105 °C. Ash quantification was determined by gravimetry after calcification in a muffle furnace at 550 °C. The protein content was determined by the Kjeldahl method, and then the total nitrogen result in crude protein using a factor of 6.25 [12] Total lipids were determined using the Goldfish method according to the methodology of the Adolfo Lutz Institute [13].

2.3.3 Determination of phenolic compounds and flavonoids

The phenolic compounds were determined according to the methodology used by Krepsky et. al., [14] with modifications for use in 96-well microplates. To carry out the analysis, 25 µl of

each extract (3,000;1,500; 0,7500; 0,3750; 0,1875; 0,0938; 0,0469; 0,0234 µg/ml) and 10 µl of 10% *Folin Ciocalteu* plus 215 µl of 7.5% sodium carbonate were pipetted and after 3 minutes, the absorbance was read at a wavelength of 715 nm in ELISA. The blank was analyzed with methanol, the gallic acid standard curve was used to express the results in milligram equivalents of gallic acid per gram of sample and all the analyses were carried out in triplicate.

Flavonoid determinations were also carried out according to the methodology used by Krepsky et. al., [14] with modifications for use in 96-well microplates. To carry out the analysis, 180 µl of the extract and 15 µl of 2.5% NaNO₂ were pipetted in. After six minutes, 15 µl of 10% AlCl₃ were added and after five minutes, 50 µg of 1M NaOH were added. After 10 minutes, the ELISA was read at a wavelength of 415 nm. In this analysis, the standard curve with quercetin was used to express the results in milligram equivalents, and all the analyses were carried out in triplicate.

2.3.4 Chemical tests to determine antioxidante activity

Ferric reducing antioxidant power test - FRAP

The FRAP assay was carried out by pipetting 30 µL of the extracts at different concentrations and adding 270 µL of the FRAP reagent. After 10 minutes of reaction, the absorbance was read at a wavelength of 595 nm in ELISA. The results were expressed as IR50 (minimum concentration needed to reduce 50% of the reagent). Methanol was used as a blank. All experiments were carried out in triplicate, and the data is representative of at least three independent experiments [15].

DPPH radical scavenging test

To carry out the DPPH test, 20µl of each extract at different concentrations and 280 µl of DPPH radical were pipetted into a 96-well microplate. After 60 minutes, the results were read at a wavelength of 517 nm using ELISA. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample and as the IR50 (minimum concentration needed to reduce 50% of the free radical). Methanol was used as a blank all experiments were carried out in triplicate and the data is representative of at least three independent experiments [16].

Cationic radical scavenging test - ABTS

The ABTS assay was carried out by pipetting 30µl of each extract at different concentrations into a 96-well microplate and adding 270 µl of the ABTS radical. After 6 minutes, the absorbance was read at a wavelength of 734 nm in ELISA. The results were expressed as IR50 (the minimum concentration needed to reduce 50% of the free radical). Methanol was used for the blank. All experiments were carried out in triplicate, and the data is representative of at least three independent experiments [16].

2.3.5 Cell Lineages and Cell Culture

The cell lines used were L929 Fibroblasts and RAW 264.7 Murine Macrophages, cultivated in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% antibiotics (Penicillin and Streptomycin) and kept in a humidified incubator at 37° C with a 5% CO₂ atmosphere. Cell passages were carried out every 2 or 3 days when approximately

80% confluence was observed. Once the cells were mature, the intracellular experiments were carried out.

2.3.6 Cell Viability Test (MTT)

Cell viability was determined using the colorimetric MTT reduction method proposed by Mosmann [17]. The L929 and RAW 264.7 cells were incubated for 24 hours in 96-well plates. After observing cell confluence, 50 μ L of different concentrations of samples (1500, 750, 375, 187.5 μ g/ml) were added and again incubated for 24 hours at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. On the third day, the supernatant was removed, and 100 μ L of MTT was added and incubated again for 2 hours then the MTT was aspirated, and 100 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to dissolve the formazan crystals for 3 minutes on a plate shaker. The reading was measured at a wavelength of 595 nm in ELISA. The experiments were carried out in triplicate, and the data represented at least three independent experiments conducted with a control group.

2.3.7 Biological tests to determine antioxidante activity

Determination of Nitric Oxide in RAW 264.7

Nitrite was measured to indicate nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages activated by lipopolysaccharides (LPS). The cells were cultured and incubated for 24 hours at 37° C with 5% CO₂ until approximately 80% confluence. The following day, the cells were exposed to the best concentration of the samples identified by the % cell viability (187.5 μ g/ml) 60 minutes before the addition of LPS. After 24 hours, 50 μ L of the supernatant was removed, to another plate and used to quantify nitrite concentrations using the Griess reaction [17]. To this supernatant was added 50 μ L of the 1:1 Griess reagent made up of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid (SULFA) and 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride in water (NEED). After 10 minutes, the ELISA was read at a wavelength of 540nm. The nitrite concentration was calculated by linear regression using a standard sodium nitrite solution [19]. The experiments were carried out in triplicate, and the data is representative of at least three independent experiments.

Determination of Superoxide Radical in RAW 264.7

The superoxide radical quantification test was carried out to determine the inhibitory effect of the extracts on superoxide radical production in RAW 264.7 macrophages activated by lipopolysaccharide (LPS). The cells were cultured and incubated for 24 hours at 37° C with 5% CO₂ until approximately 80% confluence. The following day, the cells were exposed to the best concentration of the samples identified by the % cell viability (187.5 μ g/ml) 60 minutes before the addition of LPS. After 24 hours, the supernatant was removed and 50 μ L of nitrobenzyl tetrazolium chloride (NBT) (1 mg/ml) was added to all wells and incubated for 2 hours. After this incubation period, the cells were washed twice with 200 μ L of methanol and incubated for 10 min in a ventilated oven at 37°C to dry. After 10 minutes of incubation, the formazan crystals formed were dissolved with 120 μ L of 2M potassium hydroxide (KOH). The plate was placed on a shaker for 3 minutes, then 140 μ L of DMSO was added and shaken for another 5 minutes. Reading was carried out at a wavelength of 630nm in ELISA and the experiments were carried out in triplicate and the data is representative of at least three independent experiments [18,19].

Determination of Hydrogen Peroxide Radical in RAW 264.7

With modifications, the hydrogen peroxide radical (H₂O₂) quantification test was carried out to determine the inhibitory effect of the extracts on the damage caused by this radical in RAW 264.7 macrophage cells. The cells were grown and plated in 96-well cell culture plates and incubated for 24 hours at 37° C with 5% CO₂ until approximately 80% confluence. The following day, the cells were exposed to H₂O₂, followed by adding the best concentration of the samples identified through the % cell viability generated (187.5 µg/ml) and incubated for 24 hours. Cell viability was assessed on the third day after incubation using the abovementioned MTT colorimetric method. The reading was taken at a wavelength of 595 nm in ELISA. The experiments were carried out in triplicate, and the data represent at least three independent experiments [20,21].

2.3.8 Statistical analysis

The program used for the analyses was IBM SPSS *Statistics version 24*. The Shapiro and Wilk test was used to check whether the probability distribution was normal. The *Student's t-test* for paired samples compared the measurements analyzed between the seasonal periods for each altitude and total. ANOVA for independent samples and Tukey's multiple comparisons compared the measurements analyzed between altitudes for each collection season and total. The alpha level of significance used in all analyses was 5%.

2.4 RESULTS

2.4.1 Centesimal composition

The centesimal characterizations of *P. aculeata* leaves were carried out on a wet basis, which means that the results are expressed using the water content present in the plant to get as close as possible to the natural form in which the plants are consumed. All the centesimal measurements showed statistically significant differences (p-value ≤ 0.050) between the regions collected according to the seasons (Table 1). However, analyzing the total values that express the averages of the regions according to seasonality, we observed that only humidity showed a significant difference, with a value of 88.27% in the winter collection. It is worth noting that protein was the only measurement that did not show a significant difference in any of the seasons evaluated, but the highest averages were found in the summer collections (CA: 3.44%; DM: 2.63% and RN: 3.07%).

TABLE 1: COMPARISON OF CENTESIMAL COMPOSITION MEASUREMENTS OF *P. ACULEATA* LEAVES BETWEEN COLLECTIONS MADE IN DIFFERENT REGIONS AND TOTAL ACCORDING TO SEASONALITY.

Regions	Centesimal measures	Summer collection		Winter collection		p-value*
		Average	Standard deviation	Average	Standard deviation	
Cariacica (CA)	Humidity	84,739	0,425	86,967	0,331	0,033
	Ashes	2,823	0,16	3,241	0,39	0,286
	Lipids	0,411	0,12	1,043	0,096	0,013
	Proteins	3,448	0,295	3,24	0,095	0,382
Domingos	Humidity	84,681	0,564	87,299	0,936	0,035
Martins (DM)	Ashes	2,398	0,183	2,403	0,266	0,986

	Lipids	0,587	0,121	0,595	0,049	0,867
	Proteins	2,632	0,24	2,375	0,553	0,422
	Humidity	85,797	0,317	90,551	0,25	< 0,001
Rio Novo do Sul (RN)	Ashes	2,628	0,255	1,407	0,059	0,009
	Lipids	0,901	0,458	0,393	0,14	0,277
	Proteins	3,07	0,351	2,729	0,239	0,3
	Humidity	85,072	0,668	88,272	1,790	0,002
Total	Ashes	2,616	0,255	2,350	0,830	0,355
	Lipids	0,633	0,325	0,677	0,301	0,827
	Proteins	3,050	0,438	2,781	0,485	0,052

*. Student's t-test; significant if $p \leq 0.050$

The following are comparisons of the averages of the centesimal composition of *P. aculeata* leaves between the seasons and, in total, according to the altitudes of each region (**Table 2**). It can be seen that the test applied showed a statistically significant difference ($p\text{-value} \leq 0.050$) for all the measurements assessed. However, when analyzing the total values, which consider the average of the two seasons collected as a function of altitude, we observed a statistically significant difference for the ash and protein measurements, with the highest averages concentrated in the mid-altitude region (Cariacica) with values of 3.03% and 3.34%, respectively.

TABLE 2: COMPARISON OF CENTESIMAL COMPOSITION MEASUREMENTS OF *P. ACULEATA* LEAVES BETWEEN DIFFERENT SEASONS AND TOTAL ACCORDING TO DIFFERENT ALTITUDES.

		Summer collection			Winter collection			Total		
Measures		Average	Standard deviation	p-value*	Average	Standard deviation	p-value*	Average	Standard deviation	p-value*
Centesimals Regions										
Humidity	Cariacica(m)	84.739ab	0,425		86,967a	0,331		85,853	1,267	
	Domingos Martins (a)	84,681a	0,564	0,038	87,299a	0,936	0,001	86,548	1,075	0,365
	Rio Novo do Sul (b)	85,797b	0,317		90,551b	0,250		87,616	3,225	
Ashes	Cariacica(m)	2,823	0,160		3,241c	0,390		3,032b	0,351	
	Domingos Martins (a)	2,398	0,183	0,110	2,403b	0,266	0,001	2,401ab	0,204	0,006

	Rio Novo do Sul (b)	2,628	0,255		1,407a	0,059		2,017 ^a	0,689	
	Cariacica(m)	0,411	0,120		1,043b	0,096		0,727	0,359	
Lipids	Domingos Martins (a)	0,587	0,121	0,179	0,595a	0,049	0,001	0,591	0,083	0,762
	Rio Novo do Sul (b)	0,901	0,458		0,393a	0,140		0,647	0,411	
	Cariacica(m)	3,448b	0,295		3,240	0,095		3,34b	0,23	
Proteins	Domingos Martins (a)	2,632a	0,240	0,042	2,375	0,553	0,062	2,50 ^a	0,41	0,002
	Rio Novo do Sul (b)	3,070ab	0,351		2,729	0,239		2,90ab	0,33	

*. ANOVA for independent measures; abc - different letters indicate differences between means (Tukey's test); significant if $p \leq 0.050$; (m) median altitude; (a) high altitude; (b) low altitude.

2.4.2 Chemical antioxidant activity

Quantification of secondary metabolites and chemical antioxidant activity

The quantification of phenolic compounds and flavonoids, as well as the chemical antioxidant activity of the leaves of *P. aculeata* compared between the collections made in the different regions and totaled according to the summer and winter seasons can be seen in Table 3. It shows that all the measures analyzed, depending on the region, showed statistically significant differences, with all the best values concentrated in the summer season. Phenolic compounds were the only measurements that showed no significant difference in any of the regions and seasons analyzed. For the antioxidant activity tests, the values expressed the antioxidant potential as the minimum concentration required of the extract to sequester 50% of the DPPH and ABTS radicals and perform ferric conversion (IR50). When analyzing the total values found through the average of the regions as a function of seasonality alone, we saw a statistically significant difference only for the DPPH and FRAP measurements, with better average values of 2.24 µg/ml and 0.30 µg/ml respectively, found in the summer collection.

TABLE 3: COMPARISON OF MEASUREMENTS OF CHEMICAL ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS IN THE LEAVES OF *P. ACULEATA* BETWEEN COLLECTIONS MADE IN DIFFERENT REGIONS AND TOTAL AS A FUNCTION OF SEASONALITY.

Regions	Antioxidant measures	Summer collection		Winter collection		p-value*
		Average	Standard deviation	Average	Standard deviation	
Cariacica (CA)	DPPH	1,19	0,09	1,62	0,04	0,027
	ABTS	0,29	0,05	0,35	0,02	0,119

	FRAP	0,31	0,02	0,3	0,01	0,758
	Flavonoids	1,81	0,02	1,77	0,08	0,828
	Phenolics	0,114	0,03	0,112	0,007	0,914
Domingos Martins (DM)	DPPH	3,33	0,04	3,17	0,09	0,062
	ABTS	1,32	0,02	1,63	0,05	0,003
	FRAP	0,27	0,02	0,36	0,01	0,009
	Flavonoids	1,99	0,06	1,98	0,01	0,401
	Phenolics	0,133	0,027	0,11	0,007	0,305
Rio Novo do Sul (RN)	DPPH	2,21	0,01	2,11	0,06	0,109
	ABTS	0,15	0,07	0,88	0,01	0,003
	FRAP	0,34	0,01	0,33	0,03	0,547
	Flavonoids	1,91	0,04	1,68	0,07	0,025
	Phenolics	0,11	0,007	0,134	0,026	0,17
Total	DPPH	2,24	0,75	2,30	0,86	0,004
	ABTS	0,58	0,45	0,95	0,70	0,474
	FRAP	0,30	0,03	0,33	0,03	0,047
	Flavonoids	1,90	0,14	1,81	0,11	0,231
	Phenolics	0,119	0,023	0,118	0,018	0,972

*. Student's t-test; significant if $p \leq 0.050$

Below are the comparisons between the means of the methods related to chemical antioxidant activity, phenolic compounds and flavonoids in the leaves of *P. aculeata* between the seasons collected and in total, as a function of the different altitude gradients. Thus, the test showed a significant average difference in all the measures analyzed, except once again, of phenolic compounds. When evaluating the total value obtained through the averages of the two stations considering only the altitudes, a significant difference can be observed for the DPPH measurements with a value of 1.40 µg/ml and ABTS 0.32µg/ml, both found at medium altitudes. Analyzing the data obtained regarding the quantification of flavonoids, we can also see a significant average difference between the altitudes, with the best production averages concentrated at high altitudes with values of 1.99mg meq/ml (**Table 4**).

TABLE 4: COMPARISON OF MEASUREMENTS OF CHEMICAL ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS OF *P. ACULEATA* LEAVES BETWEEN DIFFERENT SEASONS AND TOTAL AS A FUNCTION OF DIFFERENT ALTITUDES.

		Summer collection			Winter collection			Total		
Antioxidant Measures Regions		Average	Standard deviation	p-value*	Average	Standard deviation	p-value*	Average	Standard deviation	p-value*
DPPH	Cariacica(m)	1,19a	0,09		1,62a	0,04		1,40a	0,24	

	Domingos Martins (a)	3,17c	0,04		3,33c	0,09		3,25c	0,11	
	Rio Novo do Sul (b)	2,21b	0,01	< 0,001	2,11b	0,06	< 0,001	2,16b	0,07	< 0,001
	Cariacica(m)	0,29a	0,05		0,35b	0,02		0,32a	0,05	
ABTS	Domingos Martins (a)	1,32c	0,02		1,63c	0,05		1,48b	0,17	
	Rio Novo do Sul (b)	0,15b	0,07	< 0,001	0,88a	0,01	< 0,001	0,52a	0,4	< 0,001
	Cariacica(m)	0,31a	0,02		0,30ab	0,01		0,3	0,02	
FRAP	Domingos Martins (a)	0,27b	0,02	0,022	0,36a	0,01	0,011	0,31	0,05	0,305
	Rio Novo do Sul (b)	0,34ab	0,01		0,33b	0,03		0,33	0,02	
	Cariacica(m)	1,81b	0,02		1,77a	0,08		1,79a	0,05	
Flavonoids	Domingos Martins (a)	1,99c	0,06	< 0,001	1,98b	0,01	0,012	1,99b	0,04	0,002
	Rio Novo do Sul (b)	1,91a	0,04		1,68ab	0,07		1,80a	0,14	
	Cariacica(m)	0,114	0,03		0,112	0,007		0,11	0,02	
Phenolics	Domingos Martins (a)	0,133	0,027	0,482	0,110	0,007	0,214	0,12	0,02	0,721
	Rio Novo do Sul (b)	0,110	0,007		0,134	0,026		0,12	0,02	

*. ANOVA for independent measures; abc - different letters indicate differences between means (Tukey's test); significant if $p \leq 0.050$; (m) median altitude; (a) high altitude; (b) low altitude.

2.4.3 Cell Viability (MTT)

In order to carry out biological tests in vitro, the assessment of cell viability is critical to determine beforehand whether the concentrations tested negatively affect the viability of the cells. The in vitro cytotoxic effects of the *P. aculeata* leaf extracts were evaluated on different cell lines, including L929 fibroblasts and RAW 264.7 macrophages, using the MTT colorimetric method. The results showed that none of the extracts tested at the different concentrations had cytotoxic effects on the cell lines, all showing cell viability above 70%.

2.4.4 Biological antioxidant activity

The intracellular antioxidant activities of the *P. aculeata* leaf extracts were evaluated according to their ability to inhibit the production of O₂⁻ and NO in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS. The increase in the production of these radicals, typical of LPS-stimulated

macrophages, was significantly reduced by all the extracts tested. As can be seen in Figure 1 (a, b, c and d), LPS showed a significant increase in the production of these radicals compared to the unstimulated control, proving that the cells were stimulated correctly, and all the extracts showed inhibition regardless of the seasonality and altitude evaluated. The seasonal averages of NO and O₂⁻ concentration reached a statistically significant difference with a p-value ≤ 0.050, where the two tests showed better averages in summer. With values of CA: 5.44%; RN: 5.17% and DM: 5.05% for the NO test and CA: 11.41%; RN:11.92% and DM 8.99% for the O₂⁻ test. Thus, for the NO method, we obtained the following inhibition percentages for the extracts tested: CA:85.51%; RN:86.23% and DM: 86.55%, while for the O₂⁻ assay the values found are: CA: 72.90%; RN: 71.90% and DM: 78.65%. Evaluating the altitude gradient, a statistically significant difference can be seen in the concentrations of NO and O₂⁻ with a p-value ≤ 0.050, with the best values found at high altitudes, 5.05% and 8.99% for NO and O₂⁻, respectively.

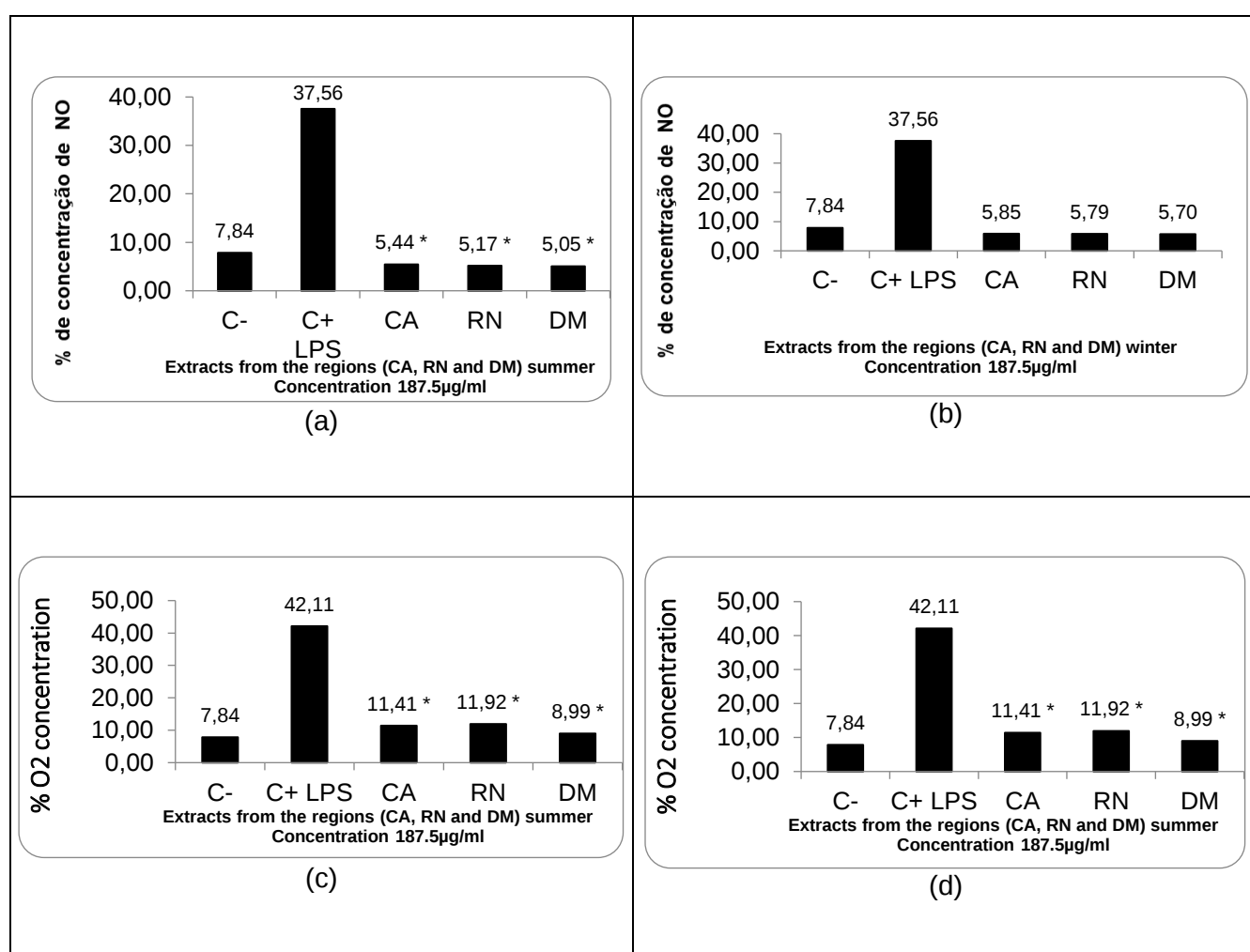


Figure 1: Effect of *P. aculeata* leaf extracts according to season and altitude evaluated at a concentration of 187.5µg/ml on the inhibition of NO and O₂⁻ free radical production in RAW 264.7 macrophages stipulated by LPS: (a) NO assay carried out in summer; (b) NO assay carried out in winter; (c) O₂⁻ assay carried out in summer; (d) O₂⁻ assay carried out in winter. The results are the average of three independent experiments carried out in triplicate. * Significant statistical difference at p<0.05.

The protective actions of the *P. aculeata* leaf extracts against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced damage in RAW 264.7 cells were also assessed using the MTT colorimetric method. The results showed that all the extracts tested from the different seasons and altitudes were

protective against the oxidative damage suffered by the macrophages, with all of them showing cell viability above 70%.

2.5 DISCUSSION

2.5.1 Centesimal composition

Several factors, including seasonality, play an essential role in producing primary and secondary metabolites in plants. In response to these climatic factors, plants make molecular and metabolic adjustments to avoid, tolerate, and even resist their presence [24]. The need to make these molecular and metabolic adjustments leads to changes in plants' chemical composition and activity. We can relate an essential interaction between seasonality and variations in altitude because altitude influences the control and patterns of various climatic factors, such as the daily temperature range, changes in precipitation levels, wind speed, the quality and chemical composition of the soil, atmospheric pressure, cloud cover, and radiation intensity. These factors can alter plants' morphological, physiological, and genetic aspects. One of the main climatic factors of great importance that is influenced by variations in altitude is temperature, which tends to decrease as altitudes increase. Every vital process that plants go through is adjusted within a temperature range. However, optimum growth and development can only be achieved if the processes involved in metabolism and development are in harmony [11].

When we analyze the total results found in this study on the centesimal composition, which considers the average of the regions analyzed according to seasonality, we can see that only moisture exerted a seasonal influence, with an average of 88.27% in winter (Table 2). This result corroborates the studies by Vargas [25], the only seasonal study carried out with *Ora-pro-nobis* in the summer and winter seasons, which showed a moisture content on a wet basis of 87.7% in winter. Recent studies such as those by Botrel et al. [26] and Siqueira et al., [27] showed moisture values of 88.65% and 91.06%, respectively, on a wet basis, while Takeiti et al., [28] found moisture values of 89.5%.

In general, the centesimal composition data found in this study is similar to that found by Oliveira et al., [30] who analyzed the centesimal composition of *Ora-pro-nobis* on a wet basis, using July as the collection period. Their results were 84.79% moisture, 2.37% protein, 0.44% lipids and 2.68% ash. In the present study, the proteins were not influenced by seasonality, but their behavior is characteristic, with the highest averages in the summer collection. Varga [10] observed similar behavior in the research where the *ora-pro-nobis* leaves had a relatively high protein content, especially when collected in the summer. In some regions, there were significant differences in the concentration of lipids in winter and ash in summer.

Regarding altitude, in this study, when we analyzed the total values found, there was a significant influence on the ash and protein measurements, with values of 3.03% and 3.34%, respectively, at medium altitudes. We can relate these findings to the study by Ganzera et al., [31] with the *Matricaria chamomilla* L. population, located at 590m to 2230m in Australia, which showed different chemical compositions in the altitude gradients analyzed. According to these authors, populations located at high altitudes have a different chemical profile from populations growing at low altitudes, and better values were found in populations grown at medium altitudes, where climatic factors had less impact on the variations of this gradient.

According to the literature, countless factors are different for each climatic season, which can justify the changes found in the levels of the centesimal components, including temperature, humidity, luminosity, pest incidence, mineral content in the soil, and other factors [24]. Temperature and light are factors that play an essential role in the photosynthesis metabolism

of plants and are directly linked to changes in altitude. The interaction of these factors ensures an ideal environment for physiological processes, but variations in temperature and luminosity are also responsible for changes in the metabolism of plant metabolite production [30].

2.5.2 Cell Viability

The evaluation of cell viability is mandatory when the target of the study is related to cell biology to determine whether the concentrations tested can negatively affect the cells. Therefore, the in vitro cytotoxic effects of *P. aculeata* leaf extracts as a function of seasonality and altitude at various concentrations were tested on different cell lines, including L929 fibroblasts and RAW 264.7 murine macrophages. The results showed that none of the extracts tested at the different concentrations had cytotoxic effects on the cell lines, all showing cell viability above 70%. According to ISO 10993-5 [48] a sample has a cytotoxic effect when it reduces cell viability by more than 30%, which was not observed in this study for any of the extracts, where viability was maintained above 70%. Maciel et al.,[47] tested a hexanic fraction of *P. aculeata* on the cell lines L929 (fibroblasts) and HaCat (keratinocytes) and found no cytotoxicity, with viability remaining above 70%.

2.5.3 Bioactive Compounds and Antioxidant Activity

Secondary metabolites

The present study shows that the production of secondary metabolites did not show any statistically significant difference in seasonality when analyzing the total data. This result does not corroborate the literature, which states that the production of these metabolites is influenced by various factors, such as climatic variations and environmental factors [22]. Gobbo-Neto and Lopes [34] point to variations caused by seasonality in practically all secondary metabolites, such as essential oils, phenolic acids, saponins, flavonoids, alkaloids and others. Garcia [10], in a study of *P. aculeata* leaves subjected to different extracting solvents, found that the extracts of leaves collected in summer had the highest levels of phenolic compounds when compared to the other seasons analyzed. The same has been shown in studies carried out with other types of plants, where higher concentrations of total phenolic compounds can be seen in summer collections [35,36]. The findings regarding flavonoids are similar. Sartoretto [37] analyzed the total flavonoid content in leaves and stem bark of guabiroba genotypes according to the collection season and found the highest flavonoid content in samples collected in summer, thus elucidating the influence of seasonal variations on the concentration of these compounds.

According to Sartoretto [37], these variations can be explained by the fact that plants' metabolic functions are in full swing from spring to late summer, the period of vegetative and reproductive development, during which time there is a great deal of synthesis and storage of bioactive compounds. In addition, phenolic compounds are defense agents produced by plants against various types of stress caused by pathogens or adverse environmental conditions, such as oxidative stress.

About the altitude gradient, it can be seen in this study that the phenolic compounds were not significantly influenced by the altitudes evaluated. However, a higher production of flavonoids was observed in the high-altitude region. This is in line with the literature, which reports that lower temperatures and higher environmental radiation at high altitudes produce greater

reactive oxygen species, which can hurt cells if the plant's antioxidant system does not effectively remove them. As a result, plants generally produce more bioactive compounds to combat this damage. This positive correlation between flavonoid content and altitude is to be expected, since one of the main functions of this group of compounds is to protect plants against UV radiation, and leaves are the parts of plants that are most exposed to solar radiation [34,37]. The results found in the present study on secondary metabolites concerning altitude corroborate the findings of Zidorn et al., [38], who, even though they were carried out with different plants to those studied in the present study, found a significant positive correlation between the altitude of the collection site for species of the genus *Leontodon* and the total flavonoid content; in contrast, the content of phenolic acids showed no significant altitudinal variation. Similar results were found by Coutinho et al., [36] who quantified ethanolic extracts of the leaves of *Campomanesia adamantium* at an altitude of 180 meters, with results between 15.62 and 50.71 mg EC g⁻¹ MS and concluded that the flavonoid content was higher in early spring, indicating that with the increase in temperature, there is greater formation of flavonoids.

Chemical and biological antioxidant activity

The FRAP, ABTS, and DPPH methods were used to chemically analyze the antioxidant activity of the Ora-pro-nóbis leaf extracts, considering that the use of two or more techniques is currently recommended since no single test will reliably reflect the total antioxidant capacity of the samples analyzed [37]. Analyzing the total results found in this study, we observed that the DPPH and FRAP measurements were significantly influenced by seasonality, with the respective values of 2.24 µg/ml and 0.30 µg/ml evidenced in the summer collection. It is worth noting that the ABTS measurement (0.58 µg/ml), despite not showing a significant difference between the seasons, also showed its best value in the summer season. A similar result was found by Vargas [10], who reported the influence of seasonality on the antioxidant potential of *Pereskia aculeata* Mill leaves. In this study, it was observed that for the three methods used (DPPH, ABTS and FRAP), the extracts from leaves collected in the summer also showed values that express better antioxidant activity in this season. Given the scarcity of studies showing the influence of seasonality on the antioxidant potential of *P. aculeata* leaves, a vast amount of research has been carried out in the literature, and most of the articles found were based solely on the DPPH radical methodology, as shown by Oliveira [40] in his searches of scientific databases. Some of the research evaluates the antioxidant activity of *P. aculeata* concerning the extracting solvent used to make the extracts [41–43]. Although studies are scarce on *P. aculeata* leaves, this study and *aculeata* leaves, this study and the pioneering study carried out by Vargas [10] corroborate the results found in studies carried out with other plants, such as SARTORETTO [37] that evaluated the total antioxidant activity (TAA) determined by the DPPH and ABTS methods, in the leaves and stem bark of guabirobeira genotypes depending on the collection season, and showed in his results that the leaves had higher AAT values than the stem bark for all genotypes. In both tissues evaluated, it was in the summer that the highest antioxidant activity was obtained. Similar results can be observed in the studies by Fabiane [44] and Coutinho et al., [36] carried out with the leaves of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg and *Campomanesia adamantium* (Cambess.), respectively, due to seasonality, their data corroborates this study, where extracts from leaves collected in the winter season had lower antioxidant capacity.

With altitude, considering the same methods in this study, we observed a significant difference in total values for DPPH (1.40 µg/ml) and ABTS (0.32 µg/ml) measurements, with the best averages concentrated at medium altitudes. This result contrasts with most of the findings in the literature, which predict that high altitudes generally cause changes in the morphological, physiological, and genetic aspects of plants, generating oxidative damage. As a defense

against the adversities found at these altitudes, plants alter the pool of specialized metabolites produced to promote antioxidant defenses [11]. However, it is important to note that according to Oncel et al., [45] some low-altitude plants can also show high levels of antioxidant activity, compatible with those of alpine plants, due to responses to stress factors in their place of development.

Although chemical tests have provided important preliminary data, analyzed in isolation, they are considered relatively incomplete for assessing the antioxidant capacity of a sample since they do not represent the intracellular conditions of an organism [46]. It is, therefore, necessary for the data found through chemical tests to be related to intracellular methods. Given this need, the intracellular antioxidant activity of *P. aculeata* extracts as a function of seasonality and altitude was evaluated according to the samples' ability to inhibit the production of NO and O₂⁻ in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS. In the present study, an increase in the production of these radicals was observed, which is typical when LPS stimulates macrophages. However, when the extracts were applied, a significant reduction in the production of these radicals was observed for all the extracts tested, regardless of the seasonality and altitude evaluated. It is worth noting that the test applied showed a significant influence of both seasonality and altitude, with better results in the summer season and at higher altitudes in all the tests. The intracellular results corroborate most of the literature presented so far and contrast with the results found in the chemical tests for some methods. Considering seasonality, the chemical and biological methods presented the same results, showing better antioxidant activities in summer.

In contrast, for the altitude gradient, the chemical methods showed better results at medium altitudes. In comparison, the biological methods showed better antioxidant activities at high altitudes, thus corroborating the literature presented in this study. According to Alves [47], these differences may be due to the mechanism of action of each method. In chemical methods, the main mechanism evaluated is the sequestration of free radicals, which is known to be carried out through the secondary metabolites produced by plants. In contrast, other mechanisms, such as enzymatic ones, may be involved in cellular tests through the enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. These enzymes can act by preventing and/or controlling the formation of free radicals and, consequently, the occurrence of oxidative damage.

The protective effects of *P. aculeata* leaf extracts against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced damage in RAW 264.7 cells were also assessed using the MTT colorimetric method, and it can be seen that all the extracts tested, depending on the season and altitude, had a protective effect, conferring cell viability of over 70%. Although hydrogen peroxide is not a free radical, it plays an important role in oxidative stress because it can cross cell membranes and easily convert into a hydroxyl radical, which is its most damaging effect on cells [46]. Maciel [47] also evaluated the antioxidant activity of *P. aculeata* using chemical (DPPH) and biological (ON reduction) methods with different types of extracts and found that all the samples showed promising antioxidant activities with properties capable of sequestering free radicals and inhibiting their actions at enzymatic levels.

2.6 CONCLUSION

The ora-pro-nóbis is a nutritionally rich plant with significant levels of well-digestible proteins, essential amino acids, vitamins, minerals and fiber. Regarding the centesimal compounds, seasonality had no significant influence on most of the nutrients, and it is worth noting that the protein content was not influenced by seasonality. The best values for ash, lipids and proteins were found at medium altitudes, which do not suffer directly from the changes at the extremes

of altitude variation. The quantification analyses of phenolic compounds and flavonoids showed no significant influence about seasonality. However, the highest production of flavonoids was found at high altitudes, as the literature states. As for the antioxidant potential, we found that for the three chemical methods evaluated (DPPH, ABTS and FRAP) there was a significant difference for the DPPH and FRAP measurements in collections made in the summer, but it is worth noting that for ABTS, even without a significant difference, its best value is also found in the summer. Concerning altitude, the DPPH and ABTS methods significantly influenced their best values at mid-altitudes. When the chemical results were compared with the intracellular analyses, they agreed that depending on the season, the methods for quantifying superoxide inhibition and ON showed better results in the summer collections.

In contrast, the biological methods' results, depending on altitude, showed better results in the summer collections, corroborating the literature. We can also see that *P. aculeata* had a protective effect on the cells analyzed due to the damage caused by hydrogen peroxide. Regarding cytotoxicity, all the extracts analyzed did not damage the cells, with cell viability above 70%.

Given the above, it is possible to say that this work has made a significant contribution to the knowledge and study of the *P. aculeata* species as a function of seasonality and altitude, since there are still few studies carried out considering the interference of these factors for the development of biotechnological processes aimed at developing optimized genotypes in different climates and regions, which help and guide farmers to produce and select more suitable cultivars, as well as providing information on strategies for genetic improvement programs.

2.7 ACKNOWLEDGMENTS

The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), PQ process, the Foundation for the Support of Research and Innovation of Espírito Santo (FAPES) are acknowledged for funding this study and for fellowship support.

2.8 REFERENCES

1. Cunha MA da, Pinto LC, Santos IRP dos, Neves BM, Cardoso R de CV. Plantas Alimentícias Não Convencionais na perspectiva da promoção da Segurança Alimentar e Nutricional no Brasil. Res Soc Dev. 12 de março de 2021;10(3):e20610313306–e20610313306.
2. Ortiz M da C da S, Guimarães L, Oliveira LS de. ESTUDO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS FOLHAS DE PERESKIA ACULEATA MILLER (ORA-PRO-NÓBIS): UTILIZADA POPULARMENTE COMO ALIMENTO E MEDICAMENTO. Rev Ibero-Am Humanidades Ciênc E Educ. 31 de maio de 2023;9(5):4558–69.
3. Moraes TVD. AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E NUTRICIONAL E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS, FRUTOS, FLORES E CAULES DA. 2022;
4. Sommer MC, Ribeiro PF de A, Kaminski TA. Obtenção e caracterização físico-química da farinha de ora-pro-nóbis / Obtenção and physicochemical characterization of ora-pro-nóbis flour. Braz J Health Rev. 18 de abril de 2022;5(2):6878–92.
5. Sousa WGM de, Abreu MC de. Revisão de literatura de plantas alimentícias não convencionais (PANCs) da família Solanaceae. Sci Nat [Internet]. 30 de dezembro de 2023

[citado 8 de julho de 2024];5(2). Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SciNat/article/view/6551>

6. Sato R, Cilli LPDL, Oliveira BED, Maciel VBV, Venturini AC, Yoshida CMP. Nutritional improvement of pasta with *Pereskia aculeata* Miller: a non-conventional edible vegetable. *Food Sci Technol*. junho de 2019;39(supl 1):28–34.
7. Oliveira NL, Rodrigues AA, Oliveira Neves IC, Teixeira Lago AM, Borges SV, de Resende JV. Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis à base de mucilagem de *Pereskia aculeata* Miller. *Ind Crops Prod*. 1º de abril de 2019;130:499–510.
8. Garcia JAA, CORREA RCG, Barros L, Pereira C, Abreu R, Alves MJ, et al. Perfil fitoquímico e atividades biológicas das folhas de “Ora-pro-nóbis” (*Pereskia aculeata* Miller) [Internet]. Galoá; [citado 4 de julho de 2024]. Disponível em: <https://proceedings.science/simbbtec-2019/trabalhos/perfil-fitoquimico-e-atividades-biologicas-das-folhas-de-ora-pro-nobis-pereskia?lang=pt-br>
9. Vargas AGD. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS. 2017;
10. Portella RDO. EFEITO DA ALTITUDE NA DIVERSIDADE QUÍMICA E.
11. Thiex N. Evaluation of Analytical Methods for the Determination of Moisture, Crude Protein, Crude Fat, and Crude Fiber in Distillers Dried Grains with Solubles. *J AOAC Int*. 1º de janeiro de 2009;92(1):61–73.
12. [analisedealimentosial_2008.pdf](#) [Internet]. [citado 8 de julho de 2024]. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf
13. Krepsky PB, Isidório RG, de Souza Filho JD, Côrtes SF, Braga FC. Composição química e vasodilatação induzida por preparações de *Cuphea carthagenensis*. *Phytomedicine*. 15 de agosto de 2012;19(11):953–7.
14. Luo X, Cui J, Zhang H, Duan Y, Zhang D, Cai M, et al. Extração assistida por ultrassom de compostos polifenólicos de farelo de sorgo vermelho (*Sorghum bicolor* L.) e suas atividades biológicas e composições polifenólicas. *Ind Crops Prod*. 1º de fevereiro de 2018;112:296–304.
15. Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem*. 1º de fevereiro de 2009;112(3):654–8.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16 de dezembro de 1983;65(1):55–63.
17. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*. 22 de junho de 1998;274(2):177–88.
18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Análise de nitrato, nitrito e [N]nitrato em fluidos biológicos. *Anal Biochem*. 1º de outubro de 1982;126(1):131–8.
19. Pinho BR, Sousa C, Valentão P, Andrade PB. Is Nitric Oxide Decrease Observed with Naphthoquinones in LPS Stimulated RAW 264.7 Macrophages a Beneficial Property? *PLOS ONE*. 26 de agosto de 2011;6(8):e24098.

20. Sim Choi H, Woo Kim J, Cha Y, Kim C. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *J Immunoassay Immunochem.* 1º de janeiro de 2006;27(1):31–44.
21. Adetutu A, Morgan WA, Corcoran O. Atividade antibacteriana, antioxidante e estimuladora do crescimento de fibroblastos de extratos brutos da folha de *Bridelia ferruginea*, uma planta cicatrizante da Nigéria. *J Ethnopharmacol.* 7 de janeiro de 2011;133(1):116–9.
22. Annan K, Houghton PJ. Estímulo antibacteriano, antioxidante e de crescimento de fibroblastos de extratos aquosos de *Ficus asperifolia* Miq. e *Gossypium arboreum* L., plantas cicatrizantes de Gana. *J Ethnopharmacol.* 2 de setembro de 2008;119(1):141–4.
23. Figueiredo ASGD. Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos [Internet] [Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos]. [Ribeirão Preto]: Universidade de São Paulo; 2010 [citado 8 de julho de 2024]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-21052010-140649/>
25. Botrel N, Freitas S, Fonseca MJDO, Melo RADCE, Madeira N. Valor nutricional de hortaliças folhosas não convencionais cultivadas no Bioma Cerrado. *Braz J Food Technol.* 2020;23:e2018174.
26. Siqueira AFL, Pinheiro AP de O, Narita IMP, Villa RD, Oliveira AP de. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E BIOACESSIBILIDADE IN VITRO DE FERRO EM FOLHAS DE DUAS ESPÉCIES OLERÍCOLAS NÃO-CONVENCIONAIS. DESAFIOS - Rev Interdiscip Universidade Fed Tocantins [Internet]. 28 de dezembro de 2023 [citado 8 de julho de 2024];10(3). Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios/article/view/16259>
27. Takeiti CY, Antonio GC, Motta EMP, Collares-Queiroz FP, Park KJ. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *Int J Food Sci Nutr.* 1º de janeiro de 2009;60(sup1):148–60.
28. Gabriel S. ALINE FITZNER DO NASCIMENTO NASCENTES DE OLIVEIRA.
29. Ganzera M, Guggenberger M, Stuppner H, Zidorn C. Altitudinal Variation of Secondary Metabolite Profiles in Flowering Heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. *Planta Med.* 11 de março de 2008;74:453–7.
30. Morais LAS de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. 2009 [citado 8 de julho de 2024]; Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/577686>
31. Souza JRPD, Rocha JN, Morais H, Caramori PH, Johansson LA, Miranda LV. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. *Hortic Bras.* março de 2008;26(1):40–4.
32. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova.* abril de 2007;30(2):374–81.
33. Kataoka VMF, Cardoso CAL. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. *Rev Bras Plantas Med.* 2013;15(1):121–9.
34. Coutinho ID, Kataoka VMF, Honda NK, Coelho RG, Vieira MC, Cardoso CAL. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas

de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. Rev Bras Farmacogn. julho de 2010;20(3):322–7.

35. Sartoretto RDR. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS BIOATIVOS EM FOLHAS E CASCAS DO CAULE DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg).

36. Zidorn C, Stuppner H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). TAXON. 2001;50(1):115–33.

37. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos | Journal of Health Sciences [Internet]. [citado 8 de julho de 2024]. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/885>

38. Gabriel S. ALINE FITZNER DO NASCIMENTO NASCENTES DE OLIVEIRA.

39. 3149.pdf [Internet]. [citado 8 de julho de 2024]. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2019/anais/artigos/3149.pdf>

40. Garcia JAA, Corrêa RCG, Barros L, Pereira C, Abreu RMV, Alves MJ, et al. Perfil fitoquímico e atividades biológicas de folhas de “Ora-pro-nobis” (*Pereskia aculeata* Miller), um superalimento subexplorado da Mata Atlântica brasileira. Food Chem. 1º de outubro de 2019;294:302–8.

41. Souza AHD, Silva BM, Mendonça HDOP, Oliveira Júnior AHD, Silva ECD, Augusti R, et al. EFEITO DO CALOR NAS CARACTERÍSTICAS DO PERFIL QUÍMICO DE FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS. Em: Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil - Volume 1 [Internet]. 1º ed Editora Científica Digital; 2021 [citado 8 de julho de 2024]. p. 309–29. Disponível em: <http://www.editoracientifica.com.br/articles/code/210604951>

42. Fabiane KC. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA.

43. Öncel I, Yurdakulol E, Keleş Y, Kurt L, Yıldız A. Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants. Acta Oecologica. 1º de dezembro de 2004;26(3):211–8.

44. Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Quím Nova. 2010;33(10):2202–10.

45. Alves V. Análises bioquímica e genética dos teores de flavonoides e atividade antioxidante em alface [Internet]. Universidade Federal de Uberlândia; 2020 [citado 8 de julho de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/28935>

46. marianadesouzaferreiramaci.pdf [Internet]. [citado 8 de julho de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/14410/1/marianadesouzaferreiramaci.pdf>

47. Kovrlja I, Menshikh K, Abreu H, Cochis A, Rimondini L, Marsan O, et al. Aplicabilidade desafiadora da ISO 10993-5 na avaliação de biomateriais de fosfato de cálcio: rumo a uma avaliação mais precisa da citotoxicidade in vitro. Biomater Adv. 1º de junho de 2024;160:213866.



© 2022 by the authors. Submitted for possible publication in open access under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA; M. E. F.; JUNQUEIRA, A. M. B.; SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 431-439, 2014.

AMARAL, T. N. et al. Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 331–342, 2018.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official methods of analysis. v. 21st, 2019.

ALVES, C.Q., DAVID, J.M., DAVID, J.P., BAHIA, M.V., & AGUIAR, R.M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity in organic substrates. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 33(10), 2202-2210, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de hortaliças não convencionais. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília: Mapa/ACS, 2010. Disponível em: www.abcsem.com.br/docs/manual_hortalicas_web.pdf. Acesso em: 12 mar. 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade>>. Acesso em: 14 mai. 2022.

CERCATO, L.M., **Efeito anti-inflamatório tópico associado à atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas da *Annona muricata* L.** Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

CETIN C.K., GULCIN I. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid—an activity-structure insight. **Toxicol Rep** 6:1273–1280,2019.

CUNHA, M. A., PINTO, L. C., SANTOS, I. R. P., NEVES, B. M., CARDOSO R. C. V. Plantas Alimentícias Não Convencionais na perspectiva da promoção da Segurança Alimentar e Nutricional no Brasil. Research, **Society and Development**, 10(3), 1-13, 2021.

CRUZ A.F., SAVICKI A., FRENTZEL A.E., ADAM I.P., PRADO L.O., FRANQUETO L., BALBI M.E. Plantas alimentícias não convencionais: utilização das folhas de “ora-pro-nobis” (*pereskia aculeata* mill, cactaceae) no consumo humano. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.21 n.3, Jul. - Set. /2020.

DE ANGELIS, I.; HOOGENBOON, L.A. P.; HUveneERS- OORSPONG, M.B.M.; ZUCCOT, F.; STAMMATI, A. Established cell lines for safety assessment of food contaminants: differing furazolidone toxicity to V79, Hep-2 and Caco-2 cells. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 32, n.5, p. 481-488, 1994.

DORMAN, H. J. D. KOSAR M., KAHLOS K., HOLM Y. HILTUNEN R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, Sept. 2003.

DURING, A.; HARRISON, E. H. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 430, p. 77-88, 2004.

FERRERA, T.S., HELDWEIN, A.B., SANTOS, C.O., SOMAVILLA, J.C., SAUTTER, C.K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.2, supl. I, p.588-596, 2016.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

FIGUEIREDO, A. S. G. de. Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos. 2010. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010

FRANCELIN, M.F., VIEIRA, T.F., GARCIA, J.A.A., CORREA, R.C.G., MONTEIRO, A.R.G., BRACHT, A., PERALTA, R.M. Fitoquímicos, nutricionais e farmacológicos propriedades de frutas e hortaliças nativas não convencionais do Brasil. Em SA, Petropoulos, ICFR Ferreira, & L. Barros (Eds.), *Phytochemicals in Vegetables: A*

Valiosa Fonte de Compostos Bioativos (pp. 442-470). Sharjah, Árabes Unidos Emirados Árabes: **Bentham Science Publishers**, 2018.

FRANCISCO, T. C. T. **Análise de hidrolisados proteicos de Pereskia aculeata Miller (Ora-pro-nóbis)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2018.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção, Cactaceae in. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em : <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB70>>

GARCIA, J.A.A., CORRÊA, R.C.G., BARROS, L., PEREIRA, C., ABREU, R.M.V., JOSÉ ALVES, M., CALHELHA, R.C., BRACHT, A., PERALTA, R.M., FERREIRA C.F.R., Perfil fitoquímico e atividades biológicas das folhas de 'Ora pro-nobis' (Pereskia aculeata Miller), um superalimento subexplorado da Mata Atlântica brasileira, **Food Chemistry** ,2019)

GARCIA, C. R., PROCÓPIO, A. L. F., HOTTA, J., MARQUES, V. R., URBAN, V. M., & NEPELENBROEK, K. H. Citotoxicidade de resina termopolimerizável após imersão prolongada em agente químico. In *Anais*. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru – USP,2015.

GULCIN I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Arch Toxicol** 86(3):345–391,2012.

GULCIN I., Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology** 94:651–715, 2020.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HENRIQUEZ C, ALIAGA C, LISSI E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. **Int J Chem Kin**, 34(12):659-65, 2002.

HUYUT Z, BEYDEMIR S, GULÇIN İ. Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. **Bio chem Res Int** 2017:1–10, 2017

KINUPP, V.F.; BARROS, I.B.I.D. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.63-65, 2007.

JACOB, M.M. Biodiversidade de plantas alimentícias não convencionais em uma horta comunitária com fins educativos. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 15, p. 44037, 2020.

KIM, D.O., LEE K.W., LEE H.J. LEE C.Y. Vitamina C equivalente antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

LAGO, A. M. T. et al. Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 50, n. September 2018, p. 339–353, 2019.

LIBERATO, P.S.; LIMA, D.V.T; SILVA, G.M.B. PANCS-Plantas alimentícias não convencionais e seus benefícios nutricionais. 2019.

LIGUORI, I., RUSSO, G., CURCIO, F., BULLI, G., ARAN, L., DELLA-MORTE, D., ABETE, P. Estresse oxidativo, envelhecimento e doenças. **Intervenções Clínicas no Envelhecimento**, 13, 757–772, 2018.

MACIEL, M.S.F.; FREITAS, P.H.S.; ALMEIDA, M.A.; SILVA, N.P. et al. *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae): A non-conventional food plant with medicinal potential. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 5, n. 2, p. 1-14, 2023.

MORAES, T. V de et al. Potencial antioxidante da espécie *Pereskia aculeata* Miller: uma análise bibliométrica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, v.29, n.1, p. 79-85, dez. 2019

MORAES T.V. DE, FERREIRA J.P.G., SOUZA M.R.A. DE, MOREIRA R.F.A. Atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos do chá do caule da *Pereskia aculeata* Miller fresco e armazenado sob congelamento. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, e34953140, 2020.

NOGUEIRA N.F.S.; SILVA, S.H.; BARON, D.; OLIVEIRA, I.C.N.; CASANOVA, F. *Perskia aculeata* Miller as a Novel Food Source: **A Review. Foods** 12, 2092, 2023.

ORTIZ, M. DA C. DA S., GUIMARÃES, L., & OLIVEIRA, L. S. DE. Estudo do potencial farmacológico das folhas de pereskia aculeata miller (ora-pro-nóbis): utilizada popularmente como alimento e medicamento. **Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências E Educação**, 9(5), 4558–4569,2023.

OLIVEIRA, N. L. et al. Development and characterization of biodegradable films based on Pereskia aculeata Miller mucilage. **Industrial Crops & Products**, v. 130, n. August 2018, p. 499–510, 2019.

OZTASKIN N, TASLIMI P, MARAŞ A, GÖKSU S, GULCIN I. Novel anti oxidant bromophenols with acetylcholinesterase, butyrylcho linesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions. **Bioorg Chem** 74:104–114,2017.

OLIVEIRA, H. A. B. et al. Nutritional value of non- conventional vegetables prepared by family farmers in rural communities. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.49:08, p. 1-10, 2019 (a)

OLIVEIRA, B. de et al. Operação taioba: o uso de plantas alimentícias não convencionais (PANC) e da agricultura urbana na construção do censo agroecológico de escolares da rede pública de São Leopoldo, RS. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

PASCHOAL, V.; SOUZA, N.S. Plantas Alimentícias não convencionais (PANC). In: CHAVES, D.F.S. Nutrição Clínica Funcional: Compostos Bioativos dos Alimentos. São Paulo: VP Editora, Cap. 13. p. 302-323, 2016.

PEREIRA, N. C.; TESTONI C. Ações de educação alimentar e nutricional com grupos em vulnerabilidade social: relato de experiência. **Revista Ciência Plural**, v. 6, n. 2, p. 170-191, 2020

PEISINO, M.C.O. “**Atividade antioxidante e anti-inflamatória in vitro de plantas alimentícias não convencionais**”. Dissertação de (Mestrado em Ciência Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, Vila Velha/ES, 2018.

PINTO, NDCC, CASSINI-VIEIRA, P., DE SOUZA-FAGUNDES, EM, BARCELOS, LS, CASTAÑON, MCMN, & SCIO, E. Pereskia aculeata Miller deixa acelerar a excisão cicatrização de feridas em camundongos. **Jornal de etnofarmacologia**, 194, 131-136, 2016.

PINTO, N.D.C.C., MACHADO, D.C., DA SILVA, J.M., CONEGUNDES, J.L.M., GUALBERTO, A.C.M., GAMEIRO, J., SCIO, E. Folhas de *Pereskia aculeata* Miller presentes in vivo atividade anti-inflamatória tópica em modelos de dermatite aguda e crônica. **Diário de Etnofarmacologia**, 173, 330-337, 2015.

PORTELLA, R.O. **Efeito da altitude na diversidade química e genética de *Lychnophora pinaster* Mart.** [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu ; 2021.

PRIMITIVO, M. J. et al. Edible flowers of *Helichrysum italicum*: Composition, nutritive value, and bioactivities. **Food Research International**, v. 157, p. 111399, 1 jul. 2022.

RANIERI, G. R. Guia prático sobre PANCs: plantas alimentícias não convencionais/ organização Instituto kairós.--1.ed.-- São Paulo: Instituto Kairós, 2017.

RODRIGUES, Isabela Ribeiro et al. Ora-pro-nóbis na mesa: foco alimentar. Boletim Técnico IFTM, Uberaba-MG, ano 4, n.3, p.40-47, set./dez., 2018.

RODRIGUES, I.R.; RAMOS, R.O.; QUEIROZ, C.R.A.A. Ora-pro-nóbis na mesa- aspecto agrônômico. **Boletim Técnico IFTM**, v. 4, n. 3, p. 40-43, 2019.

SARTORETTO, R.R. Atividade antioxidante e compostos bioativos em folhas e cascas do caule de diferentes genótipos de **guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg)** Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2020.

SATO, R. CILLI, L.P.L. OLIVEIRA, B.E. MACIEL, V.B.V. VENTURINI A.C. YOSHIDA C.M.P. Nutritional improvement of pasta with *Pereskia aculeata* Miller: a non-conventional edible vegetable. **Food Science and Technology**, v. 2061, p. 1– 7, 2018.

SIQUEIRA, A.F.L et., al. Composição centesimal e bioacessibilidade invitro de ferro em folhas de duas espécies olerícolas não-convencionais **Revista Desafios** – v.3,n.1,2023.

SILVA, D.O, SEIFERT, M., NORA, F.R, BOBROWSKI, V.L, FREITAG, R.A, KUCERA, H.R, GAIKWAD, N.W. Acute Toxicity and Cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a Highly

Nutritious Cactaceae Plant . **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 4, p. 403– 409, 2017.

SOUZA, L., CAPUTO, L., INCHAUSTI DE BARROS, I., FRATIANNI, F., NAZZARO, F., DE FEO, V. Folhas de *Pereskia aculeata* Muller (cactáceas): composição química e biológica Atividades. **Jornal Internacional de Ciências Moleculares**, 17, 1478, 2016.

SOUZA, L. F. **Aspectos fitotécnicos, bromatológicos e componentes bioativos de *Pereskia aculeata*, *Pereskia grandifolia* e *Anredera cordifolia***. 2014. 125f. Tese (Doutorado em Fitotecnia com Ênfase em Horticultura). Faculdade de Agronomia, Programa de Pós—Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

SOUZA, G. M.; LÜTTGE, U. Stability as a Phenomenon Emergent from Plasticity Complexity–Diversity in Eco-physiology; in LÜTTGE, U.; BEYSCHLAG, W. (eds.), *Progress in Botany*, Progress in Botany 76, Springer **International Publishing Switzerland**, 2015, pp. 211-239.

SOMMER, M. C., RIBEIRO, P. F. A., KAMINSKI, T. A. Obtenção e caracterização físico-química da farinha de ora-pro-nóbis. **Brazilian Journal of Health Review**, 5(2), 6878-92, 2022.

TROTTER, P. J.; STORCH, J. Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n.14, P. 10017-10023, 1993.

VARGAS, A. G. DE; DA ROCHA, R. D. C.; TEIXEIRA, S. D. Influência da sazonalidade na composição centesimal da *Pereskia aculeata* Miller. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2017.