



**Universidade Federal do Pampa**

**CURSO DE NUTRIÇÃO**

LUANA BARRETO MEICHTRY

**EFEITO PROTETOR DO GAMA ORIZANOL SOBRE AS  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS  
PELA EXPOSIÇÃO AGUDA DA MOSCA DA FRUTA *Drosophila*  
*melanogaster* AO ESTRESSE TÉRMICO**

**Itaqui/RS**

**2015**

LUANA BARRETO MEICHTRY

**EFEITO PROTETOR DO GAMA ORIZANOL SOBRE AS  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS  
PELA EXPOSIÇÃO AGUDA DA MOSCA DA FRUTA *Drosophila*  
*melanogaster* AO ESTRESSE TÉRMICO**

Trabalho de conclusão de curso,  
apresentado á Banca Examinadora da  
Universidade Federal do Pampa para  
obtenção do grau de bacharel em  
Nutrição, sob a orientação da Prof. Dr<sup>a</sup>.  
Marina Prigol

**ITAQUI/RS**

**2015**

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

M499e Meichtry, Luana Barreto

Efeito protetor do gama orizanol sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela exposição aguda da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* ao estresse térmico / Luana Barreto Meichtry.

35 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM NUTRIÇÃO, 2015.

"Orientação: Marina Prigol".

1. Estresse oxidativo. 2. Ácido ferúlico. 3. Exposição ao frio. I. Título.

LUANA BARRETO MEICHTRY

**EFEITO PROTETOR DO GAMA ORIZANOL SOBRE AS  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS  
PELA EXPOSIÇÃO AGUDA DA MOSCA DA FRUTA *Drosophila  
melanogaster* AO ESTRESSE TÉRMICO**

Trabalho de conclusão de curso,  
apresentado á Banca Examinadora da  
Universidade Federal do Pampa para  
obtenção do grau de bacharel em  
Nutrição.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 27 de junho de 2015

Banca examinadora:

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Fernanda Aline Moura  
UNIPAMPA

---

Nutricionista Stéfani Machado Araujo  
UNIPAMPA

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus por ter me dado força para superar às dificuldades.

À Universidade Federal do Pampa, seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade de adquirir conhecimentos através do ensino público.

À professora Marina Prigol, pela orientação, apoio e confiança.

À minha mãe, pelo apoio e suporte.

Aos amigos, pelo apoio e incentivo em especial aqueles que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

As minhas companheiras de laboratório, em especial, Stéfani Araujo e Márcia Poetini grata imensamente pela ajuda e pela amizade.

À terceira turma de nutrição pelo apoio e companheirismo.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	7
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1	Materiais e Cultura das Moscas.....	8
2.2	Análises <i>in vivo</i> .....	9
2.2.1	<i>Estresse de tolerância ao frio</i> .....	9
2.2.2	<i>Vida útil</i> .....	10
2.2.3	<i>Testes comportamentais</i> .....	10
2.3	Análises <i>ex vivo</i> .....	10
2.3.1	<i>Preparação das amostras</i> .....	10
2.3.2	<i>Análises Bioquímicas</i> .....	10
2.4	Análise estatística .....	11
3.	RESULTADOS .....	11
3.1	Gama Orizanol melhora a taxa de sobrevivência de <i>Drosophila Melanogaster</i> exposta a estresse térmico.....	11
3.2	Gama Orizanol melhora Atividade locomotora e Atividade da Acetilcolinesterase de <i>Drosophila Melanogaster</i> exposta a estresse térmico .....	12
3.2.1	<i>Geotaxia negativa</i> .....	12
3.2.2	<i>Base e topo</i> .....	13
3.2.3	<i>Campo aberto</i> .....	14
3.2.4	<i>Efeito sobre a atividade da Acetilcolinesterase</i> .....	14
3.3	15	
3.2.1	<i>Níveis de Espécies Reativas</i> .....	15
3.3.2	<i>Peroxidação lipídica/ Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	16
3.3.4	<i>Redução por Resaruzina</i> .....	17
4.	DISCUSSÃO .....	18
5.	CONCLUSÃO.....	20
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21
7.	ANEXOS .....	25

**Efeito protetor do gama orizanol sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela exposição aguda da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* ao estresse térmico**

**Protective effect of gamma oryzanol on behavioral and biochemical alterations induced by acute fruit fly *Drosophila melanogaster* exposure to heat stress**

Meichtry LB<sup>1</sup>, Araujo SM<sup>1</sup>, Poetini MR<sup>1</sup>, Bortolotto VC<sup>1</sup>, Zarzecki MS<sup>1</sup>, Paula MT<sup>1</sup>, Prigol M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas aplicadas às Moléculas Bioativas – Unipampa, Universidade Federal do Pampa - Campus Itaqui, Itaqui, RS, 97650-000, Brasil.

Autor responsável pela correspondência:

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

Universidade Federal do Pampa, Curso de Graduação em Nutrição, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, Bairro Promorar, CEP: 97650-000, Itaqui, RS, Brasil.

E-mail: marinaprigol@gmail.com

**Artigo formatado nas normas do periódico: Revista Nutrire**

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito protetor do gama orizanol sobre as alterações comportamentais e bioquímicas na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* expostas ao estresse térmico.

**Métodos:** As moscas foram divididas em grupos conforme seus respectivos tratamentos, onde foi realizada a exposição ao frio para induzir ao estresse e a exposição ao gama orizanol como forma de tratamento. Testes comportamentais como geotaxia negativa, base e topo e campo aberto foram realizados para testar a atividade locomotora das moscas. Logo, análises bioquímicas *ex vivo* foram realizadas, sendo estas: medida dos níveis de espécies reativas e TBARS e da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, acetilcolinesterase e verificação da viabilidade celular pelo método da resaruzina. **Resultados:** As moscas expostas ao estresse térmico obtiveram a atividade locomotora afetada, havendo também, alterações bioquímicas, no entanto, as moscas as quais foram tratadas com o composto gama orizanol, porém, expostas nas mesmas condições de estresse não obtiveram qualquer alteração em relação ao grupo controle. **Conclusão:** O composto gama orizanol foi capaz de proteger a mosca da fruta *drosophila melanogaster* aos danos comportamentais e bioquímicos causados pela exposição ao estresse térmico.

**Palavras-chaves:** Estresse oxidativo, ácido ferúlico, exposição ao frio.



## **ABSTRACT**

**Goal:** Evaluate the protector effect of gamma oryzanol in the biochemical and behavior alterations of the fruit fly *Drosophila melanogaster* when exposed to thermal stress.

**Methodology:** The flies were divided in groups according to the treatment, where they were exposed to the cold to induce stress and gamma oryzanol as a treatment way. Compartmental tests such as Negative geotaxis, Base Top and Open field were utilized to test the flies locomotor activity. However, the biochemical analysis *ex vivo*, were realized, such as: stress level relative measure and TBARS and enzymes superoxide dismutase, catalase, acetylcholinesterase activity and evaluation of cellular viability using resaruzin method.

**Results:** The flies exposed to the thermal stress had the locomotor activity affected, they also had the biochemical alterations, by the way, the flies were treated with the gamma oryzanol compound, however, exposed in the same stress conditions, they do not obtained any alteration about the control group. **Conclusion:** The gamma oryzanol compound was able to protect the fruit fly *Drosophila melanogaster* to the behavior and biochemical damage caused by thermal stress exposition.

**Keywords:** Oxidative stress, ferulic acid, exposure to cold.

## 1. INTRODUÇÃO

O nível de estresse vem crescendo gradualmente em toda população sendo considerado um problema generalizado. Os problemas de saúde mental, entre eles o estresse, estão dentre as causas relacionadas com a aparição de diversas doenças, tendo como consequências, além de distúrbios relacionados a saúde, custos crescentes e significativos que afetam as organizações e o estado como um todo.<sup>1</sup> Um levantamento realizado pela OMS (Organização Mundial de Saúde)<sup>2</sup> revelou que o estresse, em suas mais variadas formas, atinge cerca de 90% da população global.

O ser humano, naturalmente, busca manter um equilíbrio entre suas forças interiores e todos os órgãos, de maneira que seu organismo possa funcionar em harmonia. Porém, quando há uma alteração nesse equilíbrio, causada por algum agente estressor, ou seja, qualquer situação que desperte algum tipo de emoção, seja ela boa ou ruim, irá acarretar numa fonte de estresse.<sup>3</sup> Sendo assim, qualquer mudança considerada significativa, gera a necessidade no organismo em adaptar-se, passando a exercer um papel determinante na patogênese do estresse.<sup>4</sup> Uma vez provocada essa alteração emocional, acarretará em desregulação da homeostasia, de forma a desencadear a necessidade de adaptação no organismo. Uma das formas do organismo adaptar-se a esses estímulos é aumentando a secreção de adrenalina, que por sua vez quando liberada de forma desregulada, irá acarretar em diversas manifestações sistêmicas, incluindo distúrbios fisiológicos e psicológicos.<sup>5</sup>

Constantemente, a homeostasia é desafiada por fatores estressantes, intrínsecos e extrínsecos. Sendo que condições clínicas e estressantes podem estimular os níveis excessivos de espécies reativas de oxigênio,<sup>6</sup> resultando no desequilíbrio entre oxidação e sistemas de defesa antioxidante, podendo causar peroxidação lipídica e danos oxidativos a proteínas e DNA, resultando no estresse oxidativo.<sup>6,7</sup> Portanto, o estresse oxidativo induzido pelo estresse, potencializa o ambiente neurotóxico.<sup>8</sup>

Um organismo terá como primeira resposta a qualquer estresse ambiental a alteração bioquímica, a qual condiz os efeitos de maior nível organizacional.<sup>9</sup> Na resposta ao estresse há a atuação de proteínas de choque térmico, sendo consideradas respostas primárias em relação a proteção celular.<sup>10</sup> Essas proteínas foram identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico.<sup>11</sup> Em condições desfavoráveis, como, a alteração da temperatura,

estresse osmótico ou oxidativo, os níveis das proteínas de choque térmico são da mesma forma alterados, assim, aumentando ou diminuindo a expressão dessas proteínas.<sup>12</sup>

Conforme o ser humano passa por modificações, ele utiliza suas reservas de energia adaptativa e, com isso, podendo enfraquecer sua resistência física e mental, dando origem a inúmeras patologias psicofisiológicas.<sup>13</sup> Portanto, todas as mudanças sejam elas pequenas ou grandes podem colocar uma pessoa numa situação de estresse. Como no Brasil essas mudanças estão ocorrendo em ritmo constante, é de se entender por que o nível de estresse da população está tão alto.<sup>14</sup> A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e os humanos compartilham inúmeros genes, conservam vias metabólicas e sinalizadoras e, além disso, há uma crescente evidência de conservação a nível comportamental e de seus mecanismos moleculares, incluindo ritmos circadianos, aprendizagem, memória e sono.<sup>15,16</sup>

A alimentação provinda de alimentos integrais como grãos, frutas, vegetais, chás e especiarias, tem sido associado com a redução do risco de doenças como por exemplo o câncer. Portanto esses alimentos funcionais são vistos como uma escolha atraente para uso generalizado a longo prazo em diversas populações.<sup>17</sup> Um dos alimentos considerado básico para a grande maioria da população é o arroz, respondendo por >20% do consumo global de energia.<sup>18</sup> O grão do arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 70% de endosperma e 10% de farelo e germe. Nas camadas e farelo do germe, é encontrada a maior parte de óleo do grão.<sup>19</sup> Nesse óleo está contido uma das substâncias que vem recebendo mais atenção devido as suas propriedades benéficas a saúde, o gama orizanol,<sup>20</sup> sendo constituído por uma mistura de ésteres de ácido ferúlico com esterol ou álcoois triperpênicos e fitosteróis.<sup>21</sup> O gama orizanol vem demonstrando possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anti-tumoral e as atividades hipocolesterolêmicas<sup>22,23,24,25</sup>, sendo também aprovado quanto ao tratamento de desequilíbrios nervosos e perturbações da menopausa.<sup>26</sup> O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito protetor do gama orizanol sobre alterações comportamentais e bioquímicas na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* expostas ao estresse térmico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais e Cultura das Moscas**

Gama orizanol foi adquirido de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Os demais reagentes foram utilizados da grade analítica do Campus UNIPAMPA.

*Drosophila melanogaster* (linhagem Harwich) foram mantidas em incubadora BOD, ciclo claro/escuro 12h ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 60 % de umidade) alimentadas em meio padrão do laboratório composto por 1% de farinha de milho, 1% de levedura, 1% de germen de trigo, 2% de sacarose, 1% de leite em pó, 0,08% de nipagin.

## **Protocolo Experimental**

### **Esquema de tratamento**

Para os tratamentos, moscas fêmeas de 3-5 dias de idade foram divididas em 8 grupos e estas foram expostas ao tratamento durante 7 dias.

As moscas foram divididas em oito grupos: (1) Controle, (2) Gama orizanol, (3) Estresse 15 min (Est 15), (4) Estresse 30 min (Est 30), (5) Estresse 60 min (Est 60), (6) Estresse + Gama orizanol 15 min (G+Est 15), (7) Estresse + Gama orizanol 30 min (G+Est 30) (8) Estresse + Gama orizanol 60 min (G+Est 60). A dieta durante o tratamento consistiu em 2% de sacarose, 1% de leite em pó, 1% de ágar; 0,08% nipagin.

Gama orizanol (25  $\mu\text{M}$ ) foi diluído em solução sacarose a 1%. A concentração de gama orizanol foi escolhida com base em uma experiência piloto onde as moscas foram expostas a várias concentrações em gama orizanol, tais como de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 75  $\mu\text{M}$  para determinar o efeito de gama orizanol sozinho sobre a sobrevivência das moscas durante o período experimental. Apenas a concentração de 25  $\mu\text{M}$  foi considerada satisfatória quando se avaliou a mortalidade e o teste comportamental geotaxia negativa de moscas.

### **Protocolo de tratamento**

#### **2.2 Análises *in vivo***

##### *2.2.1 Estresse de tolerância ao frio*

Para cada grupo, foram utilizadas cerca de 50 moscas fêmeas, onde no 6º dia de tratamento, estas foram colocadas em frascos de plástico vazios e então esses frascos mergulhados no

banho frio. Um banho -5 °C foi feito utilizando água, gelo e sal. As moscas foram mantidas durante o tempo de 15, 30 e 60 minutos com a temperatura a qual foi verificada regularmente. No final de cada tempo, os frascos foram removidos do banho de água e as moscas foram transferidas para o alimento regular e deixadas em repouso. Após 24 horas, a sobrevivência foi registrada e as análises bioquímicas foram realizadas.<sup>27</sup>

### 2.2.2 *Vida útil*

A taxa de sobrevivência foi avaliada por contagem diária da quantidade de moscas vivas até ao final do período experimental (7 dias). Cerca de 150 moscas por grupo foram incluídos nos dados de sobrevivência e o número total de moscas representa a soma das três experiências independentes (50 moscas cada repetição / tratamento).

### 2.2.3 *Testes comportamentais*

O comportamento locomotor das moscas foi avaliado através dos testes de escalada Geotaxia negativa e o teste Base topo,<sup>28,29</sup> também foi realizado o teste Campo aberto<sup>30</sup> ambos com algumas modificações.

## 2.3 *Análises ex vivo*

### 2.3.1 *Preparação das amostras*

Cerca de 20 moscas em cada grupo foram imobilizadas no gelo durante aproximadamente 1 min, em seguida, foram homogeneizados manualmente em tampão HEPES arrefecido em gelo (20 mM, pH 7,0), 10: 1 (moscas / volume (mL)) com ou sem cabeça de acordo com cada análise a ser executada. Após a centrifugação apropriada para cada análise executada, o sobrenadante foi removido e usado para ensaios bioquímicos. Todas as experiências foram realizadas em triplicata.

### 2.3.2 *Análises Bioquímicas*

Foi determinado a peroxidação lipídica (TBARS),<sup>31</sup> níveis de espécies reativas (RS),<sup>32</sup> atividade de catalase (CAT),<sup>33</sup> atividade de superóxido dismutase (SOD),<sup>34</sup> acetilcolinesterase (Ache),<sup>35</sup> e redução de resaruzina.<sup>36</sup> A quantidade de proteína nas

amostras foi determinada de acordo com o método colorimétrico,<sup>37</sup> utilizando a albumina bovina como padrão.

## 2.4 Análise estatística

A medida do tempo de vida foi determinada pela comparação das curvas de sobrevivência através do teste de Mantel-Cox. As demais análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls post hoc, quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas entre os grupos quando  $p < 0,05$  utilizando o programa GraphPad Prism5.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Gama Orizanol melhora a taxa de sobrevivência de *Drosophila Melanogaster* exposta a estresse térmico

O percentual de sobrevivência foi reduzido no grupo de moscas expostas ao estresse de 15, 30 e 60 minutos quando comparado ao controle. As moscas que foram tratadas com o composto gama orizanol e expostas as mesmas condições de estresse por 15 e 30 minutos, não apresentaram alteração no percentual de sobrevivência, permanecendo igual ao controle. Já as moscas que foram tratadas com o composto gama orizanol e expostas as mesmas condições de estresse por 60 minutos apresentaram proteção parcial, não retornando aos níveis do controle (Figura 1).

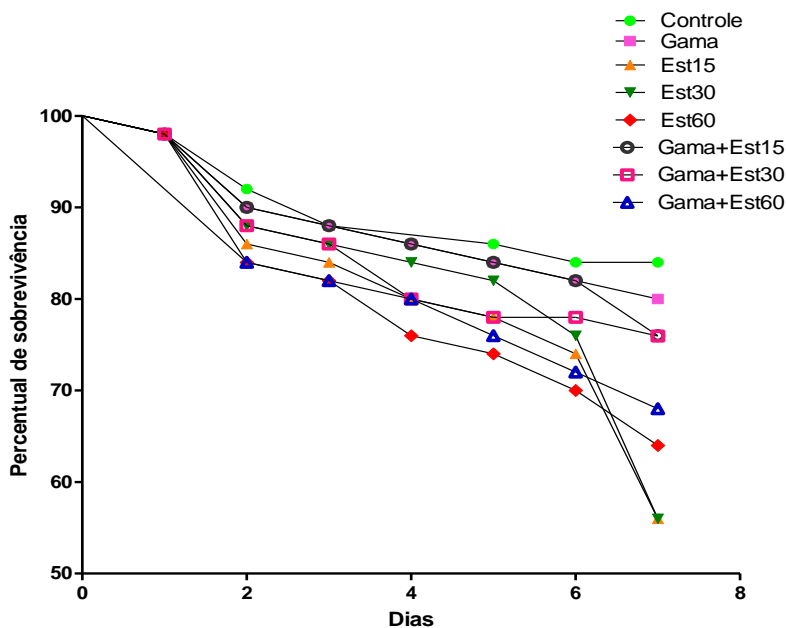


Figura 1- Percentual de sobrevivência de moscas expostas ao estresse térmico durante 15, 30 e 60 minutos e co-exposição ao gama orizanol. O teste foi realizado em triplicata. A medida do tempo de vida foi determinada pela comparação das curvas de sobrevivência através do teste de Mantel-Cox.

### 3.2 Gama Orizanol melhora Atividade locomotora e Atividade da Acetilcolinesterase de *Drosophila Melanogaster* exposta a estresse térmico

#### 3.2.1 Geotaxia negativa

As moscas expostas ao estresse de 60 minutos mostraram claramente a atividade locomotora reduzida, observada pelo teste de escala geotaxia negativa. Entretanto, as moscas que foram tratadas com o composto gama orizanol e expostas as mesmas condições de estresse, não apresentaram alteração na atividade locomotora, permanecendo igual ao controle. Já nas moscas expostas ao estresse de 15 se 30 minutos, não se obteve diferença significativa em relação ao grupo controle tanto nas que receberam gama orizanol, quanto nas que não receberam (Figura 2).

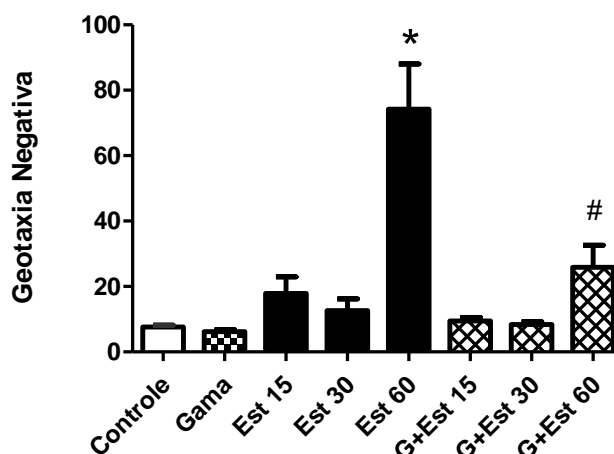


Figura 2- Desempenho locomotor de moscas expostas ao estresse térmico durante 15, 30 e 60 minutos e co-exposição ao gama orizanol no teste de geotaxia negativo. As medições foram repetidas cinco vezes em intervalos de 1 min. O teste foi realizado em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Newman-Keuls post hoc, comparada ao grupo controle. # Indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo de estresse térmico.

### 3.2.2 Base e topo

As moscas expostas ao estresse de 15, 30 e 60 minutos, mostraram uma atividade locomotora reduzida. Já as moscas tratadas com o composto gama orizanol e expostas nas mesmas condições de estresse não apresentaram alterações na atividade locomotora, permanecendo igual ao controle (Figura 3).

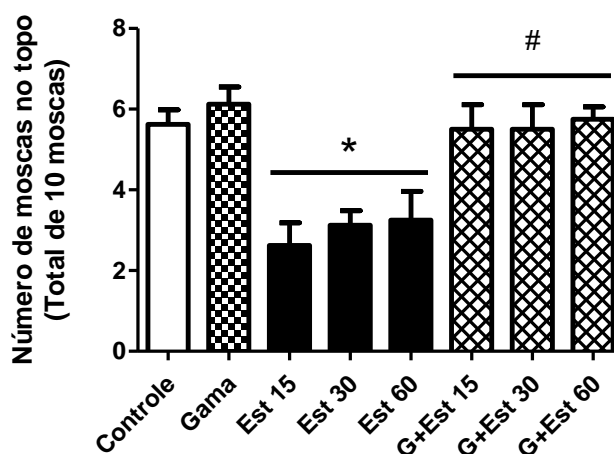


Figura 3 - Desempenho locomotor de moscas expostas ao estresse térmico durante 15, 30 e 60 minutos e co-exposição ao gama orizanol no teste Base topo. O teste foi realizado em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Newman-Keuls post hoc, comparada ao grupo controle. # Indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo de estresse térmico.



### 3.2.3 *Campo aberto*

No teste comportamental de campo aberto, as moscas expostas ao estresse de 60 minutos, apresentaram uma redução na distância percorrida. Porém, as moscas tratadas com o composto gama orizanol e expostas nas mesmas condições de estresse não apresentaram alteração na mesma. Moscas expostas ao estresse de 15 e 30 minutos, não se obteve diferença significativa em relação ao grupo controle. (Figura 4)

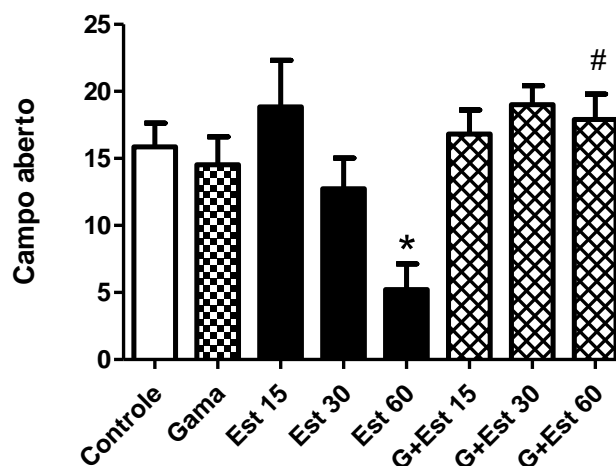


Figura 4 Desempenho locomotor de moscas expostas ao estresse térmico durante 15, 30 e 60 minutos e co-exposição ao gama orizanol no teste de Campo aberto. O teste foi realizado em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Newman-Keuls post hoc, comparada ao grupo controle. # Indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo de estresse térmico.

### 3.2.4 *Efeito sobre a atividade da Acetilcolinesterase*

As moscas expostas ao estresse de 60 minutos, apresentaram diminuição na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Moscas tratadas com o composto gama orizanol e expostas nas mesmas condições de estresse, não obtiveram alterações na atividade dessa enzima em relação ao controle. Já as moscas expostas ao estresse de 15 e 30 minutos, não obtiveram diferença significativa entre os grupos (Figura 5).

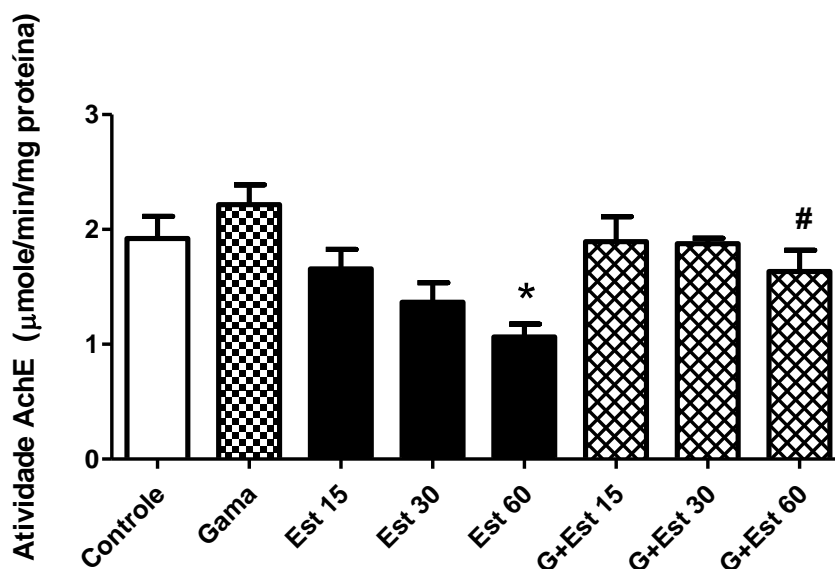


Figura 5 - Efeito da exposição ao estresse térmico (15, 30 e 60 min) e co-exposição de gama orizanol na atividade da enzima (AchE). Os dados são demonstrados através de média  $\pm$  desvio padrão. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Newman-Keuls post hoc, comparada ao grupo controle. # Indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo de estresse.

### 3.3 Estresse oxidativo e Defesas antioxidantes de *Drosophila Melanogaster* exposta a estresse térmico

#### 3.2.1 Níveis de Espécies Reativas

Nos marcadores de estresse oxidativo, as moscas expostas ao estresse de 60 minutos apresentaram um aumento de na geração de espécies reativas (Figura 6). No entanto, as moscas tratadas com o composto gama orizanol e expostas nas mesmas condições de estresse não apresentaram alterações nesses níveis. Já as moscas expostas ao estresse de 15 e 30 minutos, não obtiveram diferença significativa em relação ao grupo controle.

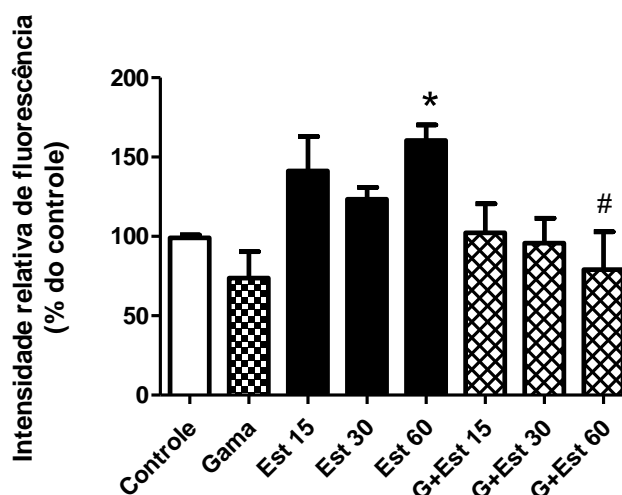


Figura 6 - Efeito da exposição ao estresse (15, 30 e 60 min) e tratamento com gama orizanol na produção de espécies reativas (RS). Os dados são demonstrados através de média  $\pm$  desvio padrão. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Newman-Keuls post hoc, comparada ao grupo controle. # Indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo de estresse.

### 3.3.2 Peroxidação lipídica/ Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis de TBARS (Figura 7).

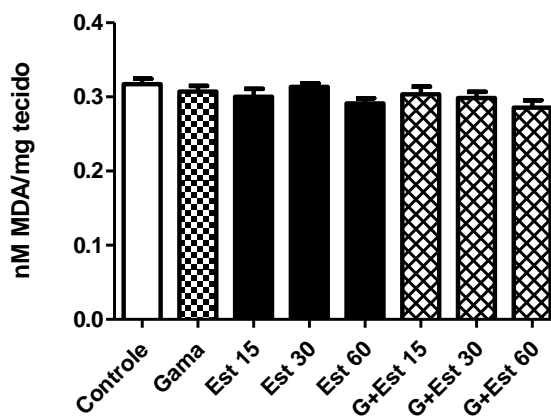


Figura 7 - Efeito da exposição ao estresse térmico (15, 30 e 60 min) e co-exposição de gama orizanol nos níveis de TBARS. Os dados são demonstrados através de média  $\pm$  desvio padrão.

### Efeito sobre a atividade de enzimas antioxidantes

A atividade de SOD foi aumentada nos grupos de estresse de 30 e 60 minutos, não havendo alteração significativa no grupo que sofreu o estresse de 15 minutos. Já as moscas tratadas com o composto gama orizanol, com exposição às mesmas condições de estresse tiveram

esses níveis enzimáticos normalizados ao níveis do controle (Figura 8). Em contraste, na atividade de Catalase não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 9).

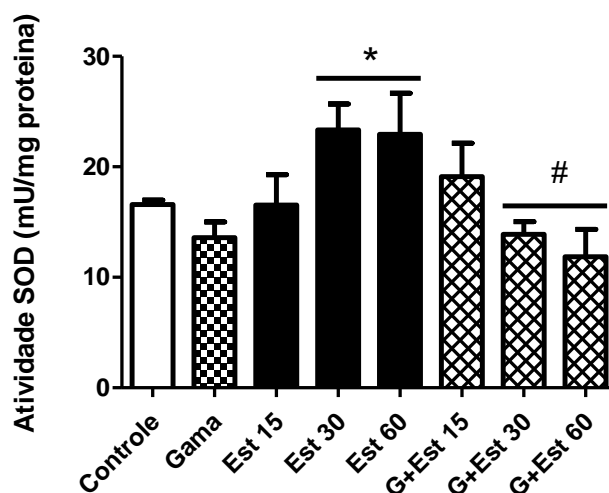


Figura 8 - Efeito da exposição ao estresse (15, 30 e 60 min) e tratamento com gama orizanol na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os dados são demonstrados através de média  $\pm$  desvio padrão. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo controle. # Indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo de estresse.

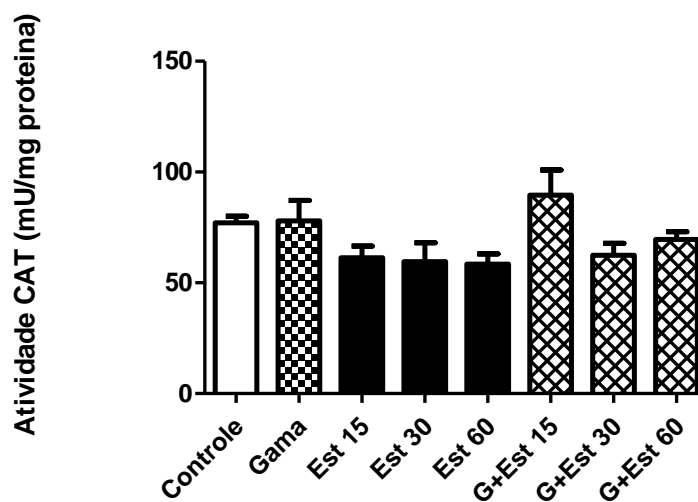


Figura 9 - Efeito da exposição ao estresse (15, 30 e 60 min) e tratamento com gama orizanol na atividade da enzima catalase (CAT). Os dados são demonstrados através de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.3.4 Redução por Resaruzina

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a viabilidade celular (Figura 10).

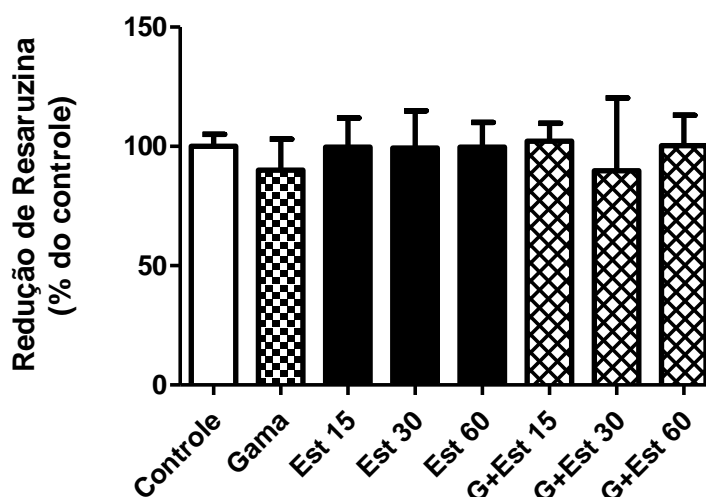


Figura 10 - Efeito da exposição ao estresse térmico (15, 30 e 60 min) e co-exposição ao gama orizanol na viabilidade celular. Os dados são demonstrados através de média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4. DISCUSSÃO

Os dados obtidos nesse estudo mostram que *Drosophila melanogaster* é bastante sensível ao estresse, por 60 minutos principalmente, apresentando alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo. O tratamento com o composto gama orizanol foi capaz de prevenir os danos causados pelo estresse neste modelo, tanto comportamental como bioquímico.

Nos parâmetros comportamentais, as moscas expostas ao estresse em determinados grupos, como, geotaxia negativa (30 e 60 min), base e topo (15, 30 e 60 min) e campo aberto (60 min) apresentaram redução significativa quanto a atividade locomotora. Isso se dá ao fato do desgaste geral no organismo causado pelo estresse.<sup>38</sup> Em contraste, os grupos tratados com o composto gama orizanol e expostos nas mesmas condições de estresse, não obtiveram alterações quanto a locomoção comparados com o grupo controle. Foi verificado também a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) estando diretamente relacionada na neurotransmissão colinérgica, degradando a acetilcolina que finaliza o processo de neurotransmissão.<sup>39</sup> Estando assim associada na atividade locomotora das moscas. A atividade da AChE, apresentou alterações nos grupos expostos ao estresse de 60 minutos.

No entanto, as moscas tratadas com o composto gama orizanol, porém expostas nas mesmas condições de estresse, não obtiveram diferença significativa nos níveis de AchE em comparação ao grupo controle. O composto gama orizanol é rico em polifenóis antioxidantes bioativos, um exemplo é o ácido ferúlico,<sup>40</sup> obtendo como uma das ações a redução da lesão isquêmica cerebral, a partir da modulação da reação inflamatória e regulando várias vias de sinalização. Em estudo realizado anteriormente, o ácido ferúlico demonstrou reduzir regiões do infarto e prevenção de células neuronais, realizando modulação nas vias de sinalização, incluindo a via PI3K / Akt e a ativação de caspase-3, durante a isquemia cerebral focal.<sup>41</sup> Sendo esta, uma possível explicação na proteção do gama orizanol quanto aos danos causados na locomoção das moscas.

Em relação aos marcadores de estresse oxidativo houve um aumento na produção de espécies reativas nos grupos de estresse de 60 minutos, indicando que o estresse eleva esses níveis, isto ocorre quando o sistema de defesa antioxidante não é suficiente para neutralizar a ação das espécies reativas (ER).<sup>42</sup> Consequentemente, houve um aumento nos níveis da atividade da SOD nas moscas expostas a estresse de 30 e 60 minutos podendo ser uma tentativa na diminuição dos radicais livres gerados pela exposição ao estresse.<sup>43</sup> Já a atividade da enzima catalase não foi alterada em nenhum dos grupos estudados, uma possível explicação seria que a resposta gerada pelo estresse é gerada por um agente superóxido. Em contraste, gama foi capaz de proteger ER. Há vários relatos em que o gama orizanol possui propriedades benéficas a saúde, como, melhora do padrão de lipídios no plasma, diminuição do colesterol total no plasma e um aumento dos níveis de colesterol HDL, inibindo a agregação das plaquetas.<sup>44</sup> Há relatos também quanto as propriedades antioxidantes do gama orizanol em sistemas *in vitro*.<sup>45</sup> Explicando assim, a proteção do gama orizanol na geração de espécies reativas.

Em relação aos níveis de tbars não houve diferença significativa em nenhum dos grupos, uma explicação se dá ao fato do estresse não ter ocasionado alterações quanto a peroxidação lipídica celular, uma vez que a enzima SOD atuou para reduzir os radicais livres. Consequentemente, como o estresse não provocou dano celular. Consequentemente, não havendo dano celular, não houve também uma diminuição na viabilidade celular, ocorrendo manutenção da mesma.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciaram pela primeira vez que o composto gama orizanol é capaz de proteger aos danos ocasionados pelo estresse ao frio na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, tanto em nível comportamental, quanto bioquímico.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LEVI L. Sociedade, stress e doença – investimentos para a saúde e desenvolvimento: causas, mecanismos, conseqüências, prevenção e promoção. **V Congresso de Stress da ISMA – BR (International Stress Management Association) e VII Fórum Internacional de Qualidade de Vida no Trabalho**. Porto Alegre. 2005.
2. Revista Proteção. Doenças Ocupacionais: Estresse atinge cerca de 90% da população global. Disponível em: <<http://www.protecao.com.br/noticiasdetalhe/JyjjJyjb/pagina=1>>. Acesso em: 05 de dez. 2014.
3. NAHAS MH. **Atividade Física, Saúde e Qualidade de Vida**. Londrina: Midiograf. 2001. p. 177-196.
4. HOMES TH. Rahe, R. K. The Social Readjustment Scale. **Journal Psychosomatic Research**. 1967; 4:189-94.
5. HOUAISS A, VILLAR MS, FRANCO FM. **Diccionario da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro. 2001; 1:1264.
6. DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** v. 82. 2002; p. 47-95.
7. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon. Oxford, UK. 1989.
8. GERECKE KM, KOLOBOVA A, ALLEN S, FAWER JL. Exercise protects against chronic restraint stress-induced oxidative stress in the cortex and hippocampus. **Brain Research**.v. 1509. 2013; p. 66-78.
9. CASTRO SV, LOBO CH, FIGUEIREDO JR, RODRIGUES APRR. Proteínas de choque térmico hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 7. 2013; p.261-271.
10. LINDQUIST S, CRAIG EA. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**. 1988; p. 631-677.
11. RITOSSA FM. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. **Experientia**. 1962; p. 571-573.
12. BUKAU B, HORWICH A. The Hsp70 and Hsp60 chaperonis machines. **Cell**. 1998; 351-366.
13. TOATES F. **Stress: Conceptural and Biological Aspects**. John Wiley & Sons. New York. 1999.



14. LIPP MEN. Lipp. Estresse emocional: a contribuição de estressores internos e externos. **Psiqu. Clín.** 2001; 28(6):347-349.
15. NICHOLS CD. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacol. Ther.** v. 112. 2006; p. 677-700.
16. BENTON R. Chemical sensing in *Drosophila*. **Curr. Opin. in Neurobiol.**, v. 18. 2008; p. 357-363.
17. MANSON MM. Potential cancer prevention diet potential to modulate the molecular signaling. **Trends Mol Med.** 2003; 9:11-8.
18. FAO. Arroz e nutrição humana. Roma de 2004 [citado 2012]; Disponível a partir de: <<http://www.fao.org/rice2004/en/f-sheet/factsheet3.pdf>>
19. ORTHOEFER FT. Rice bran oil: Healthy lipid source. **Food Technology.** v. 50. n.12. 1996; p. 62-64.
20. JULIANO C, COSSU M, ALAMANNI MC et al. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oil. **International Journal of Pharmaceutics.** v.299. 2005; p.146-154.
21. KRISHNA AGG, KHATOON S, SHIELA PM, SARMANDAL CV, INDIRA TN, MISHARA A. Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil. **Journal of American Oil Chemists' Society.** v.78. 2001; p. 127-131.
22. AKIHISA T, YASUKAWA K, TAMAURA T, UKIYA M, KIMURA Y, SHIMIZU N, TAKIDO M. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. **J Agric Food Chem.** 2000; 48:2313-2319.
23. JULIANO C, COSSU M, ALAMANNI M C, PIU L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **Int J Pharm.** 2005;299:146–154
24. YASUKAWA K, AKIHISA T, TAMAURA T, TAKIDO M. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biol Pharm Bull.** 1998; 21:1072–1076.
25. WILSON TA, NICOLOSI RJ, WOOLFREY D, KRITCHEVSKY D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **J Nutr Biochem.** 2007; 18:105–112.
26. NAKAYAMA S, MANABE A, SUZUKI J, SAKAMOTO K, INAGAKI T. Comparative effects of two forms of gamma oryzanol in different sterol compositions on hyperlipidemia induced by cholesterol diet in rats. **Jpn J Pharmacol.** 1987; 44:135–144.

27. HEINRICHSEN ET, HADDAD GG. Role of High-Fat Diet in Stress Response of *Drosophila*. **PLoS ONE**. 2012; 7(8): e42587.
28. JIMENEZ DEL-RIO M, MARTINEZ C, PARDO CV. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. **Neurochem. Res.**, v. 35. 2010; p. 227-238.
29. FEANY MB, BENDER W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 404. 2000.
30. HIRTH F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v.9. 2010; p.504–23.
31. OHAKAWA H, OHISHI U, YAGI K. Assay of lipid peroxidation in rat tissues by thiobarbituric reaction. **Anal Biochem**. 1979; 95:145–9.
32. PEREZ SF, SANTAMARIA A, PEDRAZA CJ, MEDINA CON, RIOS C, SEGOVIA J. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. **Neurochem.Res**. 2004; 29(4) Pág: 729–733.
33. AEBI H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. 1984; 05:121–125
34. VLADIMIR A, KOSTYUK A, POTAPOVICH AI. Superoxide driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. **Biochem Intl**. 1989; 19:117–1124
35. ELLMANN GE, COURTNEY KD, ANDERSON V ET AL. A new calorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**. 1961;7:88–95
36. FRANCO JL, POSSER T, DUNKLEY PR, DICKSON PW, MATTOS JJ, MARTINS R, ET AL. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic Biol Med**. 2009;47:449-57.
37. BRADFORD MM. **Anal Biochem** v.72. 1976; p. 248-254
38. LIPP MEN. O stress está dentro de você. São Paulo: Contexto; 2000.

39. BALLARD CG, GREIG NH, GUILLOZET-BONGAARTS AL, ENZ A, DARVESH S. Cholinesterases: Roles in the brain during health and disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2005; 2, 307–318.
40. SUGANO M, KOBAYASHI K, TSUJI E. Health benefit of rice bran oil. *Anticancer Res.* 1999; 19: 3651-3658
41. KOH PO. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. *Neurosci Lett.* 2012; 507 (2):156–160.
42. SUBUDHI AW, SCOTT LD, KIPP RW, WAYNE EA. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2001; 11: 32-9.
43. CALABRESE V, SCAPAGNINI G, RAVAGNA A, FARIELLO RG, GIUFFRIDA STELLA AM, ABRAÃO NG. Vitamin K3 triggers human leukemia cell death through hydrogen peroxide generation and histone hyperacetylation. *Pharmazie.* 2005; pp. 765-771
44. CICERO AND GADDI AFG, CICERO A, GADDI. Rice bran oil and  $\gamma$ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinemias and other conditions. *Phytother. Res.* 2001; pp. 277-289
45. KIM, GODBER JS. Oxidative stability and vitamin E levels increased in restructured beef roast with added rice bran oil. *J. Food Qual.* 2001; pp. 17-26

## 7. ANEXOS

ANEXO 1: Instruções para submissão de artigos à revista Nutrire

### Instruções para Autores Nutrire

Disponível em: <http://www.revistanutrire.org.br/site/instrucoes#III2>

#### I. Escopo e política editorial

A **Nutrire** é um periódico quadrimestral que tem como objetivo divulgar pesquisas em nutrição humana com adequada qualidade metodológica, originalidade e relevância para as seguintes áreas:

- Alimentos
- Bioquímica da Nutrição
- Nutrição Clínica
- Nutrição Experimental
- Nutrição em Saúde Pública
- Nutrição e Atividade Física
- Nutrigenômica
- Segurança Alimentar e Nutricional

São aceitas submissões em português, inglês e espanhol de artigos que se enquadrem em uma das categorias abaixo:

- **Artigos originais:** estudos epidemiológicos, clínicos ou experimentais.
- **Relatos de caso:** artigos que relatem situações raras, intervenções pouco frequentes ou inovadoras, desde que, bem documentadas.
- **Artigos de revisão:** análise crítica ou sistemática da literatura que aborde um tema relacionado ao objetivo da revista.
- **Cartas ao editor:** documentos que abordem críticas, sugestões ou opiniões sobre artigos publicados na Nutrire.
- **Editorial:** na maioria das vezes, encomendado pelos editores, com o objetivo de discutir um tema ou artigo original, controverso ou interessante a ser publicado pela **Nutrire**.

**Observação:** Artigos que envolvam ensaios clínicos somente serão aceitos mediante apresentação do número de registro e base de cadastro (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br/about/>) segundo normatização de ensaios clínicos da [PORTARIA nº 1.1345, DE 2 DE JULHO DE 2008](#) do Ministério da Saúde do Brasil.

#### II. Processo de avaliação dos artigos

Todos os artigos submetidos que estiverem de acordo com as normas definidas neste documento, passam primeiramente por uma pré-avaliação e caso estejam dentro dos padrões

desejados são encaminhados para avaliação duplo-cega realizada por pelo menos dois revisores ad hoc.

De forma mais detalhada o fluxo de tramitação dos artigos submetidos é o seguinte:

1. Os artigos submetidos passam primeiramente por uma verificação, realizada pelo Assistente Editorial, quanto ao atendimento das Instruções para os Autores. Artigos que não atendam as normas serão devolvidos para adequação e ressubmissão antes que possam entrar em avaliação. Ao entrarem em avaliação os artigos são encaminhados ao Editor Executivo que, caso não encontre problemas de escopo e alinhamento com a política editorial envia o artigo para o Editor Associado responsável pela área de abrangência do trabalho.
2. O Editor Associado ao receber um artigo responde questionário de pré-avaliação para verificar aspectos críticos como: aderência ao escopo, relevância e originalidade, fundamentação teórica e adequação da linguagem. Após realizar a pré-avaliação os Editores Associados tem autonomia para recomendar a recusa ou encaminhar o artigo para a avaliação por pares.
3. Os artigos que passam na etapa da pré-avaliação são encaminhados para a avaliação detalhada de Revisores ad hoc, especialistas no tema do artigo, escolhidos e convidados pelo Editor Associado.
4. Após receber as avaliações de pelo menos dois Revisores, o Editor Associado elabora um parecer e envia sua recomendação de aceite, revisão ou recusa.
5. Os Editores revisam todos os pareceres e recomendações podendo intervir quando necessário, enviando aos Autores o parecer final recomendando que o artigo seja: recusado, aceito sem modificações ou modificado (conforme sugestões dos revisores) para que possa ser reconsiderado para publicação.

### III. Informações gerais

A **NutrIRE** segue as orientações dos “Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas”, publicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (disponível: <http://www.icmje.org/>).

#### 1. Arquivos necessários

Durante a submissão do artigos os seguintes arquivos devem ser enviados:

- [Carta de submissão](#): **cartasubmissao.docx**;
- [Página de rosto](#): **paginaderosto.docx**;
- [Manuscrito completo](#): **manuscrito.docx**;
- [Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa](#): **etica.docx** (para artigos originais);
- [Transferência de direitos de reprodução \(copyright\)](#): **copyright.docx** (após o aceite).

#### 2. Formato dos arquivos

**Todos os arquivos devem ser preparados utilizando editor de texto Microsoft Word® 2007 ou posterior** conforme as seguintes especificações:

- folha tamanho A4 (210 x 297 mm);
- margem de 25 mm em todos os lados;
- numeração sequencial de páginas na parte superior direita;

- formatação em coluna única; e
- fonte Times New Roman, tamanho 12.

**As figuras** devem estar inseridas no corpo do documento na posição que proporcione o melhor fluxo de leitura para os Editores e Revisores.

**As tabelas** devem ser inseridas ao final, após as referências.

### 3. Idiomas aceitos

São aceitas submissões em português na ortografia oficial, inglês e espanhol.

### 4. Limites

Todos os artigos submetidos devem estar dentro dos limites estabelecidos para cada tipo de artigo ou serão devolvidos aos Autores:

- **Artigos originais:** 3000 palavras (excluindo: página de rosto, resumo, abstract, tabelas, gráficos, figuras e referências) e até 30 referências.
- **Relatos de caso:** 2000 palavras (excluindo: página de rosto, resumo, abstract, tabelas, gráficos, figuras e referências) e até 20 referências.
- **Artigos de Revisão:** 5000 palavras (excluindo: página de rosto, resumo, abstract, tabelas, gráficos, figuras e referências) e até 60 referências.
- **Cartas ao editor:** 1000 a 1500 caracteres, com 1 tabela ou 1 figura e no máximo 10 referências.

### 5. Autoria

Todas as informações sobre os Autores e suas afiliações **devem ser inseridas somente:**

- **no sistema de submissão online**, de onde serão extraídas caso o artigo seja aceito;
- **na Carta de Submissão;** e
- **na Página de Rosto** juntamente com outras informações destinadas apenas aos Editores.

**Autores e afiliações** não devem ser incluídos no arquivo do artigo para garantir a avaliação duplo-cega.

Também devem ser retiradas todas as propriedades dos arquivos enviados.

## IV. Preparação dos arquivos

### 1. Carta de submissão

**Nome do arquivo:** **cartasubmissao.docx**

A carta de submissão deve assinada por todos os autores. Nesta carta os autores devem referir que o artigo é original, nunca foi publicado e não foi e não será enviado a outra revista enquanto sua publicação estiver sendo considerada pela **Nutrire**. Além disso, deve ser declarado que todos os autores participaram na concepção do projeto e/ou análise dos dados obtidos e/ou da redação final do artigo e que todos concordam com a versão enviada para publicação. Deve citar, também, que não foram omitidas informações a respeito de financiamentos para pesquisa ou de ligação com pessoas ou companhias que possam ter interesse nos dados abordados pelo artigo.

## 2. Página de rosto

Nome do arquivo: **paginaderosto.docx**

A página de rosto deverá conter os seguintes elementos na seguinte ordem:

- **Título** no idioma original.
- **Lista de autores** na ordem definitiva para publicação. Incluir sempre nome completo de todos os autores e utilizar numerais sobrescritos para indicar suas afiliações institucionais.
- **Lista de afiliações**, uma por linha, identificadas por numeral sobrescrito no início da linha. Para cada afiliação é obrigatório incluir as seguintes informações:

*Grupo/Laboratório (opcional), Departamento, Instituição, Cidade, Estado, País*

- **Informações adicionais** sobre os Autores. Incluir após as iniciais de cada autor qual a sua titulação mais importante e a instituição de ensino, pesquisa ou assistência à qual pertence.
- **Local de realização** onde o trabalho foi desenvolvido. Incluir apenas Grupo/Laboratório (opcional), Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País.
- **Dados para correspondência** incluindo:
  1. **nome completo do autor responsável** pela publicação;
  2. **endereço institucional** (Grupo/Laboratório [opcional], Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País) seguido do CEP e endereço postal; e
  3. **e-mail** para contato.
- **Trabalho baseado em tese**: Caso o trabalho tenha se baseado em Tese, indicar o título, ano e instituição (Grupo/Laboratório [opcional], Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País) onde foi apresentada.
- **Trabalho apresentado em evento**: Caso o trabalho tenha sido apresentado em reunião científica, indicar o evento, local e data de realização.
- **Fontes de financiamento** devem ser indicadas caso o trabalho tenha recebido auxílio financeiro, indicando:
  1. o tipo de auxílio,
  2. nome do agente financeiro e
  3. o número do processo.
- **Agradecimentos** devem descrever, de forma sucinta, as pessoas ou instituições que contribuíram para o estudo, mas que não são autores.
- Inserir o número de protocolo do parecer do comitê de ética (para artigos originais)
- **Declaração de conflito de interesse**: qualquer ligação de um ou mais autores com empresas e companhias que possam ter qualquer interesse na divulgação do manuscrito. Se não houver nenhum conflito de interesse escrever “os autores declaram não haver conflito de interesse”.

## 3. Manuscrito completo

Nome do arquivo: **manuscrito.docx**

O documento com o texto principal do manuscrito deve ser preparado conforme as instruções abaixo.

### 3.1 Informações gerais

### Unidades, notas, siglas etc.

**Atenção:** Nos artigos em inglês as casas decimais **devem ser separadas por ponto.**

- **Unidades de medida** devem sempre utilizar o padrão definido pelo Sistema Internacional - SI.
- **Siglas** utilizadas em tabelas, figuras, etc, devem ser definidas no rodapé desses elementos, mesmo se já tiverem sido definidas no texto.
- **Nomes de produtos** e equipamentos devem vir acompanhados do símbolo de marca registrada (®) e de informações sobre o nome, cidade e país do fabricante.
- **Abreviaturas e siglas** não devem ser utilizadas nos títulos e resumos.

### Agradecimentos e autoria

- **Agradecimentos e fontes de financiamento** não devem ser inseridas no texto principal do manuscrito.
- Não inserir o número de protocolo do parecer do comitê de ética (para artigos originais)
- **Nenhuma informação sobre autoria** deve estar presente neste arquivo.

### *3.2 Primeira página*

A primeira página do arquivo do manuscrito completo deve ter os seguintes elementos nesta ordem:

1. **Título e título para cabeçalho no idioma principal** do artigo;
2. **Título e título para cabeçalho traduzidos** para o Inglês;
3. **Resumo estruturado e palavras-chave no idioma principal** do artigo;
4. **Resumo estruturado e palavras-chave traduzidos** para o Inglês;

### Título

O Título principal e sua versão reduzida para cabeçalho de página não devem utilizar abreviaturas ou siglas. O título para cabeçalho deve ter de 6 a 8 palavras e no não mais que 60 caracteres incluindo os espaços.

Ex.:

Título completo: Consumo Alimentar e Disponibilidade de Alimentos dos Moradores da Ilha de Cotijuba no Bioma Amazônico

Título abreviado: Consumo alimentar dos moradores da Ilha de Cotijuba

### Resumo estruturado

- deve ter no máximo 250 palavras e não pode utilizar abreviaturas e siglas.
- deve ser estruturado na forma de seções:
  - **Artigo original:** objetivo, métodos, resultados e conclusões (objective, methods, results and conclusions)
  - **Relato de casos:** objetivo, descrição do caso e comentários (objective, case description and comments)
  - **Artigos de revisão:** objetivo, fonte de dados, síntese dos dados e conclusões (objective, data source, data synthesis and conclusions)



## Palavras-Chave

Não utilize palavras do título do artigo palavras-chave. As palavras-chave devem ser pesquisadas nas fontes de descritores abaixo:

- Palavras-chave em português devem ser obtidas na base de dados [DeCS de Descritores em Ciências da Saúde](#), da Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde-LILACS.
- Palavras-chave em inglês devem ser extraídas do [Medical Subject Headings-MESH](#), da National Library of Medicine.

### *3.3 Estrutura de tópicos do texto completo*

Os arquivos devem ser organizados seguindo uma estrutura pré-definida para cada tipo de artigo:

## Artigo original

Artigos originais devem conter a seguinte estrutura:

- **INTRODUÇÃO**  
Deve ser sucinta contendo de 4 a 6 parágrafos,
- **OBJETIVOS**  
Deve informar porque o estudo foi realizado e quais as hipóteses iniciais (se houverem). Definir precisamente qual o objetivo principal e os secundários (se houverem).
- **MÉTODO**  
Deve descrever a casuística, o delineamento de estudo, procedimentos empregados e tipo de análise estatística e declaração de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa,
- **RESULTADOS**  
Devem ser claros e objetivos, sem repetir os resultados já apresentados nas tabelas e gráficos,
- **DISCUSSÃO**  
Deve interpretar os resultados mais importantes, compará-los com dados da literatura, descrever possíveis aplicações dos achados e as limitações do estudo.
- **CONCLUSÕES**  
Último parágrafo da discussão, deve responder aos objetivos do estudo.

## Relatos de caso

Relatos de caso devem conter a seguinte estrutura:

- **INTRODUÇÃO**  
Deve ser sucinta contendo de 2 a 4 parágrafos, descrevendo o que é conhecido sobre a doença ou procedimento em questão,
- **DESCRIÇÃO DO CASO**  
Não deve colocar dados que possam identificar o paciente,
- **DISCUSSÃO**  
Deve apresentar a comparação dos achados com os dados da literatura.

## Artigo de revisão



### 3.6 Referências bibliográficas

As referências bibliográficas devem seguir o estilo preconizado no “Uniform Requirements for Manuscripts”, elaborado pelo “Internacional Committee of Medical Journal Editors” e disponível em [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

A citação das referências no corpo do texto deve ser realizado utilizando números sobrescritos sem uso de parênteses e na ordem de utilização das citações. Exemplos:

- “A melhor técnica conhecida atualmente.<sup>1</sup>”
- “... que é, segundo Silva et al, 2006<sup>1</sup>, a melhor técnica conhecida atualmente.”

**Toda a literatura utilizada e citada no texto deverá obrigatoriamente estar na lista de referências e vice versa.** A lista de referências deve estar numerada conforme a sequência de citação no texto (não em ordem alfabética). **A Nutrire executa verificação de plágio.**

Ao elaborar sua lista de referências observe o seguinte:

- Deve ser dada preferência a citação de literatura recente.
- A citação de livros e outras fontes de difícil acesso deve ser evitada.
- Não utilizar teses, dissertações, artigos não publicados e artigos em preparação.
- Citar os 6 primeiros autores, se houverem mais do que seis, utilizar a terminologia “et al”.

### 4. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

Nome do arquivo: **etica.docx**

Os artigos originais devem anexar uma cópia da aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição onde foi realizada a pesquisa. A **Nutrire** adota a RESOLUÇÃO 196/96 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, que aprovou as “Novas Diretrizes e Normas Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos” (DOU 1996, Out 16; nº 201, seção 1:21082-21085). **Somente serão aceitos trabalhos elaborados de acordo com estas normas.**

### 5. Transferência de direitos de reprodução (copyright)

Nome do arquivo: **copyright.docx**

No momento da aceitação do manuscrito para publicação na **Nutrire**, todos os autores devem assinar formulário enviado pela Revista, no qual reconhecem que, a partir desse momento, a SBAN passa a ser a única detentora dos direitos de reprodução do manuscrito. O artigo só será publicado após a chegada desse termo de transferência original assinado por todos os autores.

## V. Submissão eletrônica

Todos os artigos devem ser submetidos através do sistema Submit instalado para a **Nutrire**.

1. Como acessar o sistema Submit

O sistema pode ser acessado pelo link <http://nutrire.submitcentral.com.br>. Antes de realizar um novo cadastro procure primeiro utilizar o recurso “Esqueci minha senha” com os e-mails que utiliza freqüentemente. Caso não localize um cadastro faça um novo.

## 2. Como submeter seu artigo?

Após efetuar o login certifique-se de utilizar o menu lateral para acessar o “Painel do Autor” e clique no link para “Iniciar uma nova submissão”.

A submissão do artigo está dividida em cinco passos. Siga as instruções na tela para cada etapa do processo:

- **Passo 1:** inserir dados Título/Resumo e Palavras-chave
- **Passo 2:** Inserir dados dos autores e respectivas afiliações
- **Passo 3:** Envio de arquivos:
  - Siga as intruções detalhadas nestas normas para a elaboração dos arquivos necessários.
- **Passo 4:** Informações gerais do artigo.
- **Passo 5:** Revisão e finalização da submissão.