

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

## **RESTRIÇÃO CALÓRICA E FICOCIANINA NA ATENUAÇÃO DE RADICAIS LIVRES EM CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae***

**Andressa Centenaro, Dayane Pilatti, Aline Pazinato, Luciane Maria Colla, Telma Elita Bertolin\***

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo*

\*Email: [telma@upf.br](mailto:telma@upf.br)

### **RESUMO**

Muitas são as teorias que explicam o processo do envelhecimento. Estratégias como a restrição calórica e o uso de antioxidantes podem contribuir para a atenuação de radicais livres, evitando a sobrecarga dos sistemas de defesa endógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da restrição calórica e da ficocianina na atenuação dos radicais livres, utilizando como modelo experimental a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para cultivo das células, utilizou-se meio GYMP. Foram realizados tratamentos com restrição calórica de glicose e adição de ficocianina. Os resultados analisados mostrou um consumo da glicose nas primeiras 24 horas. Quanto ao crescimento celular, o método utilizado não evidenciou diferença entre os tratamentos. O pH se manteve constante, em torno de cinco. Em relação à geração de radicais livres, os resultados ainda preliminares indicam que a ficocianina aliada a restrição calórica pode estar diminuindo a formação de radicais livres. Este resultado poderá ser extrapolado para o homem, visto que, a levedura é um eucarioto com mecanismos metabólicos semelhantes aos eucariotos superiores.

Palavras-chave: leveduras, antioxidantes, estresse oxidativo, envelhecimento, morte celular

### **1 INTRODUÇÃO**

As causas do envelhecimento humano têm sido estudadas nos últimos anos e apontam para teoria da formação de radicais livres. A teoria sugere que dietas calóricas geram mais radicais livres e se estes não são suficientemente inativados podem ser causadores de patologias, acelerando o processo de envelhecimento. Os radicais livres são gerados em diversas reações metabólicas, do total de oxigênio que entra no organismo através da respiração, 2% a 5% acabam formando radicais livres, os quais são chamadas espécies reativas do oxigênio - EROs. O acúmulo de EROs é definido como estresse oxidativo e causa danos á estrutura de biomoléculas como DNA, lipídios, carboidratos, proteínas além de outros componentes celulares.

Estudos afirmam que a restrição calórica contribui com aumento do tempo de vida, em razão da menor geração de EROs, visto o processo de respiração celular.

Antioxidantes são substâncias que reagem com radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e a conseqüente destruição tissular (Halliwell, Gutteridge, 2000). O pigmento ficocianina extraído da microalga *Spirulina platensis* apresenta potencial

antioxidante, podendo minimizar os danos à membrana celular inibindo a formação de radicais livres (Bertolin et al., 2006).

Várias são as razões que tornam a levedura *S. cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico celular para estudo de estresse oxidativo. Trata-se de um organismo provido de núcleo e organelas com metabolismo semelhante a eucariotos superiores. Pesquisas mostram correlação de aproximadamente 80% com humanos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da restrição calórica e da ficocianina na atenuação dos radicais livres utilizando como modelo experimental *S. cerevisiae*.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Material e Métodos**

A levedura *S. cerevisiae* foi isolada de fonte comercial. Os tratamentos consistiram em quatro grupos experimentais: controle, restrição calórica de 30%, controle + ficocianina e restrição calórica de 30% + ficocianina. Para o cultivo das células de leveduras utilizou-se meio GYMP contendo 1% (p/v) de extrato de malte, 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 0,2% (p/v) de fosfato de sódio monobásico e 2% (p/v) de glicose. As amostras dos diferentes tratamentos foram coletadas em intervalos de 24 horas durante um período de 72 horas para determinação do número de células viáveis, biomassa, pH, açúcares redutores totais e radicais livres.

#### **Contagem de células viáveis e determinação de biomassa**

Para a determinação do número de células viáveis, alíquotas de 1mL foram diluídas em solução de NaCl 0,85% e plaqueadas em meio GYMP solidificado com 2% (p/v) de ágar. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas e após este período fez-se a contagem das colônias para a determinação da viabilidade celular. A concentração de biomassa foi determinada através da leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 610 nm, durante a fase exponencial de crescimento da levedura, utilizando-se uma relação pré-estabelecida na curva padrão, entre a concentração de biomassa e a absorbância.

#### **Determinação de pH**

A determinação do pH foi realizada a cada 24 horas, através de método potenciométrico.

#### **Determinação de açúcar redutor**

As amostras foram hidrolisadas e a determinação de açúcares redutor (AR) foi realizada por espectrofotometria através do método do 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

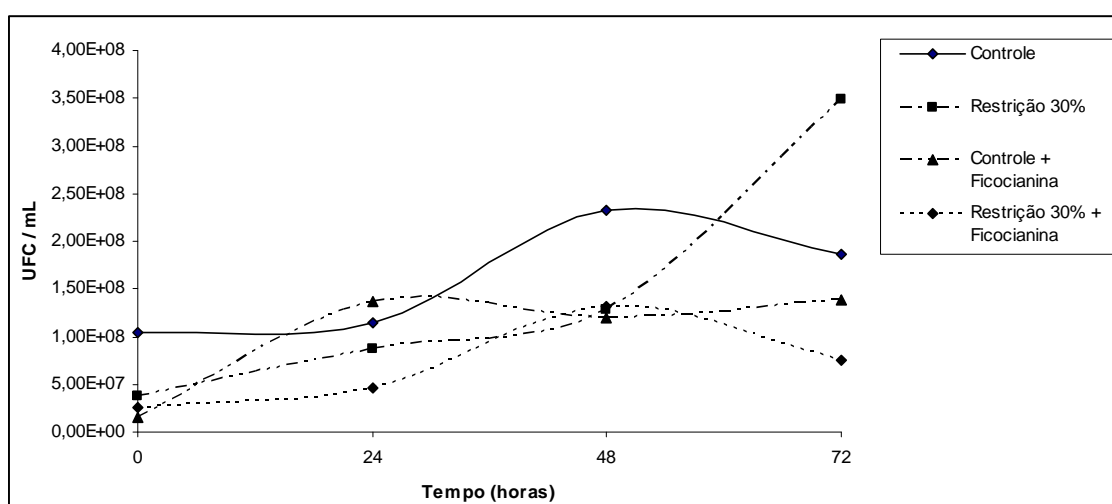
#### **Quantificação de radicais livres**

As células provenientes da fase exponencial de crescimento ( $2 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>) dos diferentes cultivos, foram submetidas à análise do índice de peróxidos de acordo com Araújo (2004) e dosagem da lipoperoxidação através da técnica TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) de acordo com Esterbauer & Cheeseman (1990).

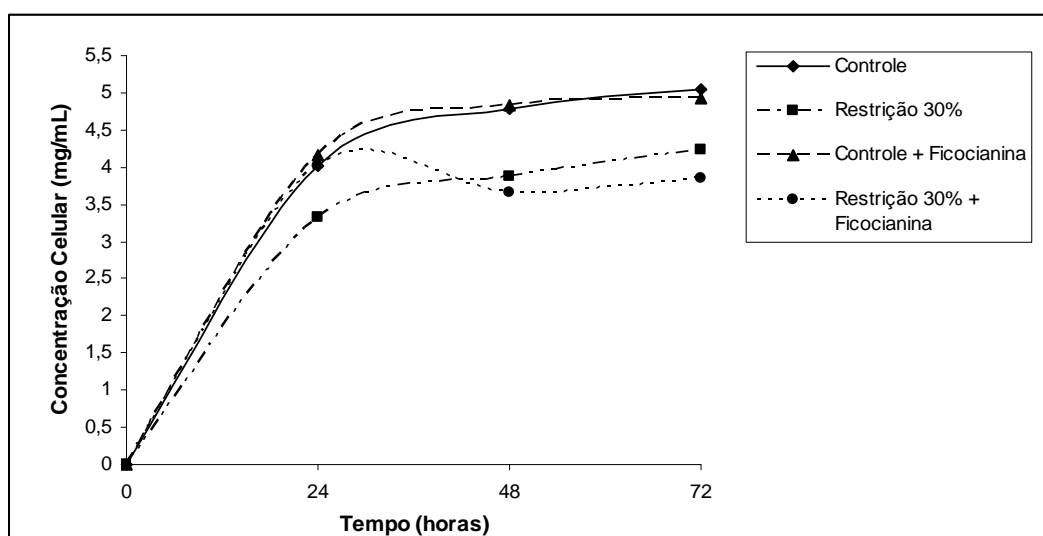
## 2.2 Resultados e Discussão

Os cultivos analisados até o momento, mostram que a glicose é consumida durante as primeiras 24 horas e o pH se mantém constante em torno de 5.

As Figuras 1 e 2 apresentam a contagem de células viáveis e a concentração celular em função do tempo de cultivo.



**Figura 1** Contagem de células viáveis em função do tempo de cultivo



**Figura 2** Concentração celular em função do tempo de cultivo

O resultado relativo às células viáveis da levedura *S. cerevisiae*, verifica-se que não ocorreu diferença entre os tratamentos, ou seja a restrição calórica aliada a ficocianina não interferiram na viabilidade das células, no tempo analisado. A Figura 2 mostra que a concentração celular apresenta um comportamento de crescimento exponencial até as primeiras 24 horas, não diferindo entre os diferentes tratamentos. A partir de 24 horas os tratamentos mostraram uma diferença 23% menor para o crescimento celular entre os tratamentos controles e os tratamentos com restrição mais ficocianina.

Este resultado sugere que após a fase exponencial, quando a fonte calórica disponível no meio é consumida o número de células mantêm-se constante, podendo este fato ser derivado da manutenção gerada entre as células que morrem e as células novas.

Os resultados relativos a geração de radicais livres, estão em desenvolvimento e mostram como já relatado por Bertolin et al., 2006 sobre o potencial antioxidante do pigmento ficocianina que estes podem estar atenuando a geração de radicais livres. Porém, faz-se necessário o estudo de outros métodos para a determinação destas espécies reativas no meio.

### 3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento mostram que a metodologia utilizada no trabalho não evidenciou diferença entre os tratamentos utilizando a restrição calórica e o pigmento ficocianina como atenuantes no processo de geração de radicais livres pelas células da levedura *S. cerevisiae*.

*Agradecimentos:* UPF e FAPERGS

### 4 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos:** teoria e prática. 2.ed. Viçosa: UFV, 1999.

BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Radicais livres e o processo de envelhecimento humano. In: **Envelhecimento humano:** saberes e fazeres. PORTELLA, Marilene Rodrigues; PASQUALOTTI, Adriano; GAGLIETTI, Mauro José (Coord.). Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2006.

ESTERBAUER H, CHEESEMAN KH. **Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal.** Methods in Enzymology. 186: 407-421, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v.31, n. 3, 1959.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos:** fundamentos, matérias-primas, produtos e processos. V.2. Pelotas: Universitaria, 1996.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. **Saccharomyces cerevisiae como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos.** Rev. Bras. Farm., 85(2): 45-47, 2004.