

## Área: Ciência de Alimentos

# EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E FICOCIANINA NA VIABILIDADE DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Camila Silveira, Bruna Seguenka, Laís Oraide Manica, Marta Beatriz Santolin,  
Telma Elita Bertolin\*

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

\*E-mail: telma@upf.br

## RESUMO

O processo do envelhecimento é uma característica do ciclo de vida dos organismos vivos, nos quais ocorrem alterações morfológicas funcionais e bioquímicas. Dentre as muitas das teorias que explicam o envelhecimento, a teoria dos radicais livres (RL) é uma das mais abrangentes e aceita na atualidade. Estratégias como a restrição calórica (RC) e o uso de antioxidantes podem contribuir na atenuação de RL e na longevidade. Objetivou-se avaliar os efeitos da RC e da ficocianina na viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A cada 24 h realizaram-se as determinações de contagem de células viáveis, dosagem do dano oxidativo através do método TBARS. O cultivo controle apresentou o maior percentual de morte celular (PMC), de 93 % em 72 h de cultivo. O uso de ficocianina aliada a RC diminuiu o PMC para 53 %. O cultivo controle adicionado de ficocianina apresentou menor apoptose (PMC), de 19 %, e o cultivo com RC não apresentou morte celular no período analisado. Os valores de TBARs para os tratamentos com RC e com ficocianina no tempo de 72 h, foram menores que os do tratamento controle, o que pode indicar que a RC e a ficocianina atenuaram o processo oxidativo no modelo experimental.

**Palavras-chave:** Envelhecimento, radicais livres, antioxidantes.

## 1 INTRODUÇÃO

O processo do envelhecimento é um fenômeno progressivo, comum a todos os seres vivos, sendo caracterizado por modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas. As projeções elaboradas pela Organização Nações Unidas (2006) indicam que no Brasil os idosos com mais de 65 anos deverão passar de 10 milhões para 50 milhões entre 2000 e 2050 e os idosos com mais de 80 anos irão passar de 1,7 milhões para quase 14

milhões no mesmo período. Estes dados mostram a necessidade de mudanças políticas e sociais à essa nova realidade (BERTOLIN et al., 2006).

As diversas teorias que buscam esclarecer o fenômeno do envelhecimento humano divergem na orientação teórica, e carecem de comprovação definitiva. Dentre as teorias existentes a teoria dos radicais livres, é uma das mais aceita na atualidade. Os radicais livres são moléculas instáveis contendo átomos que apresentam pelo menos um elétron não compartilhado no seu orbital externo o que os torna muito instáveis e reativos. Estas espécies intervêm nos transtornos do metabolismo podendo estar relacionados com a etiologia de várias doenças, como: cardiopatias, aterosclerose, câncer pulmonar, Alzheimer, Parkinson entre outras (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Para proteger a célula destes subprodutos destrutivos, os organismos contam com seus sistemas de defesa, os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, porém com o envelhecimento estes sistemas são enfraquecidos (RAMALHO, JORGE, 2006).

A ficocianina é o principal pigmento da microalga *Spirulina platensis* e tem sido relatada em diferentes estudos pela capacidade de atenuar as substâncias reativas ao oxigênio geradas durante os processos oxidativos. A dieta sob restrição calórica é evidenciada por diversos autores como uma possibilidade de atenuar o estresse oxidativo, contribuindo com a diminuição do processo do envelhecimento (SILVA, 2008; FARINATTI, 2002).

Desta forma, objetivou-se verificar como a restrição calórica conjugada com o uso de antioxidante natural, a ficocianina, podem contribuir para a atenuação do processo do envelhecimento, através da diminuição do dano oxidativo.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.1.1 Microrganismo e manutenção**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi isolada de fonte comercial (fermento biológico comercial), através de repicagens sucessivas e, mantida em meio GYMP (20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte, 5 g/L de extrato de levedura, fosfato de sódio monobásico

2 g/L e 20 g/L de ágar) sob refrigeração à 4 °C. A manutenção do microrganismo foi realizada através de repiques periódicos em meio GYMP. As culturas foram mantidas a 4 °C em ágar inclinado (cultura estoque).

### 2.1.2 Delineamento experimental

Os tratamentos experimentais para a verificação do efeito da restrição calórica e da ficocianina no cultivo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram: controle (2 % de glicose), RC de 20 %, RC de 10 %, RC 30 %, controle acrescido de 1 % de ficocianina e RC 30 % acrescido de 1 % de ficocianina.

### 2.2.3 Preparo dos inóculos e meios de cultivo

Os pré-inóculos foram obtidos pela transferência das colônias, mantidas em meio GYMP, para tubo de ensaio com 10 ml de caldo (meio GYMP com supressão do ágar com pH inicial 5,5), os quais foram incubados em estufa a 30 °C por 24 h. Os inóculos foram obtidos pela adição de 10 ml do pré-inóculo em erlenmeyer de 250 ml contendo 80 mL de caldo GYMP, os quais foram incubados em agitador orbital termostatizado a 150 rpm e 30 °C durante um período de 24 h.

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, com 160 mL de meio de cultivo conforme cada tratamento. A cada erlenmeyer foram adicionados 16 mL do inóculo (10% do volume inicial). Os cultivos foram conduzidos para um agitador orbital termostatizado (150 rpm, 30 °C), para o crescimento da levedura em aerobiose.

### 2.2.4 Determinações analíticas

#### 2.2.4.1 Determinação de células viáveis

Foram retirados 1 mL de amostra de cada tratamento e realizadas diluições em séries com solução salina 0,8 %. A partir de cada diluição foram inoculados em placa de Petri, em triplicata, contendo o meio GYMP através da técnica de espalhamento em superfície com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas por 24 h a 30°C e as colônias foram contadas em

contador de colônias marca Phoenix CP 680. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>). Para a construção da curva de viabilidade celular da levedura (Células viáveis (log UFC.mL<sup>-1</sup>) versus tempo (h)) e da análise estatística os valores de UFC.mL<sup>-1</sup> foram normalizados aplicando-se log da contagem de UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.2.4.2 Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico – TBARS

A dosagem do dano oxidativo foi realizada através da técnica TBARS de acordo com Esterbauer e Cheeseman (1990). As análises de TBARS foram realizadas somente nos experimentos Controle (C), Controle adicionado de Ficocianina (C + F), Restrição 30 % (R 30 %) e Restrição 30 % mais Ficocianina (R 30 % + F). Os resultados foram obtidos utilizando-se da dosagem de proteína e das absorbâncias do teste de TBARS. A concentração de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), a solução padrão utilizada foi albumina bovina.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Determinação de células viáveis

A Tabela 1 apresenta os resultados de contagem de células viáveis (UFC/ml) ao longo do tempo de cultivo. A contagem de células viáveis mostra que o cultivo controle, o qual possui maior concentração de glicose, apresentou um maior crescimento celular nas primeiras 48 horas, porém, após este período, apresentou maior apoptose celular. O cultivo com restrição apresentou menor crescimento celular com relação ao controle e, também, menor apoptose celular após as 48 horas de cultivo.

A análise estatística demonstra que os meios de cultivo após as 72 horas mantiveram a viabilidade celular constante e que o cultivo com restrição e ficocianina apresentaram menor declínio de células viáveis a partir do tempo de 48 horas. Portanto, o cultivo com restrição e com ficocianina são mais favoráveis á levedura em relação ao meio controle. Para que os resultados fossem confirmados fez-se o percentual de redução (percentual de morte celular).

Tabela 1: Resultados da análise estatística da contagem de células viáveis

Tempo (h)	Controle	Restrição 30%	Controle + Ficocianina	Restrição + Ficocianina
0	6,67± 0,73 <sup>a</sup>	6,94±0,10 <sup>a</sup>	7,10±0,04 <sup>a</sup>	6,72±0,11 <sup>a</sup>
24	8,16± 0,07 <sup>a</sup>	8,00±0,06 <sup>a</sup>	8,12±0,05 <sup>a</sup>	8,38±0,14 <sup>b</sup>
48	9,36± 0,02 <sup>b</sup>	8,17±0,19 <sup>a</sup>	8,26±0,15 <sup>a</sup>	8,15±0,26 <sup>a</sup>
72	8,21± 0,08 <sup>b,c</sup>	8,25±0,03 <sup>c</sup>	8,19±0,05 <sup>b,c</sup>	7,88±0,01 <sup>a</sup>
96	7,92± 0,06 <sup>a</sup>	8,14±0,09 <sup>a</sup>	8,53±0,05 <sup>b</sup>	8,66±0,10 <sup>b</sup>

\* Letras diferentes em uma mesma linha correspondem à diferença significativa pelo Teste de Tukey com o  $p < 0,05$ . Os valores das médias são relativas aos resultados experimentais das análises realizadas em triplicata.

A Tabela 2 apresenta os resultados de porcentagem de morte celular que relaciona a concentração celular no tempo de 72 horas em comparação com o tempo de 48 horas, onde foi observado o pico de crescimento.

Tabela 2: Percentual de morte celular em 72 horas com relação ao cultivo em 48 horas

Tratamento	Morte celular (%)
Controle	92,73
Restrição 30%	0,00
Controle + Ficocianina	18,77
Restrição 30% + Ficocianina	52,60

Pode-se observar, a partir dos resultados obtidos, que o cultivo controle teve maior percentual de morte celular, 92,73 %, com relação aos demais cultivos. Observou-se também que o cultivo restrição 30% e o cultivo controle mais ficocianina foram os que apresentaram melhores resultados, ou seja, apresentaram menor apoptose celular, 0,00 % e 18,77 % respectivamente, indicando que a restrição e a ficocianina, quando usados como fator isolado, auxiliam na viabilidade celular da levedura, porém, o uso de ficocianina mais restrição de forma concomitante apresentou valores de PMC de 52,60 %. Este resultado pode estar caracterizando efeito pró-oxidante quando aplica-se o sinergismo da restrição com a ficocianina.

## 2.2.2 Determinação das substâncias reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico – TBARS

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos pela análise de TBARS.

Tabela 3: Valores de TBARS (mg MDA/mg<sub>proteína</sub>) para os tratamentos no decorrer do tempo

Tempo (h)	Controle*	Restrição*	Controle + Ficocianina*	Restrição + Ficocianina*
0	28,989±6,421 <sup>a</sup>	27,441±3,264 <sup>a</sup>	18,025±2,249 <sup>a</sup>	17,801±1,064 <sup>a</sup>
24	4,951±0,304 <sup>a</sup>	5,593±0,949 <sup>a</sup>	5,166±0,731 <sup>a</sup>	8,082±1,774 <sup>a</sup>
48	10,733±0,242 <sup>a</sup>	6,674±0,885 <sup>a</sup>	6,656±0,968 <sup>a</sup>	7,480±1,641 <sup>a</sup>
72	10,127±1,005 <sup>a</sup>	7,544±0,345 <sup>b</sup>	6,415±0,523 <sup>b</sup>	6,133±0,336 <sup>b</sup>

\* Resultados de média ± desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem à diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de Tukey.

Pode-se observar, conforme mostra a Tabela 3, que os cultivos apresentaram valores decrescentes de TBARS no tempo de 0 a 24 horas de cultivo e que, após as 24 horas, apresentaram oscilações em seus valores. Estes resultados podem ter ocorrido devido aos açúcares, nomeadamente a sacarose e a glicose, interferirem na análise exercendo um forte efeito sinérgico na formação de TBARS, superestimando dessa forma a extensão da oxidação.

## 3 CONCLUSÃO

Os tratamentos com RC de 30 % e com 1% de ficocianina, isoladamente, promoveram a manutenção da viabilidade celular, corroborando com a teoria do aumento da longevidade pelo uso de antioxidantes.

## REFERÊNCIAS

BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Radicais livres e o processo de envelhecimento. In: PORTELLA, M. R.; PASQUALOTTI, A.; GAGLIETTI, M. (Org.). Envelhecimento humano: saberes e fazeres. Passo Fundo: Ed. UPF, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407-408, 1990.

FARINATTI, P. T. V., Teorias biológicas do envelhecimento do genético ao estocástico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, v. 8, n. 4, p. 129-132, 2002.

LÖWRY, O. H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J., Protein measurement with the foline reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, p. 193-265, 1951.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N., Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova, São José do Rio Preto*, n. 4, v. 29, p. 755-760, 2006.

SILVA, L. A.; Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis*. UFPR, Curitiba, 2008.