

## Área: Ciência de Alimentos

# *Spirulina platensis* E A FICOCIANINA NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

**Camila Silveira, Ana Cláudia Vieira Salla, Bruna Seguenka, Marta Beatriz Santolin,  
Laís Oraide Manica, Renata Santin Ferreira, Telma Elita Bertolin\***

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

*\*E-mail: telma@upf.br*

## RESUMO

Recentes evidências sugerem que o uso de compostos antioxidantes, apresentam capacidades funcionais que podem proporcionar o prolongamento da vida (life span) pela atenuação do estresse oxidativo. O presente trabalho visou verificar o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e da ficocianina em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a estresse químico induzido pelo herbicida Paraquat. A cada 24 h realizaram-se as contagens de células viáveis e dosagem do dano oxidativo através do teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA). Os cultivos *Spirulina* e ficocianina mostraram-se favoráveis para a viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os valores de TBARS para os tratamentos *Spirulina* e com ficocianina no tempo de 72 h foram menores que os do tratamento controle.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, *Spirulina platensis*, levedura.

## 1 INTRODUÇÃO

Na atualidade a busca por substâncias naturais com potencial funcional aparecem com grande interesse, visto desde a perda de alimentos decorrentes de processos oxidativos até a incidência ou a causa de patologias e morte por câncer, Alzheimer, Parkinson, Diabetes, sarcopenia, doenças cardiovasculares, processos inflamatórios. Entre os antioxidantes naturais destaca-se a cianobactéria *Spirulina platensis* com diferentes propriedades funcionais, com ênfase, a antioxidante. Esta propriedade é caracterizada principalmente pelo seu pigmento ficocianina (HALLIWELL, 2000; ESTRADA, 2001).

Vários estudos têm sido realizados evidenciando os efeitos terapêuticos da *Spirulina*, que incluem sua utilização na redução da hipercolesterolemia (BERTOLIN et al., 2009; DENG e CHOW, 2010), na prevenção de certos tipos de cânceres, como antiinflamatório (SHIH et al., 2009; DENG e CHOW, 2010), e melhora do sistema imunológico (ESTRADA, BESCO, 2001; BERTOLIN et al., 2009), no life span de modelos experimentais como roedores (HARRISON et al.; 2009), leveduras (MORCELLI et al., 2010), moscas de frutas (KAPAHI et al., 2004), vermes (LEE et al., 2006) primatas (COLMANN, 2009). Estas investigações vêm sendo estudas no sentido de transpô-las para o homem.

Os processos oxidativos são decorrentes de agentes oxidantes endógenos e exógenos. O herbicida Paraquat é um agente oxidante atua bloqueando o fluxo de elétrons e impedindo a redução do NADPH causando a formação de radicais instáveis, reativos com a molécula de oxigênio (ERO). Por estes motivos caracteriza-se como um importante agente oxidante em experimentos para a avaliação de substâncias com atividade antioxidante (HENRIQUES, et al., 2001).

O mecanismo biológico responsável pela longevidade carece de informações, algumas hipóteses têm sido propostas, tais como: hipótese da redução da gordura corporal e sinalização da insulina, hipótese da redução da produção de espécie reativas de oxigênio e atenuação dos danos oxidativos (FONTANA et al., 2010; EVANS et al., 2010).

A avaliação da capacidade antioxidante empregando ensaios químicos é, em geral, de difícil execução, além de não considerado representativos das condições celulares do homem. Os ensaios microbianos, utilizando-se células eucarióticas, mostram-se muito adequados na determinação da capacidade antioxidante, constituindo-se em testes rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis (MORCELLI et al., 2010; RISTOW, ZARSE, 2010)

Desta forma, objetivou-se verificar o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e da ficocianina em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a estresse químico induzido pelo herbicida Paraquat.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1.1 Microrganismos e sua 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 *Spirulina platensis* e da ficocianina no cultivo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram: Tratamento Controle, Tratamento *Spirulina*, Tratamento Ficocianina, Tratamento Paraquat, Tratamento *Spirulina* acrescido de Paraquat e Tratamento Ficocianina acrescido de Paraquat.

#### 2.1.3 Preparo do inóculo e meio 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.

## 2.1.4 Determinações analíticas

### 2.1.4.1 Determinação de células viáveis

Para a contagem de células viáveis foi realizada pela técnica de plaqueamento. As placas foram incubadas por 48 h a 30°C e as colônias foram contadas em contador de colônias. 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>.

### 2.1.4.2 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. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão e foram analisados por ANOVA e Teste de Turkey, para comparação das médias.

A Tabela 1 mostra que o cultivo com Paraquat apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais tratamentos nos tempos de 0 h e 24 h. No tempo de 72 h observou-se que os cultivos *Spirulina* e ficocianina não apresentaram diferença significativa, bem como os tratamentos *Spirulina* acrescido de Paraquat e ficocianina acrescido de Paraquat. O cultivo com Paraquat, apresentou o maior declínio de células viáveis a partir do tempo de

48 h. Para os demais tempos, houve um comportamento semelhante nas respostas frente aos tratamentos. Os cultivos com *Spirulina* e ficocianina de forma isolada ou acrescido de Paraquat mostraram-se favoráveis a viabilidade celular em relação ao tratamento com Paraquat, demonstrando a possível ação antioxidante da *Spirulina* e da ficocianina, resultados semelhantes do aumento da viabilidade celular foram encontrados por BERTOLIN et al., 2010; utilizando o estressor Paraquat e a *Spirulina* como antioxidante.

Tabela 1 Resultados da Análise Estatística da contagem de células viáveis

Tempo (h)	Controle	<i>Spirulina</i>	Ficocianina	Paraquat	<i>Spirulina</i> + Paraquat	Ficocianina + Paraquat
0	5,44±0,10 <sup>b</sup>	5,53±0,01 <sup>b</sup>	5,56±0,00 <sup>b</sup>	4,87±0,00 <sup>a</sup>	5,50±0,00 <sup>b</sup>	5,52±0,13 <sup>b</sup>
24	6,63±0,00 <sup>d</sup>	6,55±0,00 <sup>d</sup>	6,59±0,00 <sup>d</sup>	6,04±0,08 <sup>c</sup>	6,57±0,00 <sup>d</sup>	6,48±0,08 <sup>d</sup>
48	7,55±0,00 <sup>n</sup>	7,53±0,00 <sup>m,n</sup>	7,53±0,00 <sup>m,n</sup>	7,29±0,05 <sup>i,j,l</sup>	7,39±0,02 <sup>j,l,m,n</sup>	7,38±0,04 <sup>i,j,l,m,n</sup>
72	7,25±0,02 <sup>ij</sup>	7,44±0,00 <sup>l,m,n</sup>	7,45±0,00 <sup>l,m,n</sup>	6,80±0,01 <sup>e</sup>	7,01±0,03 <sup>g,h</sup>	7,01±0,04 <sup>g,h</sup>
96	7,04±0,02 <sup>h</sup>	7,29±0,00 <sup>ij,l</sup>	7,28±0,02 <sup>ij</sup>	6,49±0,03 <sup>d</sup>	6,86±0,06 <sup>e,f,g</sup>	6,93±0,00 <sup>e,f,g,h</sup>
120	6,97±0,01 <sup>f,g,h</sup>	7,25±0,00 <sup>ij</sup>	7,22±0,00 <sup>i</sup>	6,18±0,02 <sup>c</sup>	6,80±0,02 <sup>e</sup>	6,81±0,00 <sup>e,f</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.

De acordo com MORCELLI et al., 2010; o uso de substâncias naturais como o resveratrol contribuem com o life span de leveduras mimetizando inclusive o efeito protetor da dieta sob restrição calórica. Os autores explicam estes eventos pela atenuação do estresse oxidativo mitocondrial e também e de forma mais enfática pela ativação da proteína SIR1, com aumento da relação  $NAD^+/NADH$ .

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos pela análise de TBARS.

Tabela 2 Valores de TBARS (nmol MDA/mg de proteína) para os diferentes tratamentos em função do tempo de cultivo da *Saccharomyces cerevisiae*

Tempo (h)	Controle	<i>Spirulina</i>	Ficocianina	Paraquat	<i>Spirulina</i> + Paraquat	Ficocianina + Paraquat
0	11,17± 0,04 <sup>m,n,o,p,q</sup>	11,08±0,17 <sup>n,o,p,q</sup>	12,09±0,18 <sup>p,q,r,s</sup>	14,90±0,04 <sup>t</sup>	13,05±0,01 <sup>s</sup>	14,43±0,03 <sup>t</sup>
24	11,73± 0,01 <sup>o,p,q,r,s</sup>	7,74±0,00 <sup>f,g</sup>	9,35±0,04 <sup>h,i,j,l</sup>	12,83±0,04 <sup>r,s</sup>	12,33±0,07 <sup>q,r,s</sup>	11,14±0,01 <sup>m,n,o,p,q</sup>
48	6,89± 0,02 <sup>d,e,f</sup>	5,09±0,01 <sup>a,b,c</sup>	5,69±0,04 <sup>b,c,d</sup>	10,10±0,07 <sup>i,l,m,n</sup>	10,15±0,03 <sup>i,l,m,n</sup>	8,63±0,01 <sup>g,h,i</sup>
72	6,36± 0,0 <sup>c,d,e</sup>	5,17±0,00 <sup>a,b,c</sup>	4,69±0,01 <sup>a,b</sup>	9,71±0,01 <sup>i,j,l,m</sup>	8,13±0,02 <sup>f,g,h</sup>	7,46±0,01 <sup>e,f,g</sup>
96	8,51± 0,03 <sup>g,h,i</sup>	5,42±0,05 <sup>b,c</sup>	4,08±0,01 <sup>a</sup>	11,23±0,00 <sup>m,n,o,p,q</sup>	10,50±0,03 <sup>l,m,n,o</sup>	9,09±0,00 <sup>h,i,j</sup>
120	11,62± 1,86 <sup>o,p,q,r</sup>	5,35±0,02 <sup>a,b,c</sup>	4,74±0,01 <sup>a,b</sup>	12,10±0,24 <sup>p,q,r,s</sup>	10,99±0,05 <sup>m,n,o,p</sup>	9,52±0,30 <sup>i,j,l</sup>

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

Atráves da Tabela 2 observa-se que o cultivo com Paraquat, agente estressor apresentou a maior formação de malonaldeído, sendo diferente de todos os demais com exceção do tratamento com ficocianina acrescido de Paraquat. No caso do tratamento com *Spirulina* acrescido de Paraquat houve uma redução na formação de malonaldeído, demonstrando que a *Spirulina* atenuou o efeito estressor do Paraquat. Para os demais tempos, houve um comportamento semelhante nas respostas frente aos tratamentos. O comportamento dos tratamentos controle, Paraquat e *Spirulina* acrescido de Paraquat foram semelhantes e não houve diferença estatística significativa. Os tratamentos com *Spirulina* e ficocianina apresentaram a menor formação de malonaldeído. O tratamento com ficocianina acrescido de Paraquat reduziu a formação de malonaldeído comparado com o cultivo Paraquat, demonstrando seu efeito protetor sobre o agente estressor. A atuação da *Spirulina* e ficocianina na manutenção dos parâmetros avaliados mostra uma atenuação dos radicais livres e dos danos gerados. Essa proteção reforça a teoria de que a longevidade (life span) de vários modelos experimentais, com ênfase a leveduras, pode ser entendido pelo uso de substâncias suplementares com característica antioxidante. (MORSELLI et al., 2010); (COLMAN et al., 2009); (RISTOW e ZARSE, 2010).

### 3 CONCLUSÃO

A *Spirulina platensis* e o seu pigmento ficocianina contribuem com o prolongamento da vida e diminuição da lipoperoxidação lipídica do modelo experimental *Sacharomyces cerevisiae*.

### REFERÊNCIAS

- BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; BAVARESCO, K.; GIACOMINI, A.C.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 52, p. 1253-1259, 2009.
- COLMAN, R. J. ANDERSON, R. M.; JOHNSON, S. C.; KASTMAN, E. K.; KOSMATKA, K. J.; BEASLEY, T. M.; ALLISON, D. B.; CRUZEN, C.; SIMMONS, H. A.; KEMNITZ, J. W.; WEINDRUCH, R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in Rhesus monkey. *Science*, v. 325, n. 10, 2009.
- DENG, R.; CHOW, T. J.; Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, v. 28, p. 33-45, 2010.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407-408, 1990.
- ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P; VILLAR D. F. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, v. 56, p. 497-500, 2001.
- EVANS, C., et al. NAD<sup>+</sup> metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity. *BMC Chemical Biology*, 10-2, 2010.
- FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. Extending Healthy Life Span - From Yeast to Humans. *Science*, v. 328, n. 16, abr., 2010.
- HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M., *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, 2000.
- HARRISON, D.E., R. STRONG, Z.D. SHARP, J.F. NELSON, C.M. ASTLE, K. FLURKEY, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, v. 460, p 392-395, 2009.

HENRIQUES, J. A. P.; DAFREÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M., Espécies Reativas de Oxigênio e Avaliação de Antioxidantes em Sistemas Biológicos. In: Artigo: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L., Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria, Agropecuária, Guaíba, v. 1, p. 227-252, 2001.

GUARIENTI, C.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor Paraquat. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 2010.

KAPAH, P., ZID, B.M., HARPER, T., KOSLOVER, D., SAPIN, V., BENZER, S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.*, p 885-890, 2004.

LEE JW, BEEBE K, NANGLE LA, JANG J, LONGO-GUESS CM, COOK SA, DAVISSON MT, SUNDBERG JP, SCHIMMEL P, ACKERMAN SL. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature*. V. ;443, p 50-59, 2006.

LIU, Y.; XU, L.; CHENG, N.; LIN, L.; ZHANG, C. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, p. 125–130, 2000.

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.

MORCELLI, E.; MAIURI, M. C.; MARKAKI, M.; MEGALOU, E.; PASPARAKI, A.; CRIOLLO, A.; GALLUZZI, L.; MALIK, S. A.; VITALE, I.; MICHAUD, M.; MADEOS, F.; TAVERMARAKIS, N.; KROEMER, G. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death and Disease*, 2010

RISS, J.; DÉCORDÉ, K.; SUTRA, T.; DELAGE, M. BACCOU, C.; JOUY, N.; BRUNELL, J.P; OREAL III, H.; CRISTOL, J. P.; ROUANET, J. M. Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress and NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 19, p. 7962–7967, 2007.

RISTOW, M.; ZARSE, K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology*, v. 45, p. 410–418, 2010.

SHIH, C. M.; CHENG, S. N.; WONG, C. S.; KUO, Y. L.; CHOU, T. C. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. *Anesthesia & Analgesia*, v. 108, p. 1303-1310, 2009.

SOARES, D.G., ANDREAZZA, A.C., SALVADOR M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. *Rev. Bras. Farm.*; 85: 45-7, 2004.