

Área: Ciência de Alimentos

**EFEITO PROTETOR DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DA
FICOCIANINA FRENTE AO Fe²⁺ NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE
Saccharomyces cerevisiae ANTES E APÓS O ENVELHECIMENTO
CRONOLÓGICO**

Marina Zanco Pezzini*, Darqui Thais Decosta, Fábيا Benetti, Telma Elita Bertolin

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia
e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

**E-mail: mah_pezzini@hotmail.com*

RESUMO - O processo de envelhecimento está associado não somente as alterações na atividade de células, tecidos e órgãos, como também, com a redução da eficácia de um conjunto de sistemas fisiológicos. O acúmulo progressivo destas alterações é associado com a crescente suscetibilidade a patologias que acompanham o avançar da idade. Danos oxidativo em biomoléculas, e o aumento de acumulação de ferro em áreas do cérebro têm sido evidenciados como possíveis causas de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, e a doença de Alzheimer. Segundo esta evidência terapias antioxidantes podem interferir neste processo, reduzindo o estresse oxidativo e os danos causados pelo acúmulo de ferro. A utilização de terapias antioxidantes vem recebendo destaque na atualidade, visto que estudos sugerem uma relação inversa entre o uso destas e a incidência de inúmeras doenças. A microalga *Spirulina platensis* destaca-se na literatura científica por apresentar propriedades funcionais, como antioxidante natural, verificada em modelos *in vivo* e *in vitro*. Outra terapia muito discutida atualmente é a restrição calórica (RC), que tem sido identificada como uma terapia antioxidante, e também com efeitos determinantes na longevidade mediada pela indução do gene *Silent Information Regulator 2* (*sir2*). Neste contexto, objetiva-se avaliar o potencial antioxidante do extrato de *Spirulina platensis* e RC em células de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ao estressor Fe²⁺. As células de levedura serão analisadas quanto à danos oxidativos pela oxidação de lipídeos.

Palavras – chave: Antioxidantes. Restrição Calórica. Envelhecimento. Leveduras.

1 INTRODUÇÃO

Após levantamento bibliográfico, verificou-se a inexistência de trabalhos que relacionam a utilização da terapia de restrição calórica associada ao extrato de *Spirulina platensis* com a finalidade de proporcionar

aumento da longevidade e redução dos danos oxidativo no modelo experimental *Saccharomyces cerevisiae* quando submetido ao estressor Fe^{2+} .

Os danos celulares podem ser provocados por espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio. Resultam também do ataque a macromoléculas que escapam à sua neutralização, ou quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes onde os primeiros sejam predominantes (VASCONCELOS et al., 2007). Estes efeitos têm sido associados ao envelhecimento e desenvolvimento de patologias (BARREIROS, 2007).

Metais de transição como o ferro, podem doar ou aceitar elétrons durante as reações intracelulares, catalisando a formação de radicais livres (RL) como na reação de fenton: H_2O_2 (ROS) + Fe^{2+} = Fe^{3+} + OH (RL) + OH. Desta forma o ferro por aumentar a produção de RL, pode levar a peroxidação lipídica, a danos no DNA e proteínas, bem como na eventual degeneração dos neurônios (D'OLIVEIRA, 2007). O ferro é essencial para o metabolismo neuronal normal, incluindo sua participação na geração de energia mitocondrial e mielinização. No entanto, os níveis excessivos de ferro cerebral podem levar ao estresse oxidativo e assim a neurodegeneração. Durante o processo de envelhecimento normal, várias regiões do cérebro tendem a acumular ferro. O aumento da deposição deste mineral tem sido observado em várias desordens neurológicas crônicas como na doença de Parkinson e Alzheimer.

Estudos evidenciam os efeitos terapêuticos da microalga *Spirulina platensis*, que incluem sua utilização como um antioxidante natural, bem como na redução da hipercolesterolemia, e prevenção de certos tipos de cânceres. Desta microalga, se extrai a ficobiliproteína ficocianina, que apresenta capacidade antioxidante, atuando no aumento da imunidade, induzindo a apoptose em células cancerígenas, como na leucemia (LU; LI, 2010).

Para Genaro, Sarkis e Martini (2009), o mecanismo biológico responsável pelo efeito da RC na longevidade carece de informações. Entretanto, outras intervenções foram propostas com a realização de estudos com leveduras, onde descobriu-se que o efeito determinante da longevidade poderia ser mediado pela indução de um gene chamado silent information regulator 2 (Sir2) que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (EVANS et al., 2010).

Este trabalho teve como contexto, verificar o efeito protetor da restrição calórica e do extrato de *Spirulina platensis* frente ao Fe^{2+} na peroxidação lipídica de *Saccharomyces cerevisiae*, nas cepas controle e deletada ao gene Sir2 Δ , antes e após o envelhecimento cronológico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir2 Δ* e controle foram obtidas da Euroscarf, Frankfurt, Germany. A avaliação do crescimento celular foi determinada em espectrofotômetro, através da medida da absorbância a 570 nm de uma suspensão de células convertida em concentração de células (mg de peso seco de células/mL).

A cianobactéria *Spirulina platensis* é proveniente do Laboratório de Engenharia Bioquímica do curso de Engenharia de Alimentos da FURG-RS. O extrato da *Spirulina platensis* foi obtido através do processo de congelamento e descongelamento. Estes processos aconteceram de forma sucessiva por três vezes. Após estas

amostras foram submetidas à centrifugação a 6000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi extraído, sendo este o extrato de *Spirulina platensis*.

Aproximadamente 30 mg de células foram coletadas e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Após a última lavagem, o centrifugado foi ressuspensão em 10 mL de água destilada estéril e transferido para um erlenmeyer de 50 mL. Este erlenmeyer foi, então, incubado a 37 °C em um agitador rotatório ajustado para 160 rpm pelo tempo necessário para a realização dos experimentos.

Inicialmente foram recolhidas por centrifugação cerca de 50 mg de células antes e após 1 e 24 h de exposição a 0,8 mg/mL de extrato de *Spirulina platensis*, bem como, expostas ao estressor Fe²⁺ 1mM. As células foram lavadas duas vezes com água destilada gelada, ressuspensas em 500 µL de TCA 10% (ácido tri-cloro acético) e transferidas para tubo de parede grossa. Foram adicionadas 1,5g de pérolas de vidro e as células rompidas sob agitação vigorosa com 6 ciclos de 20 s no vortex e 20 s no gelo.

O extrato foi recolhido em micro tubo e as pérolas de vidro lavadas com 500 µl de TCA 10%, sendo recolhidos no mesmo eppendorf. Após a lise os extratos foram centrifugados a 4000 rpm, sendo o sobrenadante coletado e utilizado para as análises de peroxidação lipídica através do método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O ensaio foi realizado conforme a Tabela 3.

Tabela 1: Composição das soluções para utilização na metodologia TBARS

	Branco	Amostra 1 (mL)	Amostra 2 (mL)
Água destilada	0,3	0,15	-
EDTA 0,1 M	0,1	0,1	0,1
Extrato	-	0,15	0,15
Ac. Tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05M	0,6	0,6	0,6
Volume total	1	1	1

A mistura reacional foi incubada a 100°C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorbância medida espectrofotometricamente a 532nm.

A dosagem foi determinada através da Equação 3, de acordo com Steels, Learmonth e Watson (1994). Sendo fator para obtenção da concentração de malonaldeído determinado a partir de uma curva analítica com padrão TMP (1,1-3,3-tetrametoxipropano).

$$MDA = \frac{(Abs\ 532 \times f') \times 1000}{(Abs\ 570 \times f \times 100) \times 4,9 \times 0,15} \quad (3)$$

Onde:

MDA = concentração de malonaldeído (pmolesMDA/mg de células peso seco);

Abs 532 = absorbância medida sob comprimento de onda de 532 nm;

Abs 570 = absorbância medida sob comprimento de onda de 570 nm;

f^* = fator obtido a partir da curva analítica com o padrão TMP

f = fator obtido a partir da curva de peso seco da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

100 = diluição realizada para medir a absorvância

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

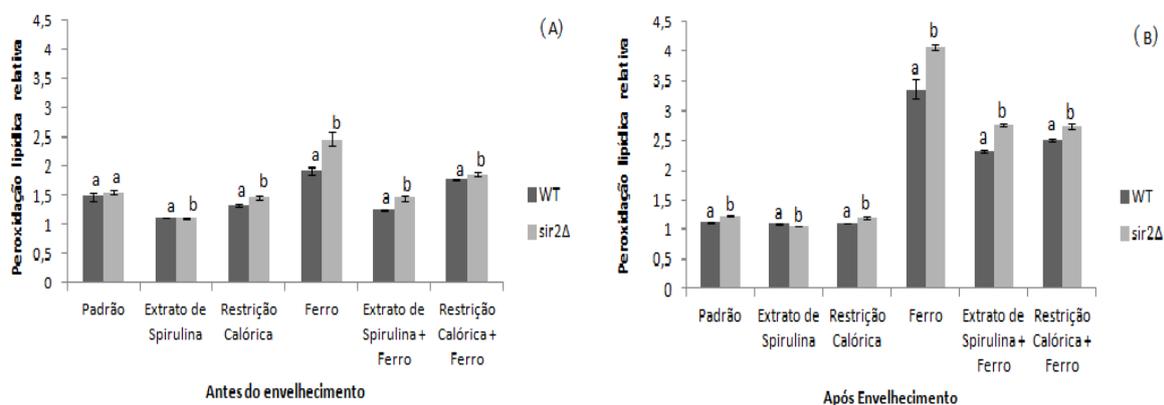


Figura 1: Valores médios de peroxidação lipídica (pmoles MDA/mg de cel.) para os diferentes tratamentos na *Saccharomyces cerevisiae*

Células de *S. cerevisiae* (WT e *sir2Δ*) quando expostas ao Fe apresentaram aumento da lipoperoxidação lipídica. Danos oxidativos da peroxidação lipídica vêm sendo descritos como uma das causas à toxicidade induzida pelo ferro (DURFINOVÁ, et al., 2012). Dal-Pizzol et al. (2001) observaram que a exposição de ratos a doses elevadas de ferro aumenta as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Cepas *si2Δ* apresentaram maior peroxidação lipídica quando comparadas com as cepas WT nos dois tempos estudados. Fabrizio e Longo (2005) constataram que as proteínas SIR2 podem regular a produção de espécies reativas de oxigênio e o envelhecimento celular. Efeitos benéficos das terapias (RC e ESP) frente ao Fe^{2+} nas cepas estudadas. Extrato de *S. platensis* foi superior a RC no combate a lipoperoxidação. Bermejo; Pinero e Villar (2008) e Estrada, Bésco e Fresno (2001) demonstram que a *S. platensis* é um potente eliminador de RL, tendo a capacidade de inibição da peroxidação lipídica.

4 CONCLUSÃO

As células de *Saccharomyces cerevisiae* quando expostas ao íon ferroso apresentam aumento da peroxidação lipídica. As terapias de RC e Extrato de *Spirulina platensis* quando aplicadas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (WT e *sir2Δ*), atenuaram a ação do íon ferroso, diminuindo a peroxidação lipídica.

6 REFERÊNCIAS

- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- D'OLIVEIRA, F. A.; FRANK, A. A.; SOARES, E. A. **A Influencia dos minerais na doença de Parkinson.** Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. São Paulo, SP, v. 32, n. 1, p. 77-88, abr. 2007.
- EVANS, C. et al. **NAD⁺ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity.** Chemical Biology, v. 10, n. 2, 2010.
- LU, W; YU, P.; LI, J. **Induction of apoptosis in human colon carcinoma COLO 205 cells by the recombinant a subunit of C-phycoyanin.** Biotechnol Letters, p. 2-8, 2010.
- LIU, Y. et al. **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.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.