

Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* frente à *Spirulina platensis*

Cíntia Guarienti*, Gabriela Sara Viganó**, Francieli Pasini Fachini***, Francieli Ubirajara India Amaral****, Luciane Maria Colla*****, Jorge Alberto Vieira Costa*****, Telma Elita Bertolin*****

Resumo

O estresse oxidativo promove alterações intracelulares que geram danos ao organismo levando ao desenvolvimento de diversas patologias, sendo que algumas fontes geradoras de radicais livres estão presentes na nossa dieta e também em medicamentos. Os compostos antioxidantes são utilizados como mecanismos de defesa contra os radicais livres e podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e farmacêutica. A *Spirulina platensis* é uma microalga que possui pigmentos (ficocianina e carotenóides) e vitaminas (ácido ascórbico e tocoferol) responsáveis pela suas propriedades nutricionais e terapêuticas. Objetivou-se avaliar a atividade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* frente ao paracetamol, glutamato monossódico e paraquat utilizando como

sistema biológico células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O potencial antioxidante foi avaliado através do método da sobrevivência celular. A *Spirulina platensis* mostrou-se capaz de elevar de forma significativa a sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando comparado aos tratamentos que receberam somente os agentes estressores. A microalga protegeu as células contra os danos causados pelo paracetamol, monoglutamato de sódio e paraquat, mostrando-se assim como uma fonte alternativa para uso como suplemento nutricional rico em antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidantes. Estresse oxidativo. Envelhecimento.

* Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande.

** Acadêmica do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo.

*** Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo.

**** Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de Passo Fundo. Pós-graduanda em Farmacologia e Interações Medicamentosas pelo Centro Universitário Internacional Uninter.

***** Doutora em Ciência e Engenharia de Alimentos pela Fundação Universidade de Rio Grande. Professora do Curso de Engenharia de Alimentos pela Universidade de Passo Fundo.

***** Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Professor da Universidade Federal do Rio Grande. Bolsista produtividade em pesquisa CNPq.

***** Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo. Professora do Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo. Endereço para correspondência: Telma Elita Bertolin, Prédio L1, Campus I, km 171, BR 285, Bairro São José, CEP 99052-900, Passo Fundo-RS, E-mail: Telma@upf.br

Artigo publicado na forma de resumo no I Congresso Internacional de Envelhecimento Humano (2010) e que foi selecionado para ser publicado neste suplemento da RBCEH como artigo completo.

↳ doi:10.5335/rbceh.2010.056

Introdução

Uma pequena quantidade de radicais livres é necessária para a manutenção da vida, mas a sua produção excessiva, maior do que a sua velocidade de remoção, pode conduzir a diversas formas de danos celulares (SHAMI; MOREIRA, 2004). Este excesso de radicais livres pode estar envolvido na origem e no desenvolvimento de várias doenças como câncer, aterosclerose, catarata, doenças neurodegenerativas como Alzheimer, diabetes, inflamações crônicas, artrite reumatóide e situações de injúria por isquemia e da doença intestinal inflamatória (DRÖGE, 2002).

O organismo humano sofre ação constante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes de fontes externas, como alimentos e medicamentos (BARREIROS; DAVID, 2006). Entre os diversos agentes oxidantes exógenos existentes, encontram-se o paracetamol (SALVADOR; HENRIQUES, 2004), o monoglutamato de sódio (FAROMBI; ONYEMA, 2006; DINIZ et al., 2005) e o paraquat (SOARES et al., 2004). A toxicidade de tais substâncias está relacionada com a capacidade de induzir estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da produção de radicais livres. Para proteção contra essas espécies os organismos dispõem de mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta diminuem a ação tóxica das espécies reativas produzidas (YU, 1994). Os antioxidantes possuem larga aplicação em alimentos,

cosméticos e medicamentos (SOARES et al., 2004), entre os mais conhecidos estão as vitaminas, os polifenóis, os compostos de baixo peso molecular, dentre outros (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

A microalga *Spirulina platensis* é um produto natural que possui constituintes com propriedades nutricionais, dentre os quais se incluem proteínas, vitaminas do complexo B, minerais, proteínas de alta qualidade, antioxidantes β -caroteno e tocoferol. A *Spirulina* tem merecido atenção especial pela sua habilidade em combater vírus, câncer, desnutrição, hipercolesterolemia e outros, além de proporcionar melhorias na saúde como um todo, o que destaca sua utilização como nutracêutico e desperta o interesse no seu emprego como uma fonte farmacêutica em potencial (AMBROSI et al., 2008; BELAY, 2002).

A avaliação da capacidade antioxidante de um composto pode ser realizada através da medida da sobrevivência de micror-organismos tratados com o antioxidante e agentes estressores. Os testes realizados nestes tipos de sistemas são rápidos e permitem a utilização de um grande número de células com as mesmas características genéticas. Por estas razões a levedura *Saccharomyces cerevisiae* torna-se um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo (SOARES; et al., 2005).

Objetivou-se avaliar a influência da microalga *Spirulina platensis* na viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente aos danos induzidos pelo paracetamol, pelo glutamato monossódico e pelo paraquat.

Metodologia

Antioxidante

Foi analisado como composto antioxidante a microalga *Spirulina platensis*, proveniente do Laboratório de Engenharia Bioquímica do curso de Engenharia de Alimentos da Fundação Universidade de Rio Grande. A concentração utilizada nos ensaios foi de 0,025 mM, maior concentração não citotóxica de antioxidante para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SOARES et al., 2005).

Agentes estressores

Como agentes estressores foram utilizados, o paracetamol (comercial 750 mg), o glutamato monossódico monohidratado (Synth) e o herbicida paraquat comercial - 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio, nas concentrações de 5 mM, 25 mM e 15 mM, respectivamente.

Tratamentos

Os experimentos foram realizados com 2×10^6 células/mL de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em sete tratamentos diferentes, demonstrados na Tabela 1. Após a adição do antioxidante e dos agentes estressores, procedeu-se a incubação por 21 h a temperatura de 28 °C pra posterior análise.

Tabela 1 - Grupos experimentais e os respectivos tratamentos a que foram submetidos.

Grupos experimentais	Tratamentos
Controle	Sem agente estressor e antioxidante
Paracetamol	Adição de paracetamol
Glutamato monossódico	Adição de glutamato monossódico
Paraquat	Adição do herbicida paraquat
Paracetamol + <i>Spirulina platensis</i>	Adição de paracetamol e <i>Spirulina platensis</i>
Glutamato + <i>Spirulina platensis</i>	Adição de glutamato monossódico e <i>Spirulina platensis</i>
Paraquat + <i>Spirulina platensis</i>	Adição do herbicida paraquat e <i>Spirulina platensis</i>

Determinação da capacidade antioxidante

Sobrevivência celular

Para a determinação da viabilidade celular, as células foram diluídas e semeadas em placas de Petri contendo meio GYMP (2% de glicose, 1% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 0,02% de fosfato de sódio monobásico e 2% de Agar) e incubados por 48 horas a 30°C. Após este período procedeu-se a

contagem das colônias em cada placa e foram determinados os percentuais de sobrevivência celular.

O cálculo do aumento do percentual de sobrevivência celular foi realizado subtraindo-se os valores obtidos nos ensaios com a *Spirulina platensis* adicionada dos estressores glutamato monossódico, paracetamol e paraquat daqueles obtidos com os tratamentos nos quais foram adicionados os agentes estressores de maneira isolada.

Estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico através da análise de variância e pós-teste de Tukey para comparação de médias em nível de significância de 5%.

Resultados e Discussões

A análise dos resultados da influência da microalga na viabilidade celular da levedura foi realizada através de um

comparativo da sobrevivência da *Saccharomyces cerevisiae* tratada com paracetamol, com glutamato monossódico e com paraquat. Estes agentes estressores foram adicionados da *Spirulina platensis*, conforme apresentado na Tabela 2. A contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do tratamento controle representa 100% de sobrevivência, uma vez que não teve influência dos agentes estressores e do antioxidante.

Tabela 2 - Sobrevivência celular da *Saccharomyces cerevisiae* para os diferentes tratamentos.

Tratamento	Sobrevivência celular (%) ± DP
Controle	100 ± 0,00 ^a
Paracetamol	71,9 ± 0,60 ^c
Glutamato Monossódico	73,2 ± 6,09 ^c
Paraquat	16,65 ± 3,32 ^e
Paracetamol + <i>Spirulina platensis</i>	93,1 ± 3,65 ^{ab}
Glutamato Monossódico + <i>Spirulina platensis</i>	96,1 ± 5,48 ^{ab}
Paraquat + <i>Spirulina platensis</i>	51,60 ± 0,42 ^d

* Letras diferentes indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

A análise de variância dos resultados referentes à Tabela 1 demonstrou diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Os grupos tratados com os agentes estressores de forma isolada apresentaram níveis de sobrevivência celular estatisticamente inferior ao controle, indicando morte celular e o efeito citotóxico destas substâncias sobre as células de levedura. O paracetamol e o monoglutamato de sódio, nas concentrações testadas, mostraram comportamentos semelhantes quanto à redução da viabilidade, produzindo resultados estatisticamente iguais e

percentuais de morte celular de 28,1% e 26,8%, respectivamente. O paracetamol na atualidade é o analgésico mais vendido no país e o glutamato monossódico é extensivamente utilizado como realçador de sabor pela indústria de alimentos (OLIVEIRA et al., 2009; DINIZ et al., 2005; TAYLOR-BURDS et al., 2004). Os efeitos provocados por estas substâncias devem ser considerados quando se avalia o consumo a longo prazo, por serem muito utilizadas pela população e pelo comportamento apresentado, provocando danos às células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O paraquat, na concentração de 15 mM, produziu um percentual de morte celular de 83,3%, resultado significativamente maior em relação aos demais agentes testados, que demonstra os grandes danos gerados por este herbicida, sendo que sua presença em forma de resíduos em alimentos pode tornar-se um sério problema de saúde pública (LARA; BATISTA, 1992).

Quando a atividade da microalga *Spirulina* é analisada, observa-se o aumento da viabilidade dos tratamentos, como pode ser visualizado na Figura 1, que apresenta os resultados do aumento de sobrevivência celular.

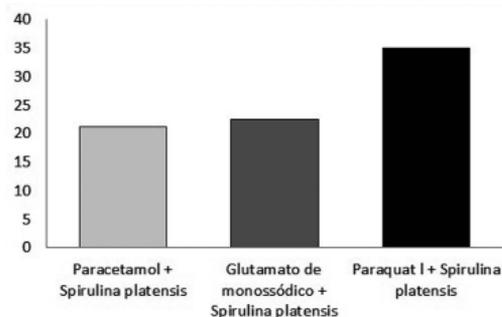


Figura 1 - Aumento da sobrevivência celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetida à *Spirulina platensis* em presença dos agentes estressores.

A adição de *Spirulina platensis* elevou a viabilidade celular em relação aos tratamentos com paracetamol, glutamato monossódico e paraquat, mostrando aumento 21,2%, 22,9% e 34,9%, respectivamente e nos dois primeiros, chegando a valores estatísticos iguais ao tratamento controle. O antioxidante em questão foi capaz de proteger as células contra os

danos gerados pelos três agentes estressores, porém, sua atividade foi mais pronunciada quando se utilizou o paraquat como fonte produtora de radicais livres. Este aumento na sobrevivência celular está relacionado a um efeito antioxidante da microalga sobre as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois segundo Ambrosi et al. (2008), Bertolin et al. (2009), Colla e colaboradores (2007) e Miranda e colaboradores (1998), os extratos de *Spirulina platensis* apresentam atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, sendo esta atividade antioxidante atribuída a presença de β -caroteno, tocoferol e composto fenólicos que agem individualmente ou em sinergia. Além disso, a *Spirulina platensis* possui a ficocianina que é um pigmento ao qual têm sido atribuídos efeitos hepatoprotetores, anti-inflamatórios e antioxidantes. (SILVA et al., 2009)

A utilização de *Spirulina platensis* como fonte alimentar tem sido bastante discutida, pois além de ser fonte de proteína, minerais e vitaminas, não apresenta toxicidade ao organismo (ROGATTO et al., 2004). Esta microalga possui um grande potencial farmacológico e entre as aplicações clínicas desta espécie, têm sido citados efeitos na estimulação do sistema imunológico, ação antioxidante, antitumoral, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertensão, efeitos tóxicos de radiações, obesidade e diabetes, sendo atribuído à *Spirulina platensis* um conjunto de propriedades que raramente são encontradas em um único produto natural (BERTOLIN et al., 2009; BELAY, 2002; ROGATTO et al., 2004; COLLA et al., 2007; AMBROSI et al., 2008; COLLA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Conclusão

A *Spirulina platensis* promoveu um aumento da sobrevivência celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente aos estressores paracetamol, glutamato monossódico e paraquat de 21,2%, 22,9% e 34,9% respectivamente, demonstrando capacidade de atenuação do estresse oxidativo.

Estes resultados podem ser inferidos para o homem já que é um experimento *in vivo*, tornando a *Spirulina platensis* uma opção de suplemento nutricional rico em antioxidantes.

Viability of *Saccharomyces cerevisiae* front *Spirulina platensis*

Abstract

Oxidative stress promotes intracellular changes that cause damage to the body leading to the development of various pathologies, and some sources of free radicals are present in our diet and also in medicines. The antioxidant compounds are used as defense mechanisms against free radicals and can be used in the food, cosmetics, beverages and pharmaceuticals industries. *Spirulina platensis* is a microalgae that has pigments (phycocyanin and carotenoids) and vitamins (ascorbic acid and tocopherol) responsible for its nutritional and therapeutic properties. In view of this, aimed at evaluating the antioxidant activity of *Spirulina platensis* front to damage caused by paracetamol, monosodium glutamate and by paraquat using as biological system cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The antioxidant potential was evaluated using the method of cell survival. The results showed that the stress agents provoked high percentage of cell death. *Spirulina platensis* was able to raise significantly the survival of the yeast

Saccharomyces cerevisiae when compared to treatments that received only the stress agents. The microalgae showed antioxidant capacity, protecting cells against damage caused by paracetamol, sodium monoglutamate and paraquat, proving to be as an alternative source for use as a nutritional supplement rich in antioxidant.

Keywords: Antioxidants. Oxidative stress. Aging.

Referências

- AMBROSI, M. A, et al. Propriedades de saúde de *Spirulina spp.* *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, p. 115-123, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, v.29, p. 113-123, 2006.
- BELAY, A. The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutritional Association*, v. 5, p. 27-48, 2002.
- BERTOLIN, T. E. et al. 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.
- COLLA, L, M; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, p. 161-167, 2007.
- COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n. 2, p. 405-411, 2008.

DINIZ, Y. S. et al. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*; v. 21, p. 749-755, 2005.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*. v. 82, p. 47-95, 2002.

FAROMBI, E. O.; ONYEMA, O. O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum. Exp. Toxicol.* v. 25, p. 251-259, 2006.

LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. *Química Nova*. v. 15, p. 161-165, 1992.

MIRANDA, M. S. et al. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina máxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 8, p. 1075-1079, 1998.

OLIVEIRA, G. G. et al. Determinação de paracetamol pela inibição da reação quimioluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação. *Química Nova*, v. 32, n. 7, p. 1755-1759, 2009.

ROGATTO, G. P. et al. Influência da ingestão de *Espirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. *Rev. Bras. Med. Esporte*, Niterói, v. 10, n. 4, p. 258-263, 2004.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SILVA L. A. et al. Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina platensis*. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 1, 2009.

SOARES, D. G; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. A. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 85, n. 2, p. 45-47, 2004.

SOARES, D. G; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 97-100, 2005.

TAYLOR-BURDS, C. C. et al. Behavioral comparisons of the tastes of L-alanine and monosodium glutamate in rats. *Chemical Senses*, v. 29, n. 9, p. 807-814, 2004.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* v. 74, p. 139-161, 1994.