

DOSAGEM DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELO MÉTODO DE TBARS NA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* MUTANTES AO GENE *Sir* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM FICOCIANINA

C. SILVEIRA¹, F. BENETTI², B. SEGUENKA², G. NICOLETTI¹, W. F. MARTINS¹, A. C. V. SALLA², F. N. MELO³ e T. E. BERTOLIN²

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia, Curso de Engenharia de Alimentos

³ Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia
E-mail para contato: cam_silveira@hotmail.com

RESUMO – O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre (RL) com ácidos graxos insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas. Estudos com antioxidantes têm evidenciado benefícios destes na peroxidação lipídica. Em vista disso, objetivou-se verificar o efeito protetor da ficocianina na lipoperoxidação na levedura *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene *Sir*. As cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas foram controle e deletadas aos genes *Sir*. As células foram crescidas em meio YPD 2 %. As cepas foram submetidas a 24 h de envelhecimento e coletadas para avaliação dos níveis de lipoperoxidação nos tempos 0 h e 24 h. A análise da lipoperoxidação foi realizada pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O tratamento com ficocianina atenuou a lipoperoxidação em todas as cepas, com destaque para cepa deletada ao gene *Sir 3*, corroborando para uma possível ação protetora da ficocianina.

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo é a oxidação da camada lipídica da membrana celular, a lipoperoxidação (LPO). Este processo provoca alterações estruturais e funcionais da membrana, como principalmente a sua perda de integridade, permeabilidade e fluidez, podendo levar à morte celular (Sampaio e Moraes, 2010).

Os lipídios quando oxidados possuem alta capacidade de gerar RL, uma vez que a peroxidação lipídica é a reação do oxigênio molecular com lipídios insaturados. Esta reação de oxidação ocorre devido a fatores ambientais ou pela ação enzimática - pela catalisação de enzimas lipoxigenases ou pelos RL formados nos processos metabólicos (Araújo, 2004).

A partir disso, ocorrem alterações nas membranas celulares, alterando a permeabilidade, resultando na perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (Lehninger; Nelson e Cox, 2002). A lipoperoxidação também pode estar associada aos

mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Ferreira e Matsubara, 1997).

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica são parâmetros importantes para o monitoramento do dano causado por ERO em lipídeos (Vasconcelos et al., 2007). Esses são instáveis e se degradam em vários produtos secundários como o MDA. Os níveis de MDA são largamente utilizados como marcadores da peroxidação lipídica nos estados de estresse oxidativo (Yildirim et al., 2007)

O processo de reparo das lesões está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Os estudos com antioxidantes têm evidenciado benefícios no uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças relacionadas ao envelhecimento. Estes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células dificultando o ataque das espécies reativas sobre os lipídeos. No entanto, o efeito deletério do deste processo varia de um organismo para outro, de acordo com a idade, estado fisiológico e a dieta (Bertolin et al., 2009).

Na atualidade, o interesse pelo desenvolvimento de terapias antienvelhecimento vem crescendo exponencialmente, contudo muitas contribuições nessa linha de pesquisa ainda se fazem necessárias. Percebe-se a partir de estudos já existentes, que a dieta sob-restrição calórica contribui com a longevidade, em razão da menor geração de EROs. A dieta sob RC tem sido relatada por diversos autores, contribuindo com a diminuição do processo do envelhecimento. O uso de compostos naturais e suplementos alimentares também têm sido alvo de muitos estudos com relatos de que estes agem de forma benéfica em muitos sistemas biológicos (Bescos et al., 2008).

A ficocianina é principal pigmento da cianobactéria *Spirulina platensis*. O interesse em recursos biológicos, em especial as algas, como fontes de substâncias antioxidantes vem crescendo de maneira significativa. Os estudos mostram que as algas como peptídeos de polissacarídeos e ficobiliproteínas podem afetar a multiplicação de tumores (Liu et al., 2000).

Ambrosi et al. (2011) mostraram que a microalga pode ser utilizada como alimento pelo homem devido a sua composição química, que apresenta elevada quantidade e quantidade de aminoácidos essenciais, minerais, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas. Possui grande quantidade de compostos fenólicos, tocoferol e pigmentos como carotenóides, ficocianina e clorofila (Ambrosi et al., 2011).

A cianobactéria apresenta características que sugerem aplicações clínicas, conferindo efeitos terapêuticos em pacientes acometidos de diversas patologias. Estudos clínicos e epidemiológicos estabeleceram uma relação inversa entre a ingestão de compostos antioxidantes e a incidência de doenças crônicas degenerativas, epidemiológicas, como as cardiovasculares além de apresentar-se como estimulante ao sistema imunológico (Andrews et al., 2010).

Os compostos extraídos de microalgas como a *Spirulina platensis* são reconhecidos mundialmente devido ao seu uso na alimentação humana e como alimentos funcional e nutracêutico (Bertolin et al., 2009).

As sirtuínas compreendem um grupo de proteínas desacetilizadoras dependentes da coenzima NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), envolvidas no controle do metabolismo energético e associadas à longevidade. Além das histonas, um crescente número de proteínas tem sido identificado como alvo das sirtuínas, entre eles estão proteínas estruturais e diversos fatores de transcrição (Gallinari, et al. 2007).

Enquanto cada sirtuína é um produto de um gene específico, a expressão destes genes e a atividade das enzimas nos tecidos são fortemente afetadas por mudanças no ambiente como dieta e estilo de vida. Alguns fatores reportados por influenciarem na expressão destes genes incluem: RC, exercício, álcool, fumo, exposição ao frio, estresse oxidativo, administração de compostos como resveratrol, quercetina e melatonina (Gallinari, et al. 2007).

Com o exposto acima, objetivou-se verificar o efeito protetor da ficocianina na lipoperoxidação na levedura *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene *Sir*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Antioxidante

O composto antioxidante analisado foi a ficocianina (FC) principal pigmento da microalga *Spirulina platensis*.

2.2 Modelo experimental

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir 1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ* e *sir4Δ* e controle foram obtidas da Euroscarf, Frankfurt, Germany. O Quadro 1 apresenta as linhagens que serão utilizadas nos experimentos.

As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram mantidas em meio YPD sob refrigeração a 4 °C, como apresentado no Quadro 1. A manutenção dos micro-organismos foi realizada através de repiques periódicos em meio YPD. No caso das cepas mutantes *sir 1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ* e *sir4Δ*, o meio de cultura será acrescido de 0,02 % de geneticina. As culturas serão mantidas a 4° C em ágar inclinado (cultura estoque).

2.3 Condições de cultivo

As células, retiradas de um repique fresco em meio sólido YPD 2 %, foram cultivadas em erlenmeyers, contendo 20 % do seu volume preenchido por meio YPD 2 %. Após a realização do inóculo, as culturas foram incubadas a 28 °C em agitador orbital ajustado para 160 rpm até a primeira fase exponencial de crescimento (entre 0,5 e 0,9 mg de peso seco de células/mL). Nesta fase, as células crescidas em YPD 2 % apresentam um metabolismo fermentativo, utilizando a glicose presente no meio como única fonte de carbono e não dependendo do oxigênio como aceptor final dos elétrons.

2.4 Oxidação de lipídios pelo método de TBARS

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 ficocianina. 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 centrifugação 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 1.

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 de acordo com Steels, Learmonth e Watson (1994).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oxidação de lipídeos foi verificada através do método TBARS, obtida antes e após o envelhecimento de 24 h. A Tabela 2 apresenta a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

Tabela 2 - Valores médios de peroxidação lipídica (pmoles MDA/mg de cel.) para os diferentes tratamentos na *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamentos	2% glicose	
	0h	24h
Controle	167,24 \pm 40,08	314,56 \pm 56,46
Controle + FC*		196,72 \pm 11,49
<i>sir1</i>	255,66 \pm 41,06	377,54 \pm 209,15
<i>sir1</i> + FC*		338,16 \pm 122,13
<i>sir2</i>	197,46 \pm 66,48	483,90 \pm 114,8
<i>sir2</i> + FC*		354,65 \pm 40,56
<i>sir3</i>	137,61 \pm 51,55	551,12 \pm 111,25
<i>sir3</i> + FC*		390,22 \pm 202,47
<i>sir4</i>	178,36 \pm 95,24	388,11 \pm 287,03
<i>sir4</i> + FC*		253,81 \pm 40,23

*cepas submetidas a 1h de cultivo em presença da ficocianina.

Com o intuito de verificar o aumento de peroxidação lipídica devido ao processo de envelhecimento cronológico, os resultados foram expressos como a razão entre o nível de peroxidação lipídica após 24 h de envelhecimento e antes do envelhecimento (0 h) em todas as cepas.

Podemos perceber que as cepas deletadas aos genes *sir* (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*), apresentaram maiores parâmetros de peroxidação lipídica quando comparadas à cepa controle, com exceção da cepa deletada ao gene *sir1*, que mostrou parâmetros de peroxidação lipídica inferiores em relação à cepa controle.

Quando tratadas com ficocianina (P + FC), todas as cepas apresentaram maiores valores de peroxidação lipídica em relação à cepa controle, com destaque para a cepa deletada ao gene *sir3*. Este resultado não apresentou diferenças significativas. Comparando cada cepa de forma individual, nossos resultados mostraram que, quando submetidas ao tratamento com ficocianina, as cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* deletadas aos genes *sir* (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*) e controle, apresentaram níveis de peroxidação lipídica inferiores, em relação às cepas ausentes de ficocianina.

Romay, Ramirez e González (2001), investigaram a atividade antioxidante da ficocianina frente à peroxidação lipídica microsomal, utilizando microsomas de fígado de ratas. No estudo foi observado que a ficocianina mostrou ser mais entre 6 e 7 vezes mais eficiente que outros dois antioxidantes (ácido ascórbico e trolox). Ao final do estudo, os autores consideraram que a ficocianina reúne os requisitos para transformar-se em um candidato a fármaco.

O estudo de Bescos et al., (2008), realizado em neuroblastomas humanos, demonstra que a ficocianina é um potente eliminador de radicais hidroxila e peróxidos, tendo a capacidade de inibição da peroxidação lipídica.

Os resultados da pesquisa de Khan et al. (2005) sugeriram a prevenção do aumento do MDA no tecido cardíaco em camundongos tratados com *Spirulina*, quando a cardiotoxicidade era induzida pela Doxorubicina, um fármaco amplamente utilizado no tratamento de cânceres. Ainda, os níveis séricos de MDA foram reduzidos em ratos jovens tratados com *Spirulina* no estudo de Sharma, Sharma, Sharma (2005). Outros autores verificaram que indivíduos jovens que receberam *Spirulina* diminuíram a peroxidação lipídica em análise sanguínea (Lu et al, 2006).

4. CONCLUSÃO

O uso da terapia com ficocianina mostrou benefício na peroxidação lipídica analisada no modelo levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

5. REFERÊNCIAS

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V., COLLA, L. M. Propriedades de saúde da *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 2, 2008.

ANDREWS, S. R., SAHU, N. P., AK, P., MUKHERJEE, S. C., KUMAR, S. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. *Research in Veterinary Science*, v. 91, n. 1, p. 103-109, 2011.

ARAÚJO, J. M. A. *Química de alimentos: teoria e prática*. 3ª ed. Viçosa: UFV, 2004.

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.

BESCÓS, P. B., ESTRADA, E. P., FRESNO, A. M. V. NEUROPROTECTION BY SPIRULINA PLATENSIS PROTEAN EXTRACT AND PHYCOCYANIN AGAINST IRON-INDUCED TOXICITY IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS. *TOXICOLOGY IN VITRO*, V. 22, N. 6, P. 1496-1502, 2008.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S., Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GALLINARI P., DI MARCO S., JONES P., PALLAORO M., STEINKÜHLER C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res*, v. 17, p. 195–211, 2007.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

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.

LU, H. K., HSIEH C. C., HSU J. J., YANG Y. K., CHOU H. N. Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress. *European Journal of Applied Physiology*, v. 98, n. 2, p. 220-226, 2006.

ROMAY, L. C.; REMIREZ, D; GONZÁLEZ, R. L. Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v. 20, n.1, p. 38-41, 2001.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. *Motriz*, v. 16, n. 2, p. 506- 515, 2010.

SHARMA, S., SHARMA, S., SHARMA, K. P. Protective role of *Spirulina* feed in a freshwater fish (*Poecilia reticulata* Peters) exposed to an azo dye-methyl red. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 43, n. 12, p. 1165-1169, 2005.

STEELS, E. L., LEARMONTH, R. P., WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid insaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*. 140:569-76, 1994.

VASCONCELOS, S., M., L., GOULART, M., O. F., MOURA, J. B. F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. S., KUBOTA, L. T. 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.

YILDIRIM, A., KOTAN, D., YILDIRIN, S., AYGUL, R., AKÇAY, F. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant response in serum and cerebrospinal fluid in acute ischemic stroke. *Turkey Journal Medicine Science*. v. 37, n. 2, 2007.