

Linhagens mutantes de levedura para o estudo de substâncias antioxidantes

Mutant yeast strains for the study of antioxidant substances

RESUMO

Letícia Scussel Farias

leticiafarias@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Cleverson Busso

cleversonbusso@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Mario Henrique de Barros

mariohb@usp.br

Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

O excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no organismo é responsável por desencadear o estresse oxidativo, uma disfunção celular associada a problemas de envelhecimento precoce, tumores, Parkinson e Alzheimer quando torna-se crônico. A ação de EROs pode ser evitada por substâncias antioxidantes, compostos não tóxicos capazes de inibir a ação de agentes oxidantes presentes na célula. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é reconhecida como excelente modelo de estudo de distúrbios genéticos e bioquímicos. Sendo assim, o presente estudo objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante do ácido ascórbico (vit C), tocoferol (vit E) e extratos aquosos de *Gingko biloba* e *Camellia sinensis* observando a resposta das substâncias submetidas a indução de estresse oxidativo utilizando-se Menadione (vit K3) como indutor e a linhagem mutante *S. cerevisiae* com deleção do gene *GTT1* como modelo *in vivo*. Diante dos ensaios evidencia-se que linhagens mutantes são um excelente modelo de estudo *in vivo* revelando o tocoferol como um ótimo antioxidante e reforçando diferentes mecanismos de permeabilidade e transporte celular diante diferentes propriedades físico-químicas.

PALAVRAS-CHAVE: Tocoferol. Ácido Ascórbico. Extratos aquosos. Estresse oxidativo. Menadione.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The excess of Reactive Oxygen Species (ROS) is responsible for triggering oxidative stress, a cellular dysfunction associated with problems of premature aging, tumors, Parkinson's and Alzheimer's when it becomes chronic. Antioxidant substances, non-toxic compounds capable of inhibiting the action of oxidizing agents, can prevent the action of ROS. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is recognized as an excellent model for studying genetic and biochemical disorders. Therefore, the present study aimed to evaluate the antioxidant capacity of ascorbic acid (vit C), tocopherol (vit E) and aqueous extracts of *Gingko biloba* and *Camellia sinensis* observing the response of substances subjected to oxidative stress induction using Menadione (vit K3) as an inducer and the mutant strain *S. cerevisiae* with *GTT1* gene deletion as an *in vivo* model. In view of the tests, it is evident that mutant strains are an excellent model for *in vivo* study, revealing tocopherol as an excellent antioxidant and reinforcing different mechanisms of permeability and cellular transport of substances with different physical-chemical properties.

KEYWORDS: Tocopherol. Ascorbic Acid. Aqueous extracts. Oxidative stress. Menadione.



INTRODUÇÃO

O excesso de oxidantes em organismos vivos gera inúmeras desestabilizações fisiológicas como a peroxidação oxidativa, dano em ácidos nucleicos, disfunção mitocondrial, oxidação de proteínas e outros efeitos que resultam em malefícios a saúde celular, além de desencadear estresse oxidativo quando a defesa antioxidante não supre a demanda do organismo (DORNAS, W.C, 2007). O estresse oxidativo em constante ação pode tornar-se crônico, gerando desequilíbrio ao organismo desenvolvendo problemas como envelhecimento precoce, tumores e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (BARREIROS, 2006).

A ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser evitada e reparada por meio de substâncias antioxidantes geradas de forma intracelular, quando produzidos por nosso corpo, como por exemplo a Glutathione (GSH) ou ingeridas exogenamente por meio da alimentação, como por exemplo as vitaminas e flavonoides (TORRES, 2006). A capacidade antioxidante de um composto se dá por sua capacidade de doar elétrons para outra molécula (radical livre) possibilitando sua estabilização (DORNAS, W.C, 2007). Sendo assim se reconhece a importância de avaliar a capacidade antioxidante de substâncias que possam auxiliar no processo natural celular antioxidante sem que haja toxicidade para o organismo.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados como modelo de estudo de outros organismos e suas interações, devido sua fácil manipulação, similaridade e genoma bem caracterizado (MONTEIRO, 2006). Diante dessas características a utilização da *S. cerevisiae* para a obtenção de mutantes torna-se viável e almejado para o estudo *in vivo*.

Neste estudo utilizou-se a linhagem de *S. cerevisiae* com deleção do gene *GTT1* responsável pela produção da proteína Glutathione S-transferase (GST), caracterizada por sua ação detoxificante, capaz de combater radicais livres xenobióticos e intracelulares (TORRES, 2006). Desta forma objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante de compostos por meio da indução de estresse oxidativo utilizando-se Menadiona (Vitamina K3) como indutor e a *S. cerevisiae* Δ *GTT1* para avaliar a atividade antioxidante das vitaminas E, C e dos extratos naturais de *Ginkgo biloba* e *Camellia sinensis* (Chá verde).

METODOLOGIA

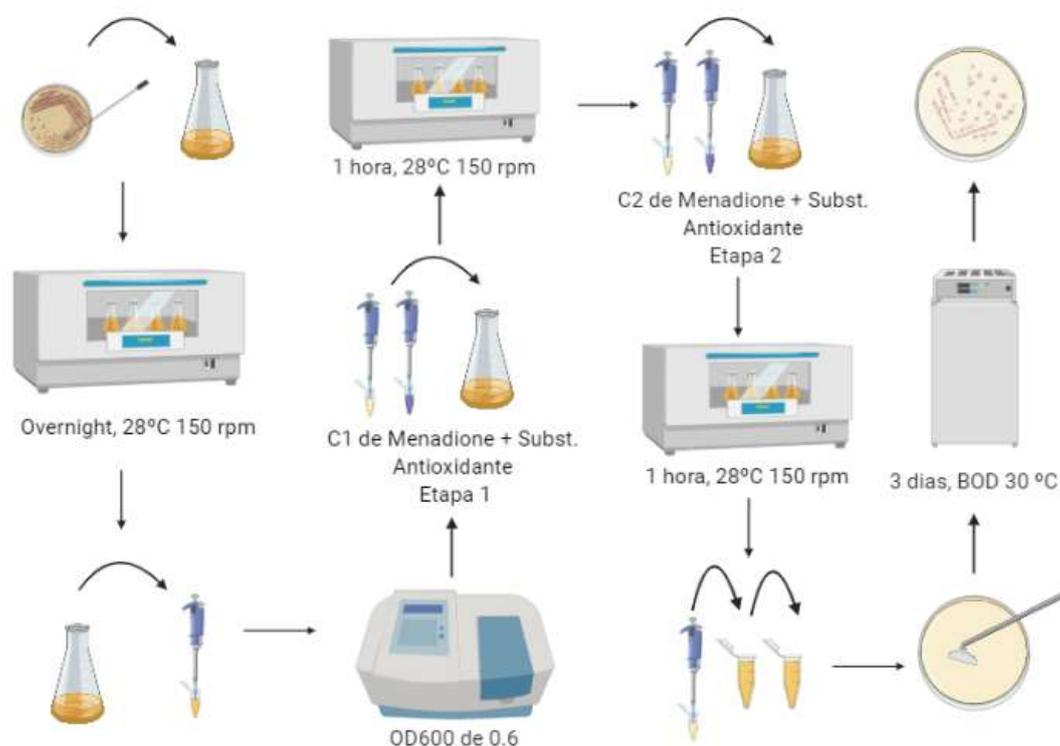
Para a obtenção dos extratos naturais realizou-se a extração aquosa de plantas secas. Utilizou-se 1 grama da planta para cada 10 mL de água em um erlenmeyer de 125 mL devidamente vedado e protegido da incidência de luz com papel alumínio. Em seguida manteve-os sob agitação orbital de 200 rpm a 40 °C durante 24 horas. Após a extração, separou-se a parte sólida (planta) da parte líquida (extrato) e em seguida centrifugou-se o extrato. Por conseguinte filtrou-se o sobrenadante com o sistema de filtração millipore® utilizando uma membrana de nylon estéril para retirar qualquer contaminação presente.

Para o tratamento com vitaminas utilizou-se o Ácido ascórbico (vitamina C) e o Tocoferol (vitamina E). A preparação das vitaminas baseou-se na solubilização das mesmas, desta forma para solubilizar o Tocoferol utilizou-se etanol 99,5% e

água estéril na proporção 2:3, assim como 1% de Tween 80 e para o Ácido ascórbico utilizou-se apenas água estéril.

Os desafios/tratamentos são realizados em duas etapas, utilizando-se 0,25 mM (etapa 1) e 2,5 mM (etapa 2) de Menadione como agente estressor. Para avaliar a capacidade antioxidante dos compostos utilizou-se 1 mL de extrato aquoso para cada 10 mL de meio (em cada etapa) e para as vitaminas utilizou-se 0,05 M em cada etapa, como pode ser observado na metodologia ilustrada na Figura 1 a seguir:

Figura 1 – Tratamento com substância potencial antioxidante contra ao estresse induzido por Menadione em linhagens mutantes de *S. cerevisiae*.



Fonte: Autoria própria (2020).

Após o crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) realizou-se a contagem de UFC e plotou-se os dados em uma curva de crescimento para observar a taxa de sobrevivência das linhagens perante ao agente estressor, assim como a eficiência da substância antioxidante durante e após a realização das duas etapas de tratamento com Menadione. Desta forma realizou-se o monitoramento de UFC durante o período de 0 à 6 horas.

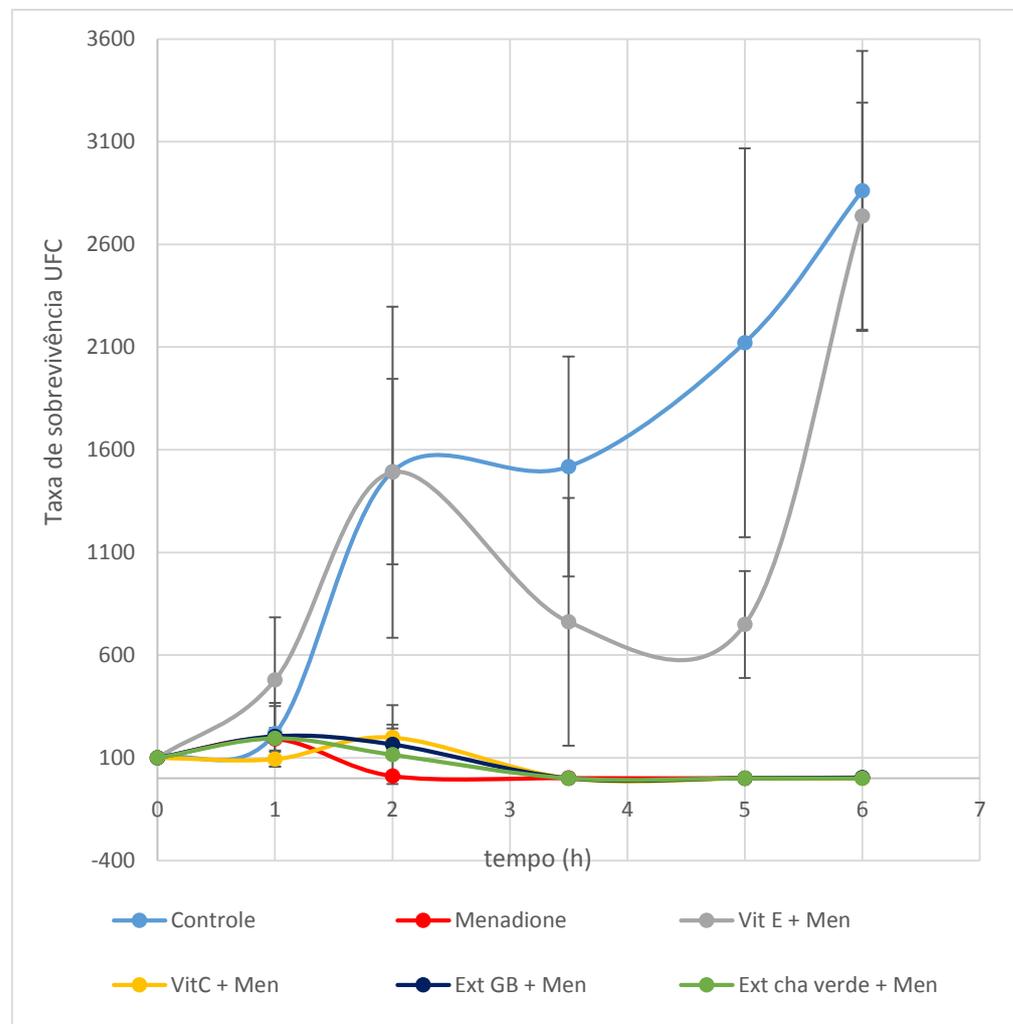
RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tratamento para indução de estresse oxidativo utilizou como agente estressor o composto orgânico conhecido como Menadione ou Vitamina K3. Este composto possui propriedades citotóxicas, sendo conhecida pela indução de apoptose, morte celular e como potente indutor de estresse oxidativo, além de

alguns estudos constatarem seu efeito direto em funções mitocondriais celular (I LAUX, 2001).

Como dito anteriormente, a ação de EROs pode ser evitada e reparada por meio de substâncias antioxidantes. Desta forma, utilizando o modelo *in vivo* com a linhagem mutante *S. cerevisiae* $\Delta GTT1$, realizou-se a avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos de *Gingko biloba* e *Camellia sinensis* (chá verde) como potenciais antioxidantes, assim como a avaliação das vitaminas E e C muito utilizadas na indústria farmacêutica e cosmética como potentes antioxidantes. Para avaliar o desempenho das vitaminas como antioxidante perante ao estresse induzido por Menadione, realizou-se a curva de sobrevivência durante o tratamento executado, como observado na Figura 2 a seguir.

Figura 2 – Curva da taxa de sobrevivência durante o tratamento com Menadione, Vitaminas e extratos aquosos



Fonte: Autoria própria (2020).

Perante o comportamento da curva obtida observa-se que os extratos aquosos possuíram comportamento similar ao apresentado pela vitamina C, uma vez que esta também foi utilizada na forma aquosa sendo caracterizados como

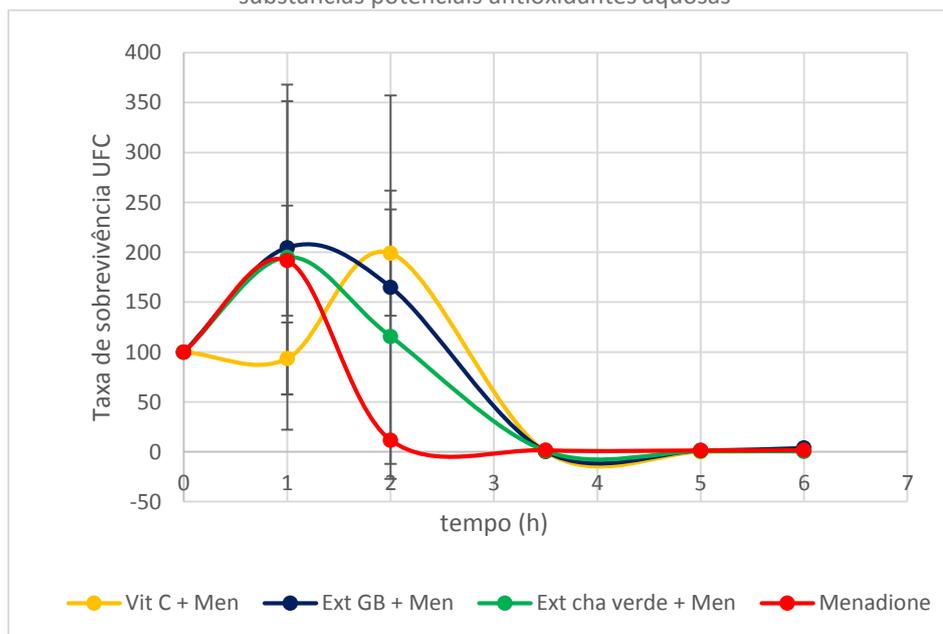
hidrossolúveis, diferentemente da vitamina E, cujo perfil possui característica lipossolúvel.

A absorção de moléculas pela membrana celular é seletiva, sendo uma barreira biológica composta em sua maior parte de uma matriz lipídica biomolecular. Desta forma, moléculas lipossolúveis, como o Tocoferol, possuem maior afinidade com a membrana difundindo-se mais rapidamente do que as hidrossolúveis, como a vitamina C. As membranas ainda são compostas por proteínas que funcionam como receptores e transportadores de moléculas que auxiliam neste processo, muitas vezes requerendo gasto energético (AMORIM, R.M.M, 2004).

A vitamina C, hidrossolúvel, é absorvida por meio de transporte ativo, sendo transportada por proteínas para dentro da célula, além de uma parte ser absorvida por difusão. Apesar de ser considerado um ótimo antioxidante a vitamina C é altamente instável em meio aquoso limitando seu uso, além de possuir dois sítios que podem ser oxidados por EROs (SAMPAIO, B.F.B, 2015). Já o Tocoferol é um composto lipossolúvel possuindo maior afinidade com a membrana celular, desta forma a molécula liga-se a membrana conferindo maior proteção e estabilização a célula, alguns estudos ainda sugerem que o tocoferol aloja-se na membrana mitocondrial (POMPEU, M. A, 2014). Além do processo de difusão, o tocoferol possui ainda afinidade com proteínas carreadoras (SAMPAIO, B.F.B, 2015).

Diante dos diferentes tipos de transportes celulares o mecanismo de ação das substâncias tornam-se diferenciados de acordo com suas características físico-químicas, desta forma plotou-se os resultados dos extratos aquosos juntamente com a vitamina C para verificar se há similaridade de comportamento entre as moléculas hidrossolúveis, como pode ser observado na Figura 3.

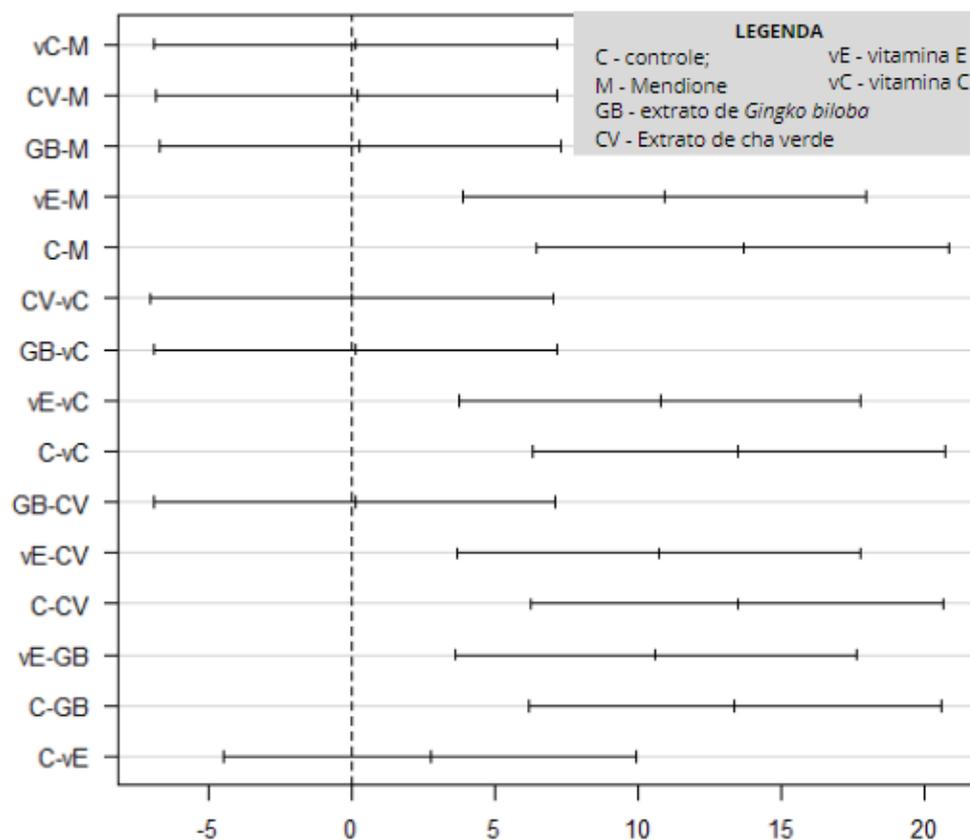
Figura 3 – Curva da taxa de sobrevivência durante o tratamento com Menadione e substâncias potenciais antioxidantes aquosas



Fonte: Autoria própria (2020).

Para comparar os grupos de tratamento e afirmar com confiabilidade os resultados obtidos realizou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey a 95% de confiabilidade, utilizando o Software R, desta forma obteve-se os resultados observados na Figura 4 a seguir:

Figura 4 – Teste de Tukey a 95% de confiabilidade



Fonte: Autoria própria (2020).

Diante do exposto, nota-se que o Tocoferol não teve diferença significativa a 95% de confiabilidade quando comparado ao controle, e obteve diferença significativa do controle positivo contendo apenas Menadione, sendo portanto considerado um ótimo antioxidante.

Os demais compostos não tiveram diferença significativa quando comparados ao Menadione, podendo-se justificar devido suas propriedades físico-químicas cuja permeabilidade celular seja mais lenta e dificultosa. Um fator importante de ressaltar quanto aos extratos de *Gingko biloba* e Chá verde é que quando comparados a Vitamina C não apresentaram diferença significativa, ou seja, sua capacidade antioxidante quando comparados a uma vitamina hidrossolúvel possui similaridade a 95% de confiabilidade.

CONCLUSÃO

Diante do exposto evidencia-se que linhagens mutantes de *S. cerevisiae* são um excelente modelo de estudo in vivo da atividade antioxidante de inúmeros compostos aplicados principalmente na área da saúde, cosmetologia e alimentos. Neste estudo nota-se que o tocoferol possui uma ótima capacidade antioxidante

a 95% de confiabilidade, além de demonstrar que a forma de passagem dos compostos para dentro da célula interfere na ação antioxidante, como demonstrado com a vitamina C e com os extratos de Gingko biloba e chá verde.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária e UTFPR pelo apoio e infraestrutura para pesquisa. Ao orientador Cleverson Busso por me guiar, ensinar e incentivar. Ao Prof. Dr. Mário Henrique de Barros do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP), por ceder as linhagens. Aos profissionais do laboratório e colegas que sempre estiveram presentes.

REFERÊNCIAS

AMORIM, R.M.M - **Biodisponibilidade como parâmetro de qualidade e sua importância no registro de medicamentos** - Dissertação - Universidade Federal do Ceará – 2004.

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, Vol. 2006.

DORNAS, W.C., OLIVEIRA, T.T., RODRIGUES-DAS-DORES, R.G., SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. **Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. V. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

I LAUX, A NEL. **Evidências de que a apoptose induzida por estresse oxidativo pela menadiona envolve vias dependentes de Fas e independentes de Fas**. ELSEVIER - Imunologia Clínica Volume 101, Edição 3, Dezembro de 2001, Páginas 335-344.

MONTEIRO, A.R.S. **Uso de Saccharomyces cerevisiae para estudo de organismos procariotos**. Departamento de Biologia Geral Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais 2006.

POMPEU - M. A - **Níveis de Vitamina E na Dieta para Frangos de Corte nas Fases Inicial e de Crescimento** - UFMG – 2014.

SAMPAIO, B.F.B. **Adição de vitamina C, ácido ascórbico 2-glicosídeo, α - tocoferol e ácido docosaheptaenoico ao diluidor de refrigeração do sêmen de equino**. UFMT – 2015.

TORRES, M.C.L., SOARES, N.F.F., PEREIRA, J.A.M. **Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione S-Transferase de fígado bovino**. SCIELO. Ciência e agrotecnologia vol.30 no.2 Lavras Mar./Apr. 2006.