Avaliação de fitoterápicos quanto a atividade antioxidante in vivo usando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Evaluation of herbal medicines for antioxidant activity in vivo using Saccharomyces cerevisiae strains

Rafaela Furlanetto Liberali[1]; Cleverson Busso[2];
Letícia Scussel Farias[3].

RESUMO

A Doença de Parkinson é uma doença é uma doença neurodegenerativa que vem se agravando com o passar dos anos. A levedura *Saccharomyces cerevisie* gtt1 possuí fenótipos semelhantes ao das células parkinsonianas, que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O potencial antioxidante pode minimizar os impactos causados pelas EROs. Sendo assim este projeto busca avaliar o potencial antioxidante dos extratos de *Momordica charantia* (Melão de São Caetano), *Passiflora alata* (Maracujá doce) e *Passiflora edulis* Sims. (Maracujá azedo) no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisie* gtt1, como forma de encontrar uma possível solução natural como coadjuvante no tratamento do parkinsonismo. As leveduras serão submetidas aos extratos no meio de cultura YPD, sendo comparadas com o controle sem a adição de componentes e com a utilização do oxidante menadiona. O extrato de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims.) apresentou o melhor resultado, podendo ser uma possível solução para auxiliar no o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Extratos vegetais, Maracujá azedo.

ABSTRACT

Parkinson's Disease is a disease is a neurodegenerative disease that has worsened over the years. The yeast Saccharomyces cerevisie gtt1 has phenotypes similar to parkinsonian cells, which increase the production of ROS. The antioxidant potential can minimize impacts by ROS. Thus, this project seeks to evaluate the antioxidant potential of extracts of *Momordica charantia* (Melon de São Caetano), *Passiflora alata* (Passion fruit) and *Passiflora edulis* Sims. (Passion fruit) in the growth of the yeast Saccharomyces cerevisie gtt1, as a way to find a possible natural solution to help in the treatment of parkinsonism. Yeasts will be subjected to extracts in YPD culture medium, being compared with the control without the addition of components and with the use of the oxidant menadione. Passion fruit extract (*Passiflora edulis* Sims.) presents the best result and can be a possible solution for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: Parkinson's disease, Vegetable extracts, Passion fruit sour.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson caracteriza-se por ser uma doença neurodegenerativa, que ocasiona sintomas como: bradicinesia, tremor em repouso, rigidez, bloqueios motores e perda dos reflexos posturais, afetando

principalmente a população com mais de 60 anos (CARACÓIS, 2012; SPRENGER; POEWE, 2013). Até 2030 estimativas mostram anos os casos da Doença de Parkinson irão dobrar, chegando a alcançar entre 8,7 e 9,3 milhões de pessoas (DORSEY et al., 2007).

A proteína α-sinucleína exerce funções celulares importantes, atuando também no sistema nervoso e podendo atuar na formação de neurônios e liberação de neurotransmissores (BONINI; GIASSON, 2005). O aparecimento da doença de Parkinson está ligado a modificações na sequência de aminoácidos do gene *SNCA* (gene humano que codifica a proteína a-sinucleína) (COOPER et. al. 2006). Estudos demonstraram que linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PD1(expressando a proteína α-sinucleína humana) possui fenótipos encontrados em células parkinsonianas, que aumentam a produção de EROs (Espécies Reativas de oxigênio) (ZAMPOL, 2013).

Existem vários modelos de estudos in vivo de doenças humanas, a levedura *S. cerevisiae* é uma delas, este microrganismo possui particularidades que o tornam um excelente modelo experimental, tais como genoma completamente sequenciado, fácil manipulação, rápido crescimento e a presença de vários genes homólogos/ortólogos em humanos (MONTEIRO, 2006). Utilizando-se ferramentas de engenharia genética é possível realizar mutações específicas em genes importantes, tais como genes envolvidos em processos antioxidantes, como a glutationa-S-tranferase (gtt1). Estudos demonstraram que glutationa transferases tem papel importante na proteção de células de leveduras contra o estresse oxidativo, principalmente ocasionado por substâncias oxidantes como o menadione e o cádmio (CASTRO et al., 2007; ADAMIS, et al., 2004).

As propriedades antioxidantes inibem ou impedem a propagação da oxidação em outras moléculas, além disso, suas enzimas catalisam a degradação da EROs. Os antioxidantes são normalmente obtidos por meio da alimentação ou sintetizados pelo organismo, sendo influenciado por fatores como o envelhecimento, inflamações, diferenciação celular e regulação hormonal. Diversos tratamentos utilizam a reposição de antioxidantes, pois a oxidação pode interferir em funções celulares e inclusive mata-las (HERRERO et al. 2008; RODRIGUEZ et al., 2004; ZAMPOL, 2013).

Este estudo busca avaliar o efeito antioxidante in vivo dos extratos vegetais de *Momordica charantia* (Melão de São Caetano), *Passiflora alata* (Maracujá doce) e *Passiflora edulis* Sims. (Maracujá azedo) na levedura *Saccharomyces cerevisie* mutante/deficiente na produção de glutationa-S-transferase 1 (gtt1). Os resultados esperados podem possibilitar a utilização destas substâncias em um estudo mais aprofundado sobre atuação antioxidante principalmente em pacientes com doenças neurodegenerativas.

2 MÉTODO

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Ciências do Colégio Estadual Jardim Porto Alegre e no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Toledo - PR.

Inicialmente as cascas de Maracujá doce, Maracujá azedo e Melão de São Caetano foram lavadas e desidratadas em uma estufa de secagem à 70 °C, para posteriormente serem processadas e peneiradas para a obtenção de uma farinha. Para o preparo dos extratos as farinhas foram pesadas com o auxílio de uma balança de precisão, para posteriormente ser adicionado água destilada, sendo utilizado a concentração de 1,0 grama de farinha para 35mL de água, após preparados os extratos foram filtrados utilizando um filtro quantitativo e posterior membrana de 0,22 µm para eliminação de contaminantes.

Em seguida os filtrados foram mantidos a -40 ºC no ultrafeezer durante 24 horas para posterior liofilização. A liofilização foi realizada a vácuo menor que 500 µHg durante sete dias, os equipamentos ultrafreezer e liofilizador foram utilizados no laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR – Toledo.

A levedura foi cultivada em meio caldo YPD (para 1 litro: 10g de extrato de levedura; 20g de peptona; 20g de dextrose e 20g de ágar quando realizado meio sólido para o cultivo). Os ingredientes foram misturados, adicionando água destilada para seu preparo. Após o preparo do meio de cultura, este foi autoclavado em um frasco Schott à 121ºC por 20 minutos. O meio de cultura sólido foi vertido em placas de petri esterilizadas próximos ao bico de bunsen para evitar a contaminação.

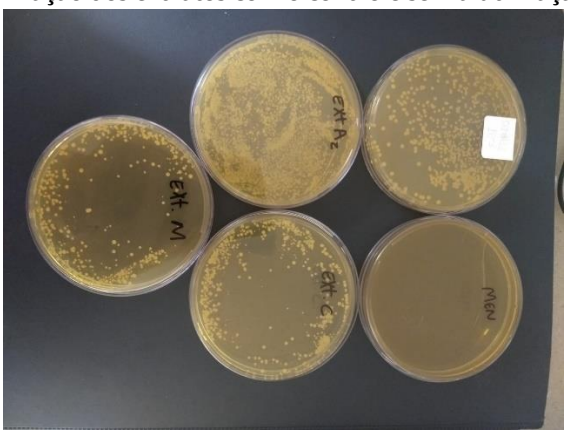
Para a realização dos tratamentos/desafios utilizou-se um composto orgânico conhecido como Menadione ou Vitamina K3 como agente estressor, que possui a capacidade de induzir a morte celular. Os desafios/tratamentos foram realizados em duas etapas, utilizando 0,25 mM (etapa 1) e 2,5 mM (etapa 2) de Menadione. Para avaliar a capacidade antioxidante dos compostos utilizou-se 10% p/v de extrato liofilizado para os ensaios, utilizando 5% em cada etapa do tratamento. Cada etapa do tratamento foi mantida a 30 ºC em 150 rpm durante 1 hora. Após as duas etapas, plaqueou-se 100 µL nas placas de YPD e manteve-as em BOD à 30 ºC. Após 72 horas realizou-se a contagem das colônias de leveduras que cresceram para a análise dos resultados, avaliando a taxa de sobrevivência entre os tratamentos.

As análises estatísticas dos dados foram realizadas por meio da utilização do software *Microsoft R Open* versão 3.5, sendo estes submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* a nível de significância de 0,05 garantindo 95% de confiabilidade dos resultados.

3 RESULTADOS

Os resultados foram obtidos a partir da contagem das leveduras, sendo realizada a contagem de duas placas de petri e realizadas as médias. As placas após os tratamentos podem ser visualizadas na Figura 1.

Figura 1: Comparação da utilização dos extratos com o controle sem a utilização de aditivos e o menadione.



Fonte: Cleverson Busso.

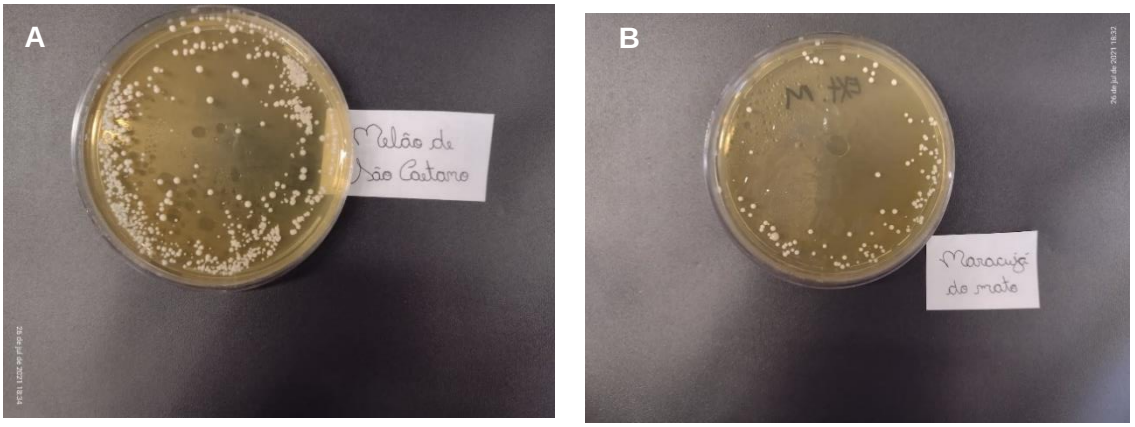
A utilização de Menadione induziu a geração de EROs promovendo um processo oxidativo letal reduzindo significativamente o número de células em crescimento. Como se observa na Figura 2, houve apenas 19 colônias em ambas repetições, demonstrando morte celular devido a ação do Menadione, enquanto o controle sem a adição de aditivos apresentou o crescimento de 1.220 colônias (diluído mil vezes), resultando em um total de 1,22 x 10^6 colônias.

Figura 2: Crescimento das leveduras na ausência e presença de menadione.

Fonte: Rafaela Furlanetto Liberali.

A utilização de melão de São Caetano e Maracujá doce apresentaram atividade antioxidante com o crescimento de 809 e 722 colônias respectivamente (Figuras 3A e 3B).

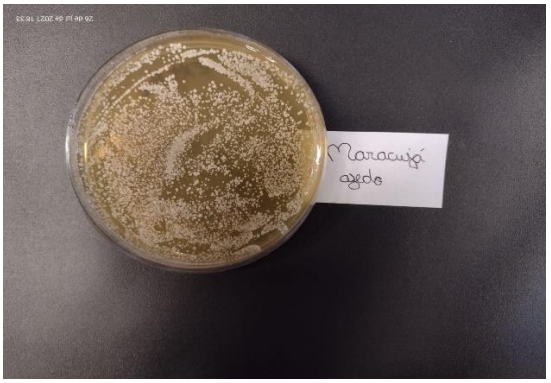
Figura 3: A) - Crescimento das leveduras sobre o efeito do extrato de Melão de São Caetano. B) - Crescimento das leveduras sobre o efeito do extrato de Maracujá doce.



Fonte: Rafaela Furlanetto Liberali.

O extrato que apresentou o melhor potencial antioxidante foi o de maracujá azedo, com o crescimento de 5.801 colônias (Figura 4).

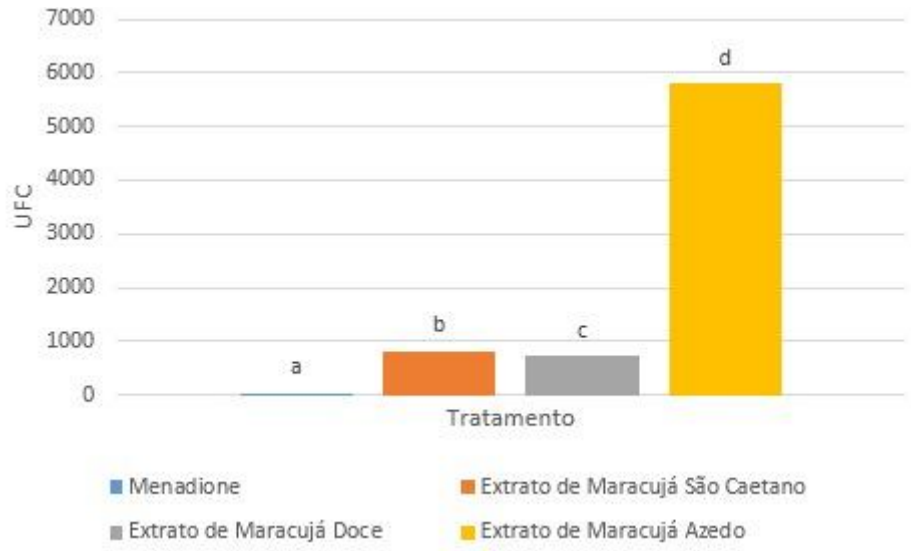
Figura 4: Crescimento das colônias de leveduras sobre o efeito do extrato de Maracujá azedo.



Fonte: Rafaela Furlanetto Liberali.

Estatísticamente todos os três extratos apresentaram atividade antioxidante in vitro quando comparado ao efeito oxidante e letal do menadione. O extrato de Maracujá Azedo apresentou o melhor resultado quando comparado aos demais extratos (figura 5).

Figura 5: Crescimento das colônias de leveduras sobre o efeito do extrato de Maracujá azedo. As letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferença significativa



4 CONCLUSÃO

Os extratos de Melão de São Caetano, Maracujá doce e Maracujá azedo apresentaram potencial antioxidante, reduzindo os efeitos danosos provocados pelo menadione em células sensíveis de *Saccharomyces cerevisie* gtt1. O extrato de Maracujá azedo o que apresentou melhor resultado, sendo capaz de restabelecer o crescimento celular em cerca de 59,91% quando comparado aquelas células cultivadas na presença oxidante Menadione. Estes dados sugerem que estes compostos apresentam uma ótima atividade antioxidante in vivo em células de levedura e que potencialmente podem abrir novos estudos para aplicação em doenças neurodegenerativas.

AGRADECIMENTOS

As instituições de ensino que nos auxiliaram, ao CNPQ pelo auxílio financeiro e ao nosso orientador Claveson Busso por possibilitar que esta pesquisa fosse realizada.

5 REFERÊNCIAS

ADAMIS P. D., GOMES D. S., PINTO M. L., PANEK A. D., ELEUTHERIO E. C. A. **The role of glutathione transferases in cadmium stress**. Toxicol Lett; 154: 81–88.2004

BONINI, N. M.; GIASSON, B. I. **Snaring the function of apha-synuclein**. Cell, v. 123, n.3, p. 159-361, 2005.

CARACÓIS, L. M. **Doença de Parkinson no Paciente Odontogeriátrico**. Dissertação. Universidade de Lisboa. Lisboa, 2012.

CASTRO FAV, HERDEIRO RS, PANEK AD, ELEUTHERIO ECA, PEREIRA MD. **Menadione stress in Saccharomyces cerevisiae strains deficient in the glutathione transferases**. Biochim Biophys Acta. 1770: 213–220. 2007.

COOPER, A.; GITLER, A. D.; CASHIKAR, A.; HAYNES, C. M. HILL, K. J.; BHULLAR, B. LIU, K.; XU, K.; STRATHEARN; K. E.; LIU, F.; CAO, S.; CALDWELL, K. A.; CALDWELL, G. A.; MARSISCHKY, G. KOLODNER, R. D.; LABAER, J.; ROCHET, J. C.; BONINI, N. M.; LINQUIST, S. **Alpha-synuclein blocks ER-golgi traffic and Rab 1 rescues neuron loss in Parkinson´s models**. Science, v. 313, n. 5785, p. 324-328, 2006.

DORSEY, E. R. et al. **Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations**, 2005 through 2030. Neurology, v. 68, n. 5, p. 384-386, 2007.

HERRERO, E.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. **Redox control and oxidative stress in yeats cells. Biochim**. Biophys. Acta, v. 1780, p. 1217-1235, 2008.

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

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. **Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin**. J. Pineal Res., v. 36, p. 1-9, 2004.

SPRENGER, F.; POEWE, W. **Management of Motor and Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease**. CNS drugs, v. 27, n. 4, p. 259-272, 2013.

ZAMPOL, Mariana Alba. **Efeito de antioxidantes naturais em modelos parkinsonianos de *Saccharomyces cerevisiae*.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.