

# Saccharomyces cerevisiae como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos

Saccharomyces cerevisiae as a biological model to evaluate the antioxidant capacity of compounds

Daniele Grazziotin Soares, Ana Cristina Andreatza & Mirian Salvador\*

**RESUMO** – Ensaios microbianos *in vitro*, utilizando-se principalmente células eucarióticas, têm se mostrado muito adequados na triagem rotineira de vários produtos, constituindo-se em testes rápidos, sensíveis, econômicos, reprodutíveis e representativos das condições celulares do homem. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antioxidante do butil hidroxitolueno, propil galato, resveratrol e vitaminas C e E utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de sistema biológico. As células foram tratadas com os antioxidantes na presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat. Os resultados mostraram que todos os compostos testados foram capazes de proteger as células da levedura contra os danos causados pela apomorfina e somente o butil hidroxitolueno e a vitamina C apresentaram atividade antioxidante contra o paraquat.

**PALAVRAS-CHAVE** – *Saccharomyces cerevisiae*, propil galato, butil hidroxitolueno, resveratrol, vitamina C, vitamina E.

**SUMMARY** – Experiments using *in vitro* living cells have proved to be very useful for the routine testing/sampling of several products, tests based on this methodology being rapid, sensitive, reproducible and cheap as well as producing reliable results in terms of the identification of biological activity. The aim of the work described in this paper was to measure the antioxidant activity of butyl hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol and vitamins C and E using a biological system consisting of *Saccharomyces cerevisiae* cells. The cells were treated with the antioxidants in the presence of the stressing agents apomorphine and paraquat. The results shown that all the antioxidants tested were capable to protect yeast cells against damage caused by apomorphine and only the butylated hydroxytoluene and vitamin C showed antioxidant activity against paraquat.

**KEYWORDS** – *Saccharomyces cerevisiae*, butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, vitamin C, vitamin E.

## INTRODUÇÃO

Os antioxidantes possuem larga aplicação em diferentes produtos como alimentos, cosméticos e medicamentos. Em alimentos os antioxidantes são utilizados com a finalidade de bloquear os processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres, aumentando o tempo de vida útil e evitando a ocorrência de reações químicas indesejáveis (Sánchez-Moreno *et al.*, 1999). Em medicamentos os antioxidantes aumentam a duração do produto e nas formulações cosmeceúticas auxiliam na proteção contra os danos causados pela radiação UV (Zulli *et al.*, 2000) e combatem os danos causados pelos radicais livres evitando ou diminuindo a destruição tissular (Niki *et al.*, 1995; Póvoa, 1995).

Os primeiros compostos antioxidantes utilizados foram produtos sintéticos, como por exemplo, o butil hidroxitolueno (BHT) e o propil galato (PG). Estes antioxidantes são mais baratos, mais facilmente avaliados, de boa qualidade e apresentam grande atividade antioxidante. No entanto, em doses elevadas podem interferir com a saúde do consumidor (Shahidi & Wanasundara, 1992; Sortwell, 1995). Os principais alvos de toxicidade do BHT são os pulmões, o fígado e as células sanguíneas (Bannwart & Toledo, 1999). Segundo Williams *et al.* (1999) o BHT, em concentrações elevadas aumenta, a promoção de tumores. Pode também promover o desenvolvimento de adenomas e carcinomas hepatocelulares em ratos (Verhagen *et al.*, 1989). O PG pode causar dermatite de contato nas pessoas que o manuseiam (Wertzen, 1990; Shahidi & Wanasundara, 1992).

Atualmente, com a busca cada vez maior por produtos naturais e com a crescente utilização de compostos antioxidantes em terapias preventivas nas doenças nas quais os radicais livres estão implicados, os produtos naturais, como vitaminas e flavonóides, têm merecido atenção especial (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter uma medição, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de compostos, tanto através de *in vitro* (testes químicos) ou *in vivo* (testes biológicos).

Embora os testes químicos sejam relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, verificou-se que estes não são representativos das condições celulares do homem. Por outro lado, os ensaios microbianos, utilizando-se principalmente células eucarióticas, têm-se mostrado muito adequados na determinação da capacidade antioxidante, constituindo-se em testes rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis (Rabello-Gay *et al.*, 1991). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui características que a tornam um modelo no estudo dos mais diferentes compostos (Gancedo, 1998). A avaliação da capacidade antioxidante pode ser feita pela medida da sobrevivência de células tratadas com os antioxidantes em presença e ausência de agentes estressores, como por exemplo, a apomorfina e o paraquat (Benzie & Szeto, 1999; Wang *et al.*, 1999; Espín *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2003).

Em vista disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante do BHT, PG, resvera-

Recebido em 14/2/2003

\*Inst. de Biotec. e Dept<sup>o</sup>. de Ciênc. Bioméd., Univ. de Caxias do Sul - Rua Franc<sup>o</sup>. Getúlio Vargas, 1130 - Caxias do Sul, RS, 95070-560 - e-mail: msalvado@ucs.br

trol e vitaminas C e E em um modelo de sistema biológico utilizando-se células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Antioxidantes

Foram analisados o BHT, PG, resveratrol e vitaminas C e E (todos E. Merck). Para o preparo da solução de vitamina C, o solvente utilizado foi a água destilada estéril e para os demais compostos utilizou-se uma mistura de etanol e água (2:3). Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

### Linagem

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada foi XV 185-14C (MATA ade2-1, arg4-17, his1-7, lys1-1, trp5-48, hom3-10) gentilmente cedida pelo Dr. Von Borsstel, do Departamento de Genética, Universidade de Alberta, Canadá.

### Agentes estressores

Foram utilizados o alcalóide apomorfina (E. Merck), capaz de gerar radicais quinonas, semiquinonas e radical superóxido (Lai & Yu, 1997; Mena *et al.*, 1997; Blum *et al.*, 2000) e o herbicida paraquat (E. Merck), gerador dos radicais paraquat,  $O_2^{\cdot-}$  e OH (Bulkley, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2000). As soluções foram preparadas em água destilada estéril.

### Determinação da capacidade antioxidante

Para determinação da capacidade antioxidante  $2 \times 10^6$  células/mL, provenientes de fase exponencial de crescimento, foram tratadas com as soluções dos

antioxidantes e do agente estressor e incubadas a 28°C por 21 horas, com agitação, em meio completo YEPD (2% de glicose, 1% extrato de levedura e 2% de peptona, todos E. Merck). Após, as células foram convenientemente diluídas em solução de NaCl (Reagem) 0,9%, semeadas em placas de Petri contendo meio YEPD sólido (2% de bacto ágar) e incubadas por 48 horas a 28°C. A viabilidade celular foi determinada pela contagem das colônias nas placas, considerando-se o tubo controle (sem tratamento) como 100% de sobrevivência. Para todos os ensaios foram realizadas, no mínimo, três repetições.

### Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tuckey, utilizando-se o programa SPSS 8.0 for Windows.

## RESULTADOS

Para o estudo da capacidade antioxidante dos diferentes compostos utilizou-se a maior concentração não citotóxica às células de levedura, que foi de 0,025mM (dados não mostrados).

As curvas de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* tratada com os antioxidantes em presença dos diferentes agentes estressores são apresentadas na Tab. I. Observa-se que, tanto o paraquat como a apomorfina, exercem um importante efeito citotóxico dose-dependente sobre as células de levedura. A adição prévia de todos os antioxidantes aumenta significativamente os valores de sobrevivência das leveduras tratadas com apomorfina. Já para o para-

quat, aumentos significativos de sobrevivência, em relação aos controles, foram observados somente nos tratamentos com BHT e vitamina C.

Com o objetivo de tentar identificar quais os compostos com melhor atividade antioxidante, frente a cada agente estressor calculou-se o aumento do percentual de sobrevivência da levedura (Fig. 1 e 2), subtraindo-se os valores obtidos nos tratamentos com o antioxidante adicionados do agente estressor daqueles obtidos somente com o agente estressor.

Os resultados mostra-

**TABELA I**  
Valores de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* tratada com os antioxidantes em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat

Concentração dos agentes estressores (mM)	Controle dos agentes estressores	Sobrevivência (%) ± DP				
		BHT	PG	Resveratrol	Vitamina C	Vitamina E
<b>Apomorfina</b>						
0	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
0,1	63,63±1,11	100,00±0,00*	86,20 ± 6,64*	100,00±0,00*	100,00±0,00*	100,00± 0,00*
0,2	49,80±1,27	100,00±0,00*	74,03±2,96*	100,00±0,00*	100,00±0,00*	68,20± 0,74*
0,3	41,25±1,62	100,00±0,00*	66,70±2,12*	100,00±0,00*	71,70±3,67*	61,85±1,76*
<b>Paraquat</b>						
0	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
5	43,25±4,66	85,80±3,39*	51,53±4,78	48,58±2,52	100,00±0,00*	44,58±3,13
10	32,55±1,01	52,50±3,53*	34,70±1,06	33,00±0,14	87,70±2,82*	37,07±0,14
15	23,95±3,75	44,87±4,16*	28,49±1,06	24,85±1,34	35,50±4,34*	28,31±6,60

Valores seguidos por \* são estatisticamente diferentes dos valores do controle do agente estressor pelo teste de Tuckey, para  $p \leq 0,05$ .

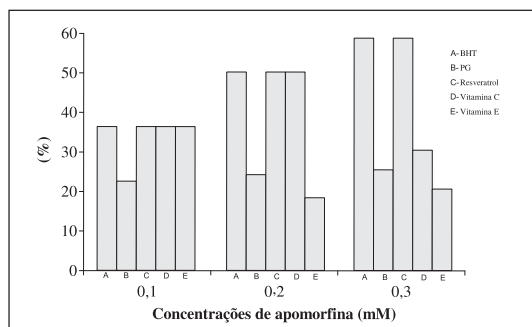


FIG. 1 - Aumento do percentual de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* tratada com os antioxidantes em presença de apomorfina.

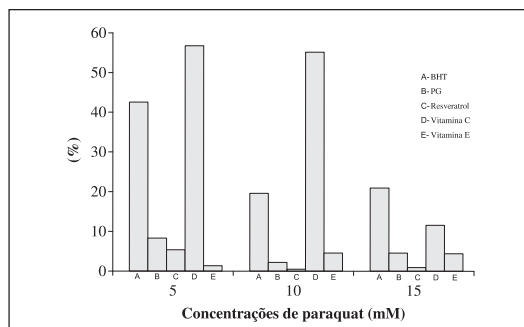


FIG. 2 - Aumento do percentual de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* tratada com os antioxidantes em presença de paraquat.

ram que todos os compostos testados foram capazes de proteger as células da levedura dos danos causados pela apomorfina (Fig. 1). Nos tratamentos com o agente estressor paraquat (Fig. 2), somente o BHT e a vitamina C mostraram-se eficazes. Observou-se, no entanto, que esta atividade diminuiu de forma estatisticamente significativa na concentração de 15mM de paraquat.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os antioxidantes ensaiados mostraram-se efetivos em proteger as células de levedura contra os danos causados pela apomorfina, um agente estressor capaz de gerar quinonas, semiquinonas e radical superóxido (Lai & Yu, 1997; Mena *et al.*, 1997; Blum *et al.*, 2000). No entanto, somente o BHT e a vitamina C apresentaram capacidade antioxidante frente ao paraquat, um herbicida que, em presença de NADPH, gera o radical paraquat, superóxido e hidroxila (Bulkey, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2000). A levedura *S. cerevisiae* possui as enzimas Sod citossólica e mitocondrial, capazes de detoxificar o radical  $O_2^-$ , diminuindo seus efeitos deletérios. No entanto, não existem defesas contra o radical hidroxila. Desta forma, é possível que quantidades maiores de antioxidantes tenham sido gastas para minimizar os efeitos deste radical livre, não sendo possível reverter completamente a citotoxicidade gerada pelo paraquat. Provavelmente, doses maiores de antioxidantes poderiam apresentar efeitos mais pronunciados, no entanto, a citotoxicidade do antioxidante em estudo é uma das limitações deste ensaio. Neste caso, estudos "in vitro" poderiam ser realizados a fim de verificar a eficácia do resveratrol, PG e vitamina E frente ao paraquat.

Ainda assim, várias razões tornam a levedura *S. cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Trata-se de um organismo provido de núcleo e de organelas com metabolismo semelhante à de eucariotos superiores. Em estudos de mutagenicidade e genotoxicidade os resultados obtidos mostraram correlação de, aproximadamente, 80%, com aqueles observados em humanos (Henriques *et al.*, 2001). A facilidade e a rapidez na obtenção de gerações permite sua manipulação em laboratório para a realização dos mais diversos experimentos, com número grande de repetições e desenhos experimentais. Os ensaios podem ser realizados em qualquer laboratório de microbiologia, com custo acessível. O genoma da levedura *S. cerevisiae* foi totalmente desvendado através do projeto de sequenciamento concluído em 1996, o que permite a clonagem de diferentes genes, sua rápida e precisa identificação e caracterização, assim como melhor compreensão de sua função celular (Dickenson & Schweizer, 1999). Já existem vários mutantes deficientes em sistemas de reparo de lesões provocadas pelo estresse oxidativo (Gralla & Valentine, 1991), facilitando o estudo do mecanismo de ação dos diferentes antioxidantes. Embora os testes utilizando células eucarióticas de *S. cerevisiae* não substituam àquelas realizados em mamíferos, o sistema de ensaio com leveduras apresenta uma série de vantagens que podem ser exploradas, inclusive por pequenos laboratórios.

Embora não haja dúvidas sobre o benefício da utilização de antioxidantes em alimentos, cosméti-

cos e medicamentos (Halliwell & Gutteridge, 2000), os dados obtidos neste trabalho mostram que o mecanismo de ação de cada composto deve ser investigado de forma mais detalhada, a fim de que seja possível determinar as vantagens e desvantagens da sua utilização. Além disso, mais estudos a cerca da capacidade antioxidante de compostos naturais devem ser realizados a fim de que possam vir a substituir os antioxidantes sintéticos como o BHT e o PG, sem prejuízo da capacidade antioxidante e sem os efeitos indesejáveis relatados para o BHT e PG (Zeiger, 1993).

## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao PPGP/UCS, CAPES e FAPERGS pelo apoio dado para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Bannwart, G.C.M.C & Toledo, M.C.F. Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ. Bol. SBCTA, 33(2), 245-255, 1999.
2. Benzie, I. F. F.; Szeto, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem. 47: 633-636, 1999.
3. Blum, D.; Torch, S.; Nissou, M.F.; Banabib, A.L.; Verna, J.M. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. Neurosci. Lett., 283: 193-196, 2000.
4. Bulkey, G.B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. Surgery., 113: 479-483, 1993.
5. Espin, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. J. Agric. Food Chem., 48: 648-656, 2000.
6. Gancedo, J.M. Yeast carbon catabolite repression. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 334-361, 1998.
7. Gralla, E.B. & Valentine, J. S. (1991) Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. J. Bacteriol., 173: 5918-5920.
8. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.
9. Henriques, J. A. P.; Dafreé, A. L.; Picada, J. N.; Maris, A. F.; Salvador, M. (2001) Espécies Reativas de Oxigênio e Avaliação de Antioxidantes em Sistemas Biológicos. In: Biotecnologia na Agricultura e na Agropecuária; Luciana Serafini, Neiva Barros e João Lúcio Azevedo (Ed.) Agropecuária, Instituto de Biotecnologia de Caxias do Sul.
10. Lai, C. T. & Yu, P.H. Dopamine and L-b-3-4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-DOPA)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Biochem. Pharmacol., 53: 317-328, 1997.
11. Mena, M.A.; Casajeros, M.J.; Carazo, A.; Paño, C.L.; García De Yébenes, J. Glia protect midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. J. Neural Transm., 104: 317-328, 1997.
12. Niki, E.; Noguchi, N.; Tsuchihashi, H.; Gotoh, N. Interaction among vitamin C, vitamin E and beta-carotene. Am. J. Clin. Nutr., 62(6): 1322-1326, 1995.
13. Póvoa, H. Radicais livres em Patologia Humana. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Imago, 1995.
14. Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. L.A. R. & Monteleone Neto, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética, 1991.
15. Sánchez-Moreno, S.; Laurauri, J.A.; Calixto-Saura, F. Free radical scavenger capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents. Food Res. Internat., 32: 407-412, 1999.
16. Shahidi, F. & Wanasundara, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 32: 67-103, 1992.
17. Soares, D. G. Avaliação da Capacidade Antioxidante do Butil hidroxitolueno, Propil galato, Resveratrol, Vitamina C e Vitamina E em Sistemas Biológicos e Químicos, 2001. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) Univ. de Caxias do Sul – Inst. de Biotecnologia, 2001.
18. Sortwell, D. El uso de antioxidantes BHA y BHT. Tecnol. Aliment., 30(5): 9-11, 1995.
19. Verhagen, H.; Beckers, H.H.G.; Comuth, P.A.; Maas, L.M.; Hoor, E.T.; Henderson, P.T.; Kleinjans, J.C.S. (1989). Disposition of single oral doses of butylated hydroxytoluene in man and rat. Food Chem. Toxic., 27(12): 765-772, 1989.
20. Wang, M.; Jin, Y.; Ho, C.T. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2 diphenyl 1-picrylhydrazyl radical. J. Agric. Food Chem., 47(10): 3947-3977, 1999.
21. Wertzen, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals antioxidants. Food Chem. Toxic., 28(11): 743-745, 1990.
22. Williams, G.M.; Iatropoulos, M.J.; Whysner, J. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. Food Chem. Toxicol., 37: 1027-1038, 1999.
23. Zeiger, E. Mutagenicity of chemicals added to food. Mutation Res. 250:53-61, 1999.
24. Zulli, F.; Liechti, C.H.; Suter, F. Controlled delivery of lipophilic agents to cell cultures for in vitro toxicity and biocompatibility assays. Int. J. Cosmetic Sci., 22(4): 265-270, 2000.