



Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*

George Laylson da Silva Oliveira¹

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Laboratório de Genética Toxicológica, Teresina (PI), Brasil.

RESUMO

A rutina é um tipo de flavonoide encontrado nas plantas e de grande interesse farmacológico, já que muitas propriedades têm sido atribuídas a rutina, incluindo antialérgica, anti-inflamatória, antitumoral e principalmente antioxidante. O objetivo deste estudo foi proporcionar um maior conhecimento sobre a capacidade antioxidante celular da rutina utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficiente e deficiente em defesas antioxidantes. As linhagens de *S. cerevisiae* (Sodwt, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ, Sod1ΔCat1Δ) foram expostas as várias concentrações da rutina em três diferentes condições de tratamento (pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento) e assim verificar se a rutina inibe o efeito oxidativo do peróxido de hidrogênio, permitindo o aumento da sobrevivência das linhagens testadas. Os resultados obtidos mostram que a rutina diminui significativamente os danos oxidativos nas linhagens de *S. cerevisiae* nas condições de pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento, demonstrando que a rutina apresenta uma elevada capacidade antioxidante celular, sendo importante na proteção ao estresse oxidativo induzido.

Palavras-chave: Rutina. *S. cerevisiae*. capacidade antioxidante.

INTRODUÇÃO

A rutina (Figura 1) é um tipo de flavonoide encontrado nas plantas e de grande interesse farmacológico para saúde humana, já que muitas propriedades têm sido relatadas e atribuídas para a rutina, incluindo antialérgica, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriano, propriedades antiplaquetárias, antiespasmódico, antivirais, antiúlceras, antidiarreico, vasodilatador, citoprotetora, anti-hipertensivo, antimutagênica e proteção contra o estresse nitrosativo e lesão hepatocelular (Calabrò *et al.*, 2005; Domitrovic *et al.*, 2012; Janbaz *et al.*, 2002; Mahmoud, 2012; Yang *et al.*, 2008). Existem outros estudos que mostra um efeito dose resposta da rutina na inibição da peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e atividade antioxidante pela eliminação de espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila (OH•), ânion radical superóxido (O₂•-) e radical peróxido (R-O-O•) (Caillet *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Calabrò *et al.*, 2005).

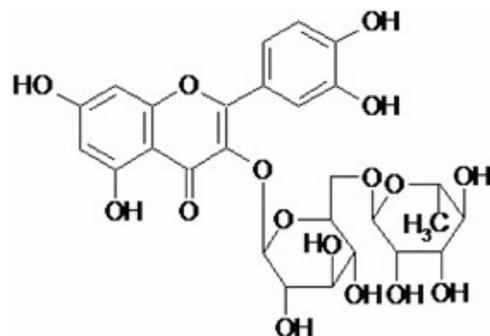


Figura 1: Estrutura química da rutina.

Muitas das ações biológicas dos flavonoides podem estar relacionadas às suas propriedades antioxidantes e devido a sua estrutura química, podem atuar como doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete, além do seu potencial quelante (Williams *et al.*, 2004). Os mecanismos precisos pelos quais os flavonoides exercem suas ações benéficas, principalmente como antioxidantes,

precisam ainda ser bem conhecidos, já que muitas das informações disponíveis são insuficientes e os principais ensaios antioxidantes utilizados são *in vitro*.

Na literatura científica vários métodos *in vitro* são utilizados para avaliar capacidade antioxidante de uma variedade de substâncias químicas e estes métodos podem ser a base para a realização de estudos antioxidante *in vivo*. Os métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante são o DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ou ABTS•+ (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*), FRAP (*Ferric-Reducing Ability of Plasma*), TRAP (*Total Radical – Trapping Antioxidant Parameter*), CUPRAC (*Cupricions Cu²⁺ reducing antioxidant power*) e métodos de peroxidação lipídica (Moon & Shibamoto, 2009). Mesmo com os métodos descritos anteriormente, é de suma importância a avaliação antioxidante sobre a sobrevivência celular por meio de células vivas e oxidantes fisiologicamente relevantes.

Apesar da extensa caracterização antioxidante *in vitro* da rutina, mais estudos precisam ser realizados com ensaios que abordem o potencial antioxidante em nível celular, como o ensaio que utiliza linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes em defesas antioxidantes. Após o tratamento com uma substância química, um aumento no crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* contra o estresse oxidativo induzido serve como um indicativo de capacidade antioxidante (Wu *et al.*, 2011). A utilização de *S. cerevisiae* como um sistema de modelo para o estudo da resposta ao estresse oxidativo, demonstra ser bastante útil para avaliar se um produto químico apresenta capacidade antioxidante ou pró-oxidante, já que suas defesas antioxidantes são semelhantes aos de organismos superiores (Frassinetti *et al.*, 2012). Danos oxidativo a proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e ao sistema de defesa contra o estresse oxidativo são basicamente semelhante em todos os níveis de organização celular, o que torna *S. cerevisiae* um organismo de referência para avaliação antioxidante *in vivo* (Roehrs *et al.*, 2010).

O objetivo deste estudo foi proporcionar um maior conhecimento sobre a capacidade antioxidante da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em defesas antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase e catalase.

MATERIAL E MÉTODOS

Rutina

Para avaliação antioxidante utilizando linhagens de *S. cerevisiae*, a rutina (MP Biomedics, CAT NO-102824, LOT NO-5744E) foi dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido) e diluída em água destilada. Para evitar interferência nos resultados antioxidantes, a concentração de DMSO na solução final não excedeu 0,01%. A solução da rutina foi esterilizada antes da realização do teste e as

concentrações utilizadas foram de 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 150µg/mL, 250µg/mL e 500µg/mL.

Linhagens de levedura *S. cerevisiae* e as condições de crescimento

As linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em Superóxido dismutase (Sod) e Catalase (Cat) foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa em Genética Toxicológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e estão descritas na Tabela 1. As linhagens de *S. cerevisiae* foram replicadas em meio YEPD sólido (1% extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar) e armazenadas em condições apropriadas.

Avaliação da capacidade antioxidante celular

Para avaliação antioxidante celular da rutina, foi utilizada a metodologia do disco central segundo Frago *et al.* (2008), com algumas modificações. Foram utilizadas linhagens em fase estacionária (2×10^8 células/mL) de *S. cerevisiae*, que depois foram lavadas e resuspensas em solução salina estéril (NaCl a 0,9%) para uma concentração final de tratamento de 1×10^7 células/mL.

As linhagens de *S. cerevisiae* (Sodwt, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ, Sod1ΔCat1Δ) foram expostas às concentrações da rutina em três diferentes condições de tratamento, sendo pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento. No pré-tratamento, as concentrações da rutina foram adicionadas primeiramente em um disco de papel filtro no centro da placa de YEPD e três horas depois, adicionou-se o agente estressor peróxido de hidrogênio. No co-tratamento, foram adicionados simultaneamente as concentrações da rutina e o agente estressor peróxido de hidrogênio no disco de papel filtro. No pós-tratamento adicionou-se, primeiramente o peróxido de hidrogênio e três horas após, adicionaram-se as concentrações da rutina. Após 48 horas de incubação em estufa a 30°C, mediu-se o halo de inibição do crescimento em milímetros (mm) desde a margem do disco de papel-filtro para o início do crescimento celular. Os valores podem variar de 0 mm (crescimento completo) a 30 mm (ausência de crescimento), sendo estes valores o tamanho da placa de petri. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Em cada avaliação, as linhagens foram estriadas em placa de YEPD contendo no centro um disco de papel filtro, que é adicionado 10µL da rutina e do peróxido de hidrogênio (40 mM). Um controle com somente o peróxido de hidrogênio foi realizado para todas as linhagens de *S. cerevisiae*.

Análise estatística

O resultado antioxidante é o valor da média ± DP (desvio padrão) de três experimentos, sendo que cada experimento foi realizado em triplicata para cada tratamento. A estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism 5.01. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

Tabela 1: Descrição das linhagens de *S. cerevisiae* usadas na avaliação antioxidante.

Descrição	Genótipo	Deficiência em defesas enzimáticas	Origem
EG103 (Sodwt)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52	Nenhum	Edith Gralla, Los Angeles
EG118 (Sod1Δ)	Sod1::URA3 all other markers as EG103	Cu-Zn superóxido dismutase (citossólica)	Edith Gralla, Los Angeles
EG110 (Sod2Δ)	Sod2::TRP1 all other markers as EG103	Mn superóxido dismutase (mitocondrial)	Edith Gralla, Los Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	Sod1::URA3 Sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Superóxido dismutase citossólica e mitocondrial	Edith Gralla, Los Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, except Cat1:: TRP1	Catalase Citossólica	Edith Gralla, Los Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, except Sod1:: URA3 and Cat1::TRP1	Cu-Zn superóxido dismutase e catalase citossólica	Edith Gralla, Los Angeles

Tabela 2. Capacidade antioxidante celular da rutina em linhagens de *S. cerevisiae*.

Tratamento/ Atividade	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	Rutina					
		25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL
Co-tratamento/ Antioxidante	Sodwt	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Sod2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Cat1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Cat1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Pré-tratamento/ Antioxidante	Sodwt	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Sod2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Cat1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Cat1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Pós-tratamento / Antioxidante	Sodwt	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Sod2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Cat1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Cat1	✓	✓	✓	✓	✓	✓

✓ Atividade observada

RESULTADOS

No pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento (Figura 2 e 3), pôde-se observar uma tendência à diminuição na inibição do crescimento e consequente aumento da sobrevivência das linhagens de *S. cerevisiae* (Sodwt, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ, Sod1ΔCat1Δ) em todas as concentrações da rutina, de forma estatisticamente significativa em relação aos resultados do agente estressor peróxido de hidrogênio.

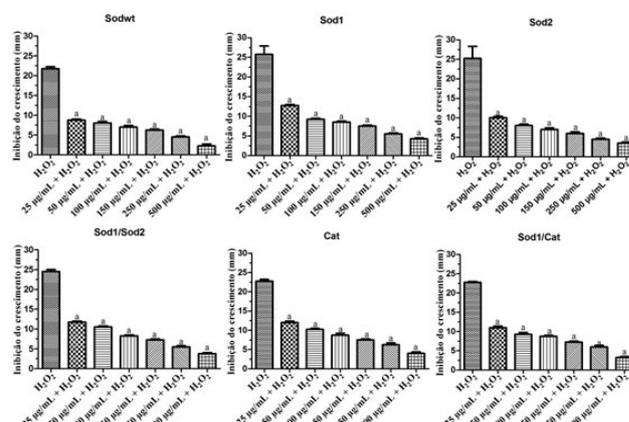


Figura 2. Capacidade antioxidante da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens de *S. cerevisiae* no pré-tratamento. aSignificância em relação ao agente estressor (H₂O₂).

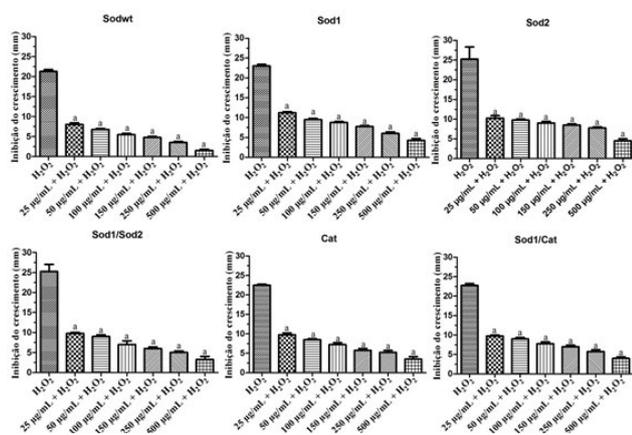


Figura 3. Capacidade antioxidante da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens de *S. cerevisiae* no co-tratamento. aSignificância em relação ao agente estressor (H₂O₂).

No pré-tratamento e co-tratamento (Figura 2 e 3), a rutina apresentou capacidade antioxidante significativa para todas as linhagens de *S. cerevisiae* de maneira dose-dependente, inibindo o efeito oxidativo do peróxido de hidrogênio e permitindo o aumento da sobrevivência das linhagens testadas. A concentração de 500 µg/mL foi a que mais apresentou capacidade protetora ou antioxidante, demonstrando que uma concentração elevada da rutina é necessária para anular os efeitos oxidantes do peróxido de hidrogênio. Como esperado, a linhagem de *S. cerevisiae* selvagem (Sodwt) apresentou um maior nível de sobrevivência no pré-tratamento e co-tratamento, enquanto as linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes foram mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio (Figura 2 e 3), sugerindo a importância da enzima superóxido dismutase na proteção celular contra o stress oxidativo. É importante notar que a capacidade antioxidante da rutina foi observada na linhagem Sodwt bem como nas linhagens deficientes em superóxido dismutase (Sod1Δ, Sod2Δ e Sod1ΔSod2Δ), sugerindo que o seu efeito protetor pode aumentar a atividade da superóxido dismutase, demonstrando o papel chave da rutina na defesa antioxidante celular. A proteção proporcionada pela rutina contra o peróxido de hidrogênio parece ser necessária também para a linhagem mutante Cat1Δ e a duplo mutante Sod1ΔCat1Δ, pois elas foram capazes de adquirir tolerância ao estresse oxidativo com a diminuição da inibição de crescimento no pré-tratamento e co-tratamento (Figura 2 e 3).

No pós-tratamento (Figura 4), as linhagens de *S. cerevisiae* foram primeiramente expostas ao dano oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio, e após três horas foi adicionado a rutina em várias concentrações para verificar o comportamento das linhagens de *S. cerevisiae*. A figura 4 mostra um comportamento parecido com o pré-tratamento e co-tratamento, no qual as linhagens de *S. cerevisiae* na presença da rutina apresentaram

um aumento na taxa de sobrevivência com diminuição na inibição do crescimento em todas as concentrações testadas quando comparadas com os resultados do agente estressor peróxido de hidrogênio. Observou-se também, que para a linhagem de *S. cerevisiae* selvagem (Sodwt), foi a que apresentou a menor taxa de inibição de crescimento quando comparado com as linhagens mutantes. A Figura 4 mostra que as linhagens Sod1Δ, Sod2Δ e Sod1ΔSod2Δ apresentam também um aumento da sobrevivência com diminuição de inibição de crescimento quando pós tratadas com a rutina nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL. Este efeito antioxidante é também evidente para a linhagem mutante Cat1Δ e a linhagem duplo mutante Sod1ΔCat1Δ para todas as concentrações da rutina testadas de forma significativa para os resultados do peróxido de hidrogênio. Foi na concentração de 500 µg/mL que as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram uma menor taxa de inibição quando comparado com a inibição induzida pelo peróxido de hidrogênio (Figura 4).

Os resultados obtidos na avaliação antioxidante da rutina no pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento foram bastante parecidos e podem ser resumidos como demonstrado na tabela 2.

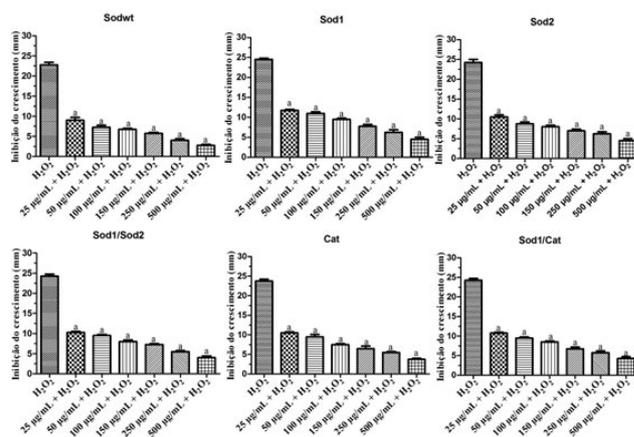


Figura 4. Capacidade antioxidante da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens de *S. cerevisiae* no pós-tratamento. aSignificância em relação ao agente estressor (H₂O₂).

DISCUSSÃO

Em condições fisiológicas normais, danos celulares oxidativos são impedidos pelas defesas antioxidantes que neutralizam as espécies reativas de oxigênio. Mas, em condições de estresse oxidativo, as células são incapazes de lidar adequadamente com espécies reativas de oxigênio, o que pode levar a célula a sofrer algum tipo de dano. Por isso, existe um grande interesse no uso de antioxidantes naturais como potenciais agentes terapêuticos que possam neutralizar as espécies reativas e os consequentes danos oxidativos.

O flavonoide rutina é considerado um potente antioxidante e sua propriedade biológica tem sido extensivamente estudada. Estudos antioxidantes que já foram realizados com a rutina inclui a atividade antioxidante total, poder redutor, atividade quelante do ferro e atividade de limpeza do radical hidroxila e do ânion radical superóxido, método do DPPH• e de peroxidação lipídica utilizando gema de ovo como fonte de lipídeos (Yang *et al.*, 2008; Lue *et al.*, 2010). Mas, caracterizar compostos antioxidantes apenas de maneira *in vitro* fornece apenas uma indicação da capacidade de uma substância de remover radicais livres e não indica o efeito de um antioxidante sobre a sobrevivência celular. Neste trabalho, utilizaram-se linhagens de *S. cerevisiae* para investigar a capacidade antioxidante da rutina em nível celular e os resultados obtidos mostram que a rutina diminui significativamente os danos oxidativos nas linhagens de *S. cerevisiae* nas condições de pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento, demonstrando que a rutina apresenta uma elevada capacidade antioxidante *in vivo*. De acordo com esses resultados, sugere-se que os níveis elevados de peróxido de hidrogênio poderiam ser reduzidos em um pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento com a rutina e que sob as condições de controle, na presença de peróxido de hidrogênio sem a rutina, ambas linhagens proficientes e deficientes em defesas antioxidantes teriam seus crescimentos bastantes inibidos, sendo essa inibição mais elevada para as linhagens mutantes Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ e Sod1ΔCat1Δ do que para a linhagem do tipo selvagem (Sodwt), que contém uma defesa antioxidante.

Um composto pode exercer suas ações antioxidantes *in vivo* de várias maneiras, como por inibição da geração de espécies reativas ou pela eliminação direta de espécies reativas (Costa & Moradas-Ferreira, 2001). Um mecanismo adicional pelo qual um antioxidante pode funcionar *in vivo* é pela ativação do aumento dos níveis de defesas antioxidantes endógenos, através da regulação da expressão de genes de codificação, como a superóxido dismutase e a catalase (Costa & Moradas-Ferreira, 2001). Curiosamente, a capacidade antioxidante da rutina no pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento melhorou a atividade da Sodwt em até 60% quando comparado com os resultados do peróxido de hidrogênio (Figura 1,2 e 3), contribuindo, pelo menos em parte, para os níveis de resistência observados na indução da resposta ao estresse oxidativo. Em comparação com a linhagem Sodwt, as linhagens Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ e Sod1ΔCat1Δ tiveram uma diminuição da inibição do crescimento de até 50% quando tratadas com a rutina no pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento (Figura 1, 2 e 3).

A proteção eficaz da levedura de *S. cerevisiae* pela rutina em uma condição de estresse oxidativo (co-tratamento) já foi relatado em um trabalho anterior feito por Soares *et al.* (2003), que verificou a capacidade antioxidante através da inibição de dano oxidativo induzido pelo agente estressor apomorfina utilizando apenas um tipo de linhagem de *S. cerevisiae*.

Em conclusão, nosso resultado antioxidante *in vivo* demonstra a importância do flavonoide rutina na proteção das linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em defesas enzimáticas antioxidantes, quando um estresse oxidativo é induzido. Os resultados da capacidade antioxidante *in vitro* encontrado na literatura científica foram confirmados, pelo menos em parte, com os resultados obtidos utilizando linhagens mutantes de *S. cerevisiae*, sugerindo que a utilização deste simples modelo biológico pode ser altamente relevante para comprovação da capacidade antioxidante *in vivo* de antioxidantes naturais que possuem grande interesse farmacológico.

ABSTRACT

Cellular antioxidant capacity of rutin against the oxidative damage induced in mutant strains of Saccharomyces cerevisiae

Rutin is a type of flavonoid found in plants and of great pharmacological interest since many properties have been attributed rutin, including antiallergic, antiinflammatory, antitumor and antioxidant primarily. The aim of this study was to provide greater insight into the cellular antioxidant capacity of rutin using strains of *S. cerevisiae* proficient and deficient in antioxidant defenses. The strains of *S. cerevisiae* (Sodwt, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ, Sod1ΔCat1Δ) were exposed to various concentrations of rutin in three different conditions of treatment (pre-treatment, co-treatment and post-treatment) and thus determine whether the rutin inhibits the oxidative effect of hydrogen peroxide, allowing increased survival of the strains tested. The results show that rutin significantly reduces oxidative damage in strains of *S. cerevisiae* under the conditions of pre-treatment, co-treatment and post-treatment, demonstrating that rutin has a high cellular antioxidant capacity, being important in protection to induced oxidative stress.

Keywords: Rutin. *S. cerevisiae*. antioxidant capacity.

REFERÊNCIA

Caillet S, Yu H, Lessard S, Lamoureux G, Ajdukovic D, Lacroix M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. Food Chem. 2007;100(2):542-52.

Calabrò ML, Tommasini S, Donato P, Stancanelli R, Raneri D, Catania S, *et al.* The rutin/β-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. J Pharm Biomed Anal. 2005;36(5):1019-27.

Costa V, Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights

into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med.* 2001;22(4-5):217-46.

Domitrovic R, Jakovac H, Vasiljev Marchesi V, Vladimir-Knezevic S, Cvijanovic O, Tadic Z, *et al.* Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(10):1260-70.

Frassinetti S, Della Croce CM, Caltavuturo L, Longo V. Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* 2012;135(3):2029-34.

Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia.* 2002;73(7-8):557-63.

Jiang P, Burczynski F, Campbell C, Pierce G, Austria JA, Briggs CJ. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Res Int.* 2007;40(3):356-64.

Lue B-M, Nielsen NS, Jacobsen C, Hellgren L, Guo Z, Xu X. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. *Food Chem.* 2010;123(2):221-30.

Mahmoud AM. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64(7-8):783-9.

Moon J-K, Shibamoto T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J Agric Food Chem.* 2009;57(5):1655-66.

Roehrs R, Freitas DJ, Masuda A, Henriques JP, Guecheva T, Ramos A-LP, *et al.* Effect of vitamin A treatment on superoxide dismutase-deficient yeast strains. *Arch Microbiol.* 2010;192(3):221-8.

Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2005;41:95-100.

Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 2004;36(7):838-49.

Wu MJ, O'Doherty PJ, Fernandez HR, Lyons V, Rogers PJ, Dawes IW, *et al.* An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2011;11(4):379-87.

Yang J, Guo J, Yuan J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci Technol.* 2008;41(6):1060-6.