

## EFEITO DO ADITIVO ALIMENTAR HIDROXIANISOL BUTILADO (BHA) SOBRE A GLICONEOGÊNESE NO FÍGADO DE RATO EM PERFUSÃO ISOLADA

Mariana Ferreira Sapateiro (PIBIC//FA/UEM), Vanessa de Oliveira Pateis, Lívia Bracht (Orientador), e-mail: lbracht@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

### Ciências Biológicas, Bioquímica

**Palavras-chave:** antioxidantes, metabolismo hepático, produção hepática de glicose.

#### Resumo:

Sabe-se que na alimentação atual é comum a presença de produtos industrializados que possuem em sua composição algum tipo de aditivo alimentar a fim de modificar as características do alimento. Um aditivo frequentemente utilizado é o antioxidante sintético hidroxianisol butilado (BHA), um composto que pode interferir com o funcionamento mitocondrial. Assim, levando-se em consideração que substâncias que afetam o funcionamento mitocondrial também podem interferir com as vias metabólicas hepáticas, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do BHA sobre a gliconeogênese e a ureagênese. Para isso foram realizados experimentos de perfusão de fígado isolado de rato, utilizando-se três substratos: L-lactato, D-frutose e L-alanina. Os resultados obtidos mostram que, com o substrato L-lactato, o BHA provocou uma redução expressiva da produção de glicose e consumo de oxigênio e aumento da produção de piruvato. Com o uso da frutose como substrato, foram observadas reduções no consumo de oxigênio e na produção de glicose, mas aumento da produção de lactato e piruvato. O metabolismo da L-alanina foi fortemente afetado pela infusão do BHA, observando-se redução da gliconeogênese, aumento da liberação de amônia e diminuição da produção de ureia. De modo geral, o BHA inibiu a gliconeogênese a partir dos três substratos diferentes e o processo de detoxificação da amônia; a frutólise, porém, foi estimulada na presença de BHA. As modificações nos fluxos metabólicos podem ser, de maneira geral, atribuíveis aos efeitos do BHA sobre a cadeia respiratória mitocondrial.

#### Introdução

Entre os aditivos alimentares podemos citar os antioxidantes que possuem a função de retardar o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos. O hidroxianisol butilado (BHA) e o seu análogo o hidroxitolueno butilado (BHT) estão entre os antioxidantes sintéticos mais comumente utilizados em alimentos processados industrialmente. Apesar de estudos demonstrarem a

segurança desses compostos para uso em humanos, possuindo baixo risco de causar câncer [1], existem inúmeras pesquisas que comprovam que o BHA e o BHT podem interferir com o metabolismo celular. Por exemplo, tanto BHA quanto BHT apresentam citotoxicidade de maneira depende da concentração, na faixa de 100 a 750  $\mu\text{M}$ . Em mitocôndrias isoladas, ambos os aditivos inibiram o controle respiratório por estimularem o estado 4 da respiração, agindo, portanto, como desacopladores. Os dois dissiparam o potencial através da membrana mitocondrial e causaram a liberação de cálcio [2;3;4]. É interessante saber se BHA é capaz de interagir com as mitocôndrias na célula intacta da mesma maneira que interage com mitocôndrias isoladas. Este foi o propósito do presente trabalho e para atingir esse objetivo foi utilizado o sistema experimental de fígado de rato perfundido.

### Material e métodos

**Animais:** Ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 220g, foram alimentados com ração balanceada (Nuvilab®), tiveram livre acesso a água e foram mantidos sob ciclo claro-escuro regulado. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (protocolo nº 4507290915).

**Procedimento de perfusão de fígado isolado de rato:** Para remoção cirúrgica do fígado, os ratos foram previamente anestesiados com tiopental (50mg/kg) mais lidocaína (10 mg/Kg) e submetidos à remoção cirúrgica do fígado, que foi posicionado em uma câmara de acrílico para o monitoramento em sistema isolado. O líquido de perfusão utilizado foi o Tampão Krebs-Henseleit/bicarbonato com pH 7,4 e albumina na concentração de 25 mg%, saturado com mistura de oxigênio:dióxido de carbono (95:5%). Os substratos L-lactato, D-frutose e L-alanina foram dissolvidos diretamente no tampão. O BHA foi dissolvido em DMSO e adicionado ao líquido de perfusão, em concentrações finais de 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , 200 $\mu\text{M}$ , 500 $\mu\text{M}$  e 750 $\mu\text{M}$ .

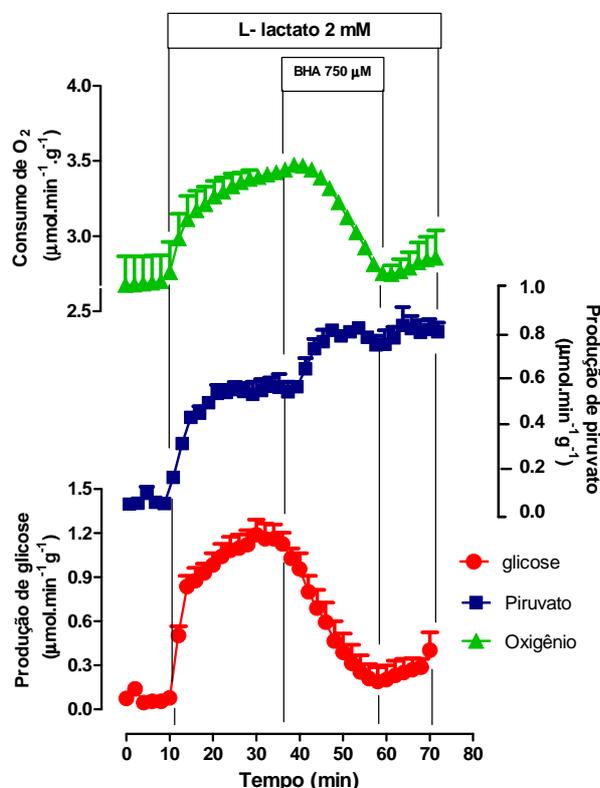
**Dosagens enzimáticas:** Amostras do perfusado efluente foram coletadas a cada dois minutos em tubos de ensaio para posterior quantificação por meio de dosagens enzimáticas dos metabólitos: glicose, piruvato, lactato, amônia e ureia [5]. O consumo de oxigênio foi monitorado por polarografia.

**Análises estatísticas:** ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls para comparação das médias ( $p < 0,05$ ).

### Resultados e Discussão

A figura 1 representa a resposta obtida no fígado perfundido com BHA na concentração de 750  $\mu\text{M}$  com o substrato L-lactato e foi utilizada como ilustrativa do protocolo experimental utilizado, bem como os resultados obtidos com os demais substratos e concentrações de BHA. Pode-se notar nesta figura que a infusão de BHA causou uma expressiva inibição no consumo de oxigênio e na produção de glicose, a partir de lactato. A produção de piruvato, todavia, foi apenas levemente aumentada. De maneira geral, o efeito inibitório sobre o consumo de oxigênio e a produção de

glicose foi observado também com os outros substratos (D-frutose e L-alanina).



**Figura 1:** Efeitos do BHA (750 µM) sobre os fluxos metabólicos resultantes da infusão de L-lactato (2mM) em ratos Wistar submetidos a jejum prévio de 18 horas. Cada ponto representa um n=3 e ± erro padrão da média (EPM).

Particularmente em relação à gliconeogênese a partir de L-lactato, o efeito mais forte do BHA foi sobre a produção de glicose, uma vez que a inibição foi evidenciada a partir da concentração de 100 µM e cálculos de interpolação numérica demonstram que 50% de inibição sobre este parâmetro pode ser esperada com uma concentração de BHA igual a 279,6 µM. A inibição sobre o consumo de oxigênio também foi marcante, mas teve início a partir da concentração de 200 µM. A produção de piruvato a partir de L-lactato foi levemente estimulada pelo BHA, também a partir da concentração de 200 µM. Quando a frutose foi o substrato, o BHA provocou uma inibição da produção de glicose a partir de 100 µM e 50% de inibição pode ser esperada com 460,5 µM. Houve também inibição do consumo de oxigênio, que foi mais acentuada em altas concentrações (500 e 750 µM). A produção de piruvato e de lactato foi estimulada pelo BHA, sendo que o estímulo sobre a produção de lactato foi claramente dependente da concentração de BHA. A infusão de alanina como substrato permite a avaliação tanto do metabolismo de carbono quanto do metabolismo de nitrogênio. O BHA inibiu a produção de glicose a partir de alanina de maneira dependente da concentração, iniciando em 50 µM. Uma inibição de 50% sobre este parâmetro pode ser esperada com uma concentração de

BHA igual a 233,3  $\mu\text{M}$ . A produção de lactato e piruvato foi apenas levemente estimulada pelo BHA. O consumo de oxigênio foi inibido, com uma cinética de inibição similar àquela causada pelo BHA com os substratos L-lactato e frutose. Além disso, o BHA estimulou a produção de amônia e inibiu a produção de ureia nas concentrações de 500 e 750  $\mu\text{M}$ .

Os resultados mostram que o BHA atua no metabolismo do fígado e é capaz de afetar várias vias metabólicas que são dependentes ou ligadas ao metabolismo energético. As observações mais importantes foram: a) inibição do consumo de oxigênio; b) inibição da gliconeogênese a partir de três substratos diferentes; c) estimulação da frutólise; d) prejuízo na detoxificação da amônia. As modificações nos fluxos metabólicos podem ser, de maneira geral, atribuíveis aos efeitos do BHA sobre a cadeia respiratória mitocondrial.

### Conclusões

O presente trabalho, portanto, esclarece aspectos importantes sobre os efeitos metabólicos do BHA no fígado. Embora não existam relatos de casos de intoxicação pelo BHA, os resultados do presente trabalho fornecem bases para se prever que os principais efeitos de intoxicação por este aditivo seriam hipoglicemia devido a uma inibição da gliconeogênese, intoxicação devido à incapacidade de metabolizar a amônia e dano celular causado pela incapacidade de se manter a homeostase por falta de ATP. Novas investigações são ainda essenciais para esclarecer totalmente seu mecanismo de ação, seus efeitos sobre processos metabólicos e as implicações clínicas destes achados.

### Agradecimentos

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

### Referências

- [1] WILLIAMS GM, IATROPOULUS MJ, WHYSNER J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidante in food additives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1027-1038, 1999.
- [2] THOMPSON D, MOLDEUS P. Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 2201-2207, 1988.
- [3] FERREIRA J. Effect of butylated hydroxyanisole on electron transport in rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 677-684, 1990.
- [4] FUSI F, SGARAGLI G, MURPHY MP. Interaction of butylated hydroxyanisole with mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, p. 1203-1208, 1992.
- [5] BERGMAYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1974.