



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

Avaliação do estresse oxidativo causado por aspartame em fibroblastos dérmicos humanos.

Hanna Santana de Almeida

BRASÍLIA

2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR
ASPARTAME EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS.

Hanna Santana de Almeida

Monografia apresentada ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília como requisito
para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

Co-orientadora: Dra Natália Cardoso Santos

BRASÍLIA

2017

HANNA SANTANA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR ASPARTAME EM
FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS.

Monografia apresentada ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília como requisito
para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Brasília, 7 de dezembro de 2017.

Comissão Avaliadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin
Universidade de Brasília
Orientadora

Mcs Cinthia Gabriel Meireles
Universidade de Brasília

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me abençoar com saúde e força para realizar meus sonhos.

Agradeço aos meus pais por me mostrarem que o melhor caminho a seguir é a educação, esforço e sabedoria. Aos meus tios Valdelice e José Carlos Vieira e meus primos Cássio e João Vitor Vieira que sempre me apoiaram durante a graduação.

À minha orientadora Dr^a Maria de Fátima Borin pela paciência e carinho ao me passar conhecimento e por ter confiado em mim para realização deste trabalho. Em todos os momentos que me senti angustiada eu tinha nela uma pessoa para conversar e me apoiar.

Aos meus colegas de laboratório Daniela Gurgel, Michelly Oliveira, Rafael Lucas, Laíza Magalhães, Palloma Soares por me auxiliarem sempre que possível. À minha co-orientadora Natália Cardoso pelo carinho e paciência.

A todos os alunos e professores do laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Saúde (UnB) em especial ao Henrique Rodrigues e estagiários técnicos.

Às minhas amigas Anyk Martins, Bruna Mota, Caroline Rodrigues, Carolina Assunção, Dawane Silva, Dayanne Feitosa, Gabriela Miranda, Jéssica Larissa, Juliana Farias, Joyce Farias, Karoline Pereira e meus colegas da V Turma de farmacêuticos generalistas da universidade de Brasília, por me proporcionarem momentos únicos e muito especiais que me ajudaram a ter força para as dificuldades enfrentadas.

Aos meus avós, *in memoriam*, por sempre acreditarem no meu potencial e serem as pessoas que mais me incentivaram a me tornar uma farmacêutica.

Resumo

O aspartame é um adoçante artificial, dipeptídeo sintético, muito utilizado em bebidas, como refrigerantes e sucos, assim como em alimentos sólidos. Seu uso passou a ser mais difundido quando produtos *lights* e *diets* se tornaram mais populares em virtude da sacarose ter sido apontada como a responsável por problemas metabólicos como diabetes e sobrepeso, comorbidades que são reflexos do estilo de vida atual. A dose segura para o consumo do aspartame foi definida em 1981, nos EUA, como 40 mg/kg de massa corporal por dia, entendida como a dose segura para os sistemas orgânicos. Contudo, os dados presentes na literatura sobre a dose segura de aspartame são controversos, e muitos efeitos deletérios são mostrados em modelos *in vivo* e *in vitro* em vários tecidos e órgãos. Os estudos sugerem que os metabólitos do aspartame, metanol, ácido aspártico e fenilalanina, interferem no equilíbrio redox do organismo, induzindo a um estado de estresse oxidativo, e causam danos a diferentes órgãos e tecidos, sendo que o metanol é apontado como o mais tóxico dentre eles. O objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo causado pelo aspartame e pelo metanol em cultura de fibroblastos dérmicos humanos. Para isto, foi avaliada a viabilidade celular de fibroblastos tratados com aspartame nas concentrações de 0,395 a 12,64 µg/mL e com metanol nas concentrações de 0,5 a 16% pelo método de MTT. Após determinação das concentrações de 1% de metanol e 0,79 µg/mL de aspartame para tratamento das células por 48 h, a atividade de superóxido dismutase, catalase e o nível de peroxidação lipídica das células tratadas foram avaliados. Os resultados mostraram que o aspartame, nas concentrações de 1,58 a 12,64 µg/mL, e o metanol, na concentração de 16%, causaram uma diminuição maior que 30% na viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos, após tratamento por 48 h. As células tratadas com 1% de metanol ou 0,79 µg/mL de aspartame apresentaram uma tendência de diminuição na atividade da catalase e de aumento nos produtos da peroxidação lipídica, mas não houve variação na atividade de superóxido dismutase nas células.

Palavras-Chave: Aspartame, adoçante artificial, estresse oxidativo, fibroblastos dérmicos humanos.

ABSTRACT

Aspartame is a synthetic dipeptide sweetener widely used in beverages, such as soft drinks and juices, as well as in solid foods. Its use was widespread after lights and diets products use became more popular due to sucrose has been named as responsible for metabolic problems, such as diabetes and overweight, comorbidities that are repercussion of the current lifestyle. The safe dose for aspartame consumption was defined in 1981 in the USA as 40 mg/kg/day, considered the safe dose for organic systems. However, data available in the literature on the safe dose of aspartame are controversial, and many deleterious effects are shown in *in vivo* and *in vitro* models in various tissues and organs. Studies suggest that aspartame metabolites, methanol, aspartic acid and phenylalanine, interfere with the redox balance of the body, inducing a state of oxidative stress, and cause damage to different organs and tissues, the most toxic being methanol. The objective of this work was to evaluate the oxidative stress caused by aspartame and methanol in human dermal fibroblasts. For this, cell viability of aspartame-treated fibroblasts at concentrations of 0,395 µg/mL to 12,64 µg/mL and methanol at concentrations of 0.5 to 16% by the MTT method was evaluated. After determination of the concentrations of 1% methanol and 0.79 µg/mL aspartame for 48 h treatment of cells, the superoxide dismutase activity, catalase activity and lipid peroxidation levels were evaluated on treated cells. Results show aspartame and methanol are cytotoxic at the concentrations of 1.58 to 12.64 µg/mL and 16%, respectively. Cells treated with 1% methanol or 0.79 µg/mL aspartame showed a tendency to decrease catalase activity and increase lipid peroxidation levels, but there was no change in superoxide dismutase activity.

Keywords: Aspartame, artificial sweeteners, oxidative stress, human dermal fibroblasts.

Sumário

Introdução	9
Objetivo Geral	13
Objetivos específicos.....	13
Metodologia	14
Cultura de fibroblastos dérmicos humano.....	14
Tratamentos em fibroblastos dérmicos humanos	14
Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos tratados com metanol e aspartame	15
Avaliação da atividade da enzima catalase	15
Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.....	16
Ensaio da avaliação da peroxidação lipídica	16
Análise estatística.....	17
RESULTADOS	18
Viabilidade Celular	18
Atividade da enzima catalase.....	19
Atividade da enzima superóxido dismutase	20
Ensaio de peroxidação lipídica	21
Discussão.....	23
Conclusão	26
Referências Bibliográficas	27

Lista de Figuras

Figura 1. Éster metílico da L- α -aspartil-L-fenilalanina (FASCIANI et al., 2014).....	10
Figura 2. Representação esquemática das três principais espécies reativas de oxigênio (ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil) e as vias enzimáticas que as produzem (DI DALMAZI et al., 2016).....	12
Figura 3. Ensaio de viabilidade celular por MTT.	19
Figura 4. Avaliação da atividade da enzima catalase.	20
Figura 5. Avaliação da enzima superóxido dismutase.	21
Figura 6. Nível de peroxidação lipídica das células.....	22

Introdução

Desde os dias em que as doenças crônicas afligem nossa sociedade, soluções são investigadas e diversos fatores têm sido estudados e relacionados como agravantes. A sacarose vem sendo apontada como responsável pelo aumento do número de casos de obesidade e diabetes, ao mesmo tempo em que o novo estilo de vida da maioria das pessoas incentiva o consumo de alimentos industrializados e cada vez mais processados (YANG, 2010).

O consumo de bebidas adoçadas com açúcar tem sido, há vários anos, associado a problemas de saúde, como diabetes tipo 2. Entre os anos de 1962 e 2000 nos EUA, o consumo de adoçantes artificiais teve um aumento significativo, tendo este consumo aumentado tanto entre adultos quanto entre crianças com idade entre 2 e 17 anos, e esse aumento foi representado, principalmente, pelo maior consumo de bebidas *diets* (SWITHERS, 2013). Em paralelo, houve um número de casos de obesidade nesta mesma época (SWITHERS, 2013).

O ganho de peso associado ao uso de adoçantes parece contraditório, mas estudos prévios sugerem que animais tratados com adoçantes posteriormente consumiam mais bebidas de sabor doce, quando comparados ao grupo controle, como foi reportado por Davidson e colaboradores (2008). Esse resultado levantou a hipótese de que o consumo de adoçantes reduzia a capacidade de percepção do sabor doce na sinalização pós-digestiva calórica (SWITHERS; DAVIDSON, 2008).

Quando se trata de adoçantes e ganho de peso as evidências mostram que os adoçantes não ativam as vias de recompensa da mesma forma que a sacarose e outros açúcares naturais, a falta da satisfação completa incentiva a busca por mais comida, e por serem doces aumentam a vontade de ingerir açúcar, ou mais alimentos doces, pois a exposição repetida treina a preferência por sabor (YANG, 2010).

. Em 1965, James Schlatter descobriu o aspartame, éster metílico da L- α -

aspartil-L-fenilalanina (Figura 1), enquanto tentava sintetizar um fármaco para úlcera (YANG, 2010). O aspartame é um edulcorante de baixo valor calórico, possui aproximadamente 4 calorias por grama. A ingestão diária recomendada (IDA) é de 40 mg/kg de massa corpórea e seu poder adoçante é 160 a 200 vezes maior que o da sacarose (WHO / JECFA).

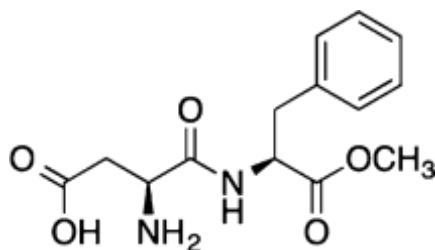


Figura 1. Éster metílico da L- α -aspartil-L-fenilalanina (FASCIANI et al., 2014).

Diferente dos outros adoçantes, que em sua maioria são excretados inalterados, o aspartame sofre metabolização no organismo após a ingestão, e os produtos resultantes da metabolização do aspartame no organismo são o metanol (10%), o ácido aspártico (40%) e a fenilalanina (50%) (YANG, 2010).

O objetivo de se conseguir a perda de peso ao se consumir produtos adoçados com aspartame tem falhado, além desta ingestão estar sendo associada a problemas metabólicos, como resistência à insulina e tolerância à glicose (GARDENER et al., 2012). O sabor doce sentido pelas papilas gustativas é uma sinalização para liberação de insulina pelo pâncreas indicando que açúcar (energia) precisa ser levado para dentro das células. O sabor doce proveniente do aspartame tem o poder de sinalizar para a liberação de insulina, mas como este não é um açúcar a continuação fisiológica não ocorre (IMAMURA et al., 2015). Indivíduos que consomem regularmente aspartame podem se tornar resistentes à insulina devido a este evento (SWITHERS, 2013).

SANTOS et al. (2017), em uma revisão sistemática e metanálise feita com resultados obtidos de vinte e nove artigos, não observaram variações nos níveis séricos de glicose ou insulina dos grupos que consumiram aspartame comparados aos

grupos controle. Níveis de colesterol total, triglicerídeos ou massa corpórea também não foram alterados com o consumo de aspartame.

Os produtos da metabolização do aspartame são sugeridos na literatura como os responsáveis pelos seus efeitos deletérios aos tecidos. GUL et al., 2017, sugerem em seu trabalho que um dos metabólitos do aspartame, a L- fenilalanina, tem a capacidade de inibir a enzima fosfatase alcalina intestinal, comprometendo a atividade desta e favorecendo o surgimento de síndrome metabólica em ratos que consumiam uma dieta rica em gorduras e bebida adoçada com aspartame (34 mg/kg) por 18 semanas..

O metanol, outro produto do metabolismo do aspartame, tem capacidade de alterar o estado redox dos tecidos, além de alterar também algumas funções celulares e enzimáticas. Um estudo com ratos albinos Wistar avaliou as potenciais alterações causadas pelos produtos de metabolização do aspartame no equilíbrio oxidativo, após tratamento com 40 mg de aspartame/kg de massa corpórea/dia, durante 90 dias. Após esse período, os autores avaliaram nos animais os níveis de corticosteroide, peroxidação lipídica, atividade antioxidante, óxido nítrico, glutathione reduzida e citocinas no plasma (CHOUDHARY; SHEELA DEVI, 2015). Os resultados mostraram uma diminuição significativa na proteção antioxidante enzimática e não enzimática nos animais tratados (CHOUDHARY; SHEELA DEVI, 2015).

Em outro estudo, camundongos foram tratados com aspartame na dose diária recomendada e foi analisado o efeito deste consumo na via da transulfuração e de seu produto, a glutathione, um antioxidante endógeno importante. Os resultados mostraram que os animais que consumiram aspartame tiveram prejuízo na produção de glutathione pelos efeitos nesta via e, conseqüentemente, lesão hepática (FINAMOR et al., 2017).

Em relação ao dano cerebral, IYYASWAMY e RATHINASAMY, 2017, relataram um declínio na atividade da enzima creatina quinase (CK) em várias regiões cerebrais em ratos tratados com aspartame. Isto pode ser atribuído às modificações oxidativas causadas por espécies reativas de oxigênio, cuja produção

é induzida pelo consumo de aspartame (KOUFEN; STARK, 2000).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) já são amplamente estudadas e, mesmo fazendo parte de processos fisiológicos importantes, como, por exemplo, síntese e proliferação de hormônio tireoidiano, nos processos de sinalização celular como segundo mensageiro, podem induzir dano aos tecidos, inflamação e envelhecimento (DI DALMAZI et al., 2016). O processo de envelhecimento intrínseco envolve eventos desencadeado por ROS e sessados por antioxidantes endógenos ou exógenos (KAMMEYER; LUITEN, 2015). A Figura 2 mostra as enzimas que participam da nossa defesa primária contra as espécies reativas de oxigênio.

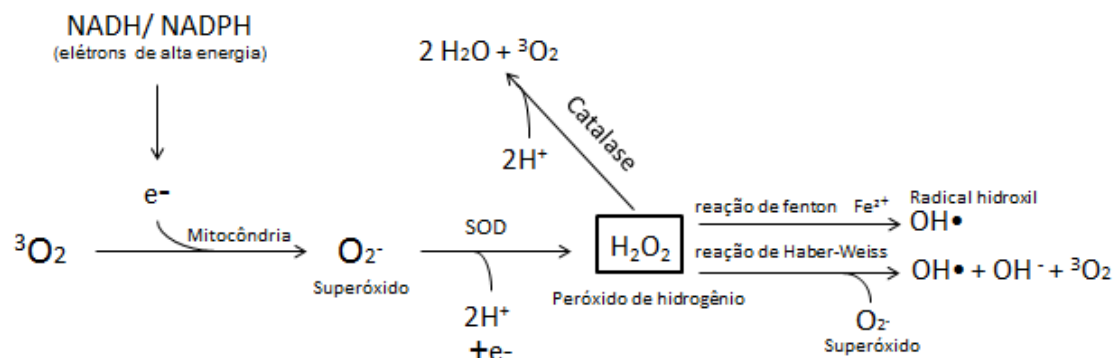


Figura 2. Representação esquemática das três principais espécies reativas de oxigênio (ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil) e as vias enzimáticas que as produzem (DI DALMAZI et al., 2016).

Pouco se sabe, porém, sobre o efeito do aspartame e de seus metabólitos no processo de envelhecimento da pele. Apesar de alguns estudos terem demonstrado a relação entre consumo de aspartame e o estresse oxidativo, não há dados na literatura que demonstrem que o consumo deste adoçante influencie no equilíbrio redox da pele. Assim, considerando que o metanol, produto do metabolismo do aspartame, está intimamente ligado ao estresse oxidativo das células, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do aspartame e do metanol, no estresse oxidativo em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

Objetivo Geral

Avaliação da indução de estresse oxidativo em células de fibroblastos dérmicos humanos tratados com aspartame ou metanol.

Objetivos específicos

Avaliação da atividade da enzima catalase nas células tratadas com metanol ou aspartame;

Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase nas células tratadas com metanol ou aspartame;

Avaliação do nível de peroxidação lipídica das células tratadas com metanol ou aspartame.

Metodologia

Cultura de fibroblastos dérmicos humano

Fibroblastos dérmicos humanos (CCDK1059SK – Banco de Células do Rio de Janeiro) são fibroblastos humanos com propriedades aderentes proveniente de cultura primária obtidas da pele da mama de mulher caucasiana, durante um procedimento de biópsia. Como foram obtidas em cultura primária estas células entram em senescência aproximadamente após a passagem 35 sendo este um fator limitante.

Fibroblastos dérmicos humanos (CCDK1059SK) foram cultivados em placas para cultura de células 100 x 20 mm, com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As placas com as células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 95% e temperatura de 37°C.

Tratamentos em fibroblastos dérmicos humanos

Foram preparadas duas soluções estoque de meio DMEM, sendo uma contendo 16% de metanol e outra contendo uma quantidade de aspartame que fosse equivalente à 100% da quantidade de metanol liberada por sua metabolização (126,4 µg). A partir das soluções estoque foram preparadas curvas de concentrações decrescentes (metanol: 16%, 8%, 4%, 2%, 1% e 0,5%; e aspartame: 12,64 µg/mL, 6,32 µg/mL, 3,16 µg/mL, 1,58 µg/mL, 0,79 µg/mL, 0,395 µg/mL). Para o ensaio de viabilidade celular, as células foram tratadas por 24 ou 48 horas com aspartame ou metanol, e após resultado do ensaio de viabilidade celular, foram selecionadas as concentrações de aspartame (0,79 µg/mL) e metanol (1%) e o tempo de tratamento (48 h) para os demais ensaios.

Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos tratados com metanol e aspartame

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan [E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan] (MOSMANN, 1983). As células CCDK1059SK foram inoculadas na concentração de 1×10^5 células em cada poço de uma placa de 96 poços. Os tratamentos das células foram feitos por adição de diferentes concentrações de metanol e aspartame diluídos em meio DMEM, e as células tratadas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 95% e temperatura de 37°C. Após 24 ou 48 h de incubação, o meio com tratamento foi removido e foram adicionados 100 µL de DMEM e 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas e, posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução ácida de isopropanol (HCl 0,04M em isopropanol) para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 570 nm.

Avaliação da atividade da enzima catalase

A enzima catalase catalisa a reação de conversão de H₂O₂ em H₂O e oxigênio molecular. O método baseia-se na leitura, em modo cinético, da absorbância de uma solução de H₂O₂ na presença das amostras. O consumo de H₂O₂ pela enzima presente nas amostras promove um decaimento na absorbância.

Fibroblastos dérmicos humanos foram cultivados em placas de 6 poços por 48 horas e, após esse período, foram recolhidos e submetidos a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para obtenção do lisado celular. Uma

solução 10 mM de H₂O₂ foi preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7. A amostra foi adicionada à solução de peróxido de hidrogênio no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 2 minutos, no comprimento de onda de 240 nm. A concentração de proteínas das amostras dos lisados celulares foi medida pelo ensaio descrito por LOWRY et al., 1951 para a normalização dos resultados.

Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por converter o ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. A avaliação da enzima foi realizada pelo método sistema xantina/xantina oxidase como fonte de superóxido. A redução do reagente *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) com a consequente formação de cristais de formazan foi utilizada para medir a formação de superóxido. A enzima SOD compete com o NBT pelo superóxido e, desta forma, a quantidade de SOD presente na amostra é medida pela porcentagem de inibição da redução do NBT.

Uma solução de NBT na concentração de 60 µM e xantina na concentração de 100 µM foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo 0,1 mM de EDTA. Uma amostra do lisado celular foi adicionada a 170 µL da solução de NBT 60 µM e xantina 100 µM. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços a enzima xantina oxidase (0,075 U/mL) foi adicionada às amostras no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 5 minutos, no comprimento de onda de 560 nm. A concentração de proteínas das amostras do lisado celular foi medida pelo ensaio descrito por LOWRY et al., 1951 para normalização dos resultados.

Ensaio da avaliação da peroxidação lipídica

O ensaio de peroxidação lipídica em fibroblastos foi feito pelo método descrito por OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979. Resumidamente, o malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, forma um complexo com o ácido tiobarbitúrico cuja fluorescência pode ser medida. As células foram tratadas como descrito anteriormente. Em seguida, 1 mL de KCl 1,15% foi adicionado ao meio e as células foram recolhidas e submetidas a ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 0°C para obtenção do lisado celular. Ao lisado celular foram adicionados 100 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS), 750 μL de ácido acético 20%, 750 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA), e o volume de reação foi completado para 4 mL com água deionizada. O meio reacional foi incubado por 1 h em estufa a 95°C e, após este período, a reação foi resfriada em banho de água gelada. A fluorescência do sobrenadante foi medida em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação de 520 nm e emissão de 550 nm. O malondialdeído (Sigma-Aldrich) foi utilizado na construção da curva padrão e os resultados foram expressos como concentração (nmol) de MDA por mg de proteína.

A concentração de proteínas das amostras do lisado celular foi medida pelo ensaio descrito por LOWRY et al., 1951 para normalização dos resultados.

Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados estatisticamente por aplicação do teste de variância *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Dunnett para múltiplas comparações.

RESULTADOS

Viabilidade Celular

A Figura 3 mostra o efeito do aspartame e do metanol na viabilidade de células CCD1059SK. O resultado mostra que tratamentos nas doses 4%, 8% e 16% de metanol e 0,385 µg/mL, 0,79 µg/mL, 1,58 µg/mL, 3,16 µg/mL, 6,32 µg/mL e 12,64 µg/mL de aspartame por 24 horas (Figuras 2A e 2B) reduziram a viabilidade quando comparadas com o controle, porém somente nos tratamentos com concentrações de 16% de metanol e 3,16 µg/mL, 6,32 µg/mL e 12,64 µg/mL de aspartame foi observada a diminuição de mais que 30% na viabilidade celular. Tratamentos de 16% de metanol e 0,385 µg/mL, 0,79 µg/mL, 1,58 µg/mL, 3,16 µg/mL, 6,32 µg/mL e 12,64 µg/mL de aspartame por 48 horas (Figuras 2C e 2D) reduziram a viabilidade quando comparadas com o controle ($p < 0,05$). Para este tempo de tratamento, concentrações acima de 1,58 µg/mL de aspartame e 16% de metanol foram consideradas tóxicas para as células, pois a viabilidade celular ficou abaixo de 70% em relação ao controle. Para os próximos ensaios foram selecionadas a concentração de 0,79 µg/mL de aspartame e 1% de metanol por permitirem a manutenção de pelo menos 70% de viabilidade celular.

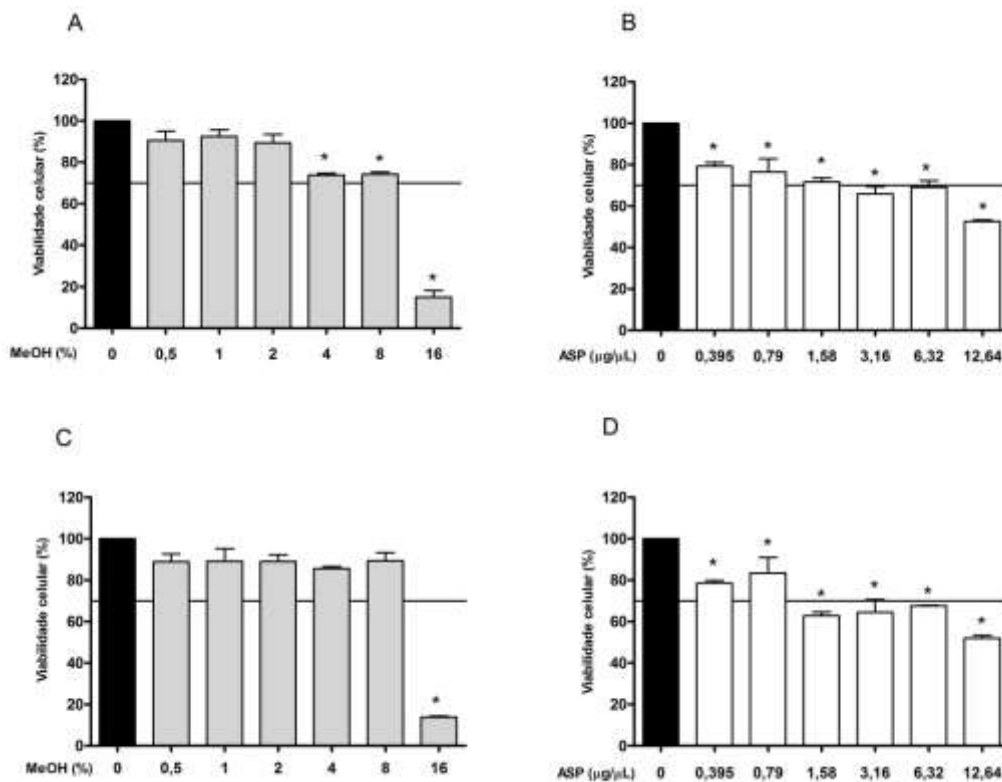


Figura 3. Ensaio de viabilidade celular por MTT.

CCD1059SK tratados com diferentes concentrações de metanol (A e C) e aspartame (B e D). As células, 5×10^3 , foram incubadas em microplaca de 96 poços e tratadas por 24 horas (A e B) e 48 horas (C e D). As células foram incubadas com solução de MTT por 4 horas. Os valores estão expressos como médias \pm SEM da porcentagem de viabilidade celular, $n=3$. Os tratamentos foram comparados ao controle, células não tratadas (viabilidade = 100%). * Diferença significativa ($p < 0,05$). A linha representa o limite de diminuição de viabilidade para ser considerado não tóxico.

Atividade da enzima catalase

Em um ensaio que avaliou a atividade da enzima catalase das células após tratamento com metanol ou aspartame, os resultados, apresentados na Figura 4, sugerem uma tendência de diminuição na atividade da enzima após o tratamento com metanol ou aspartame, mas estes não mostraram diferença significativa quando comparados com o controle.

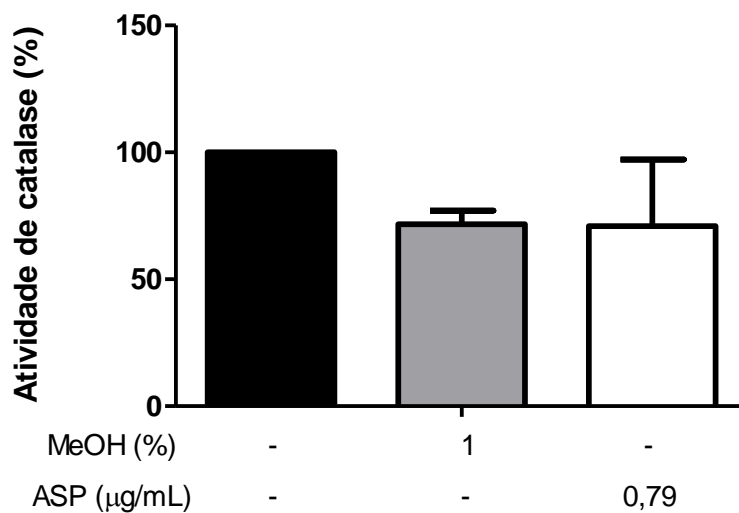


Figura 4. Avaliação da atividade da enzima catalase.

Células, 3×10^5 , foram incubadas em um placa de 6 poços e tratadas por 48 horas com metanol ou aspartame. Os resultados foram expressos em média \pm SEM de 3 ensaios distintos e foram comparados com o controle (células não tratadas).

Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade de SOD das células tratadas com metanol (1%) e aspartame (0,79 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliada e os resultados, Figura 5, não apresentaram variação com relação ao controle.

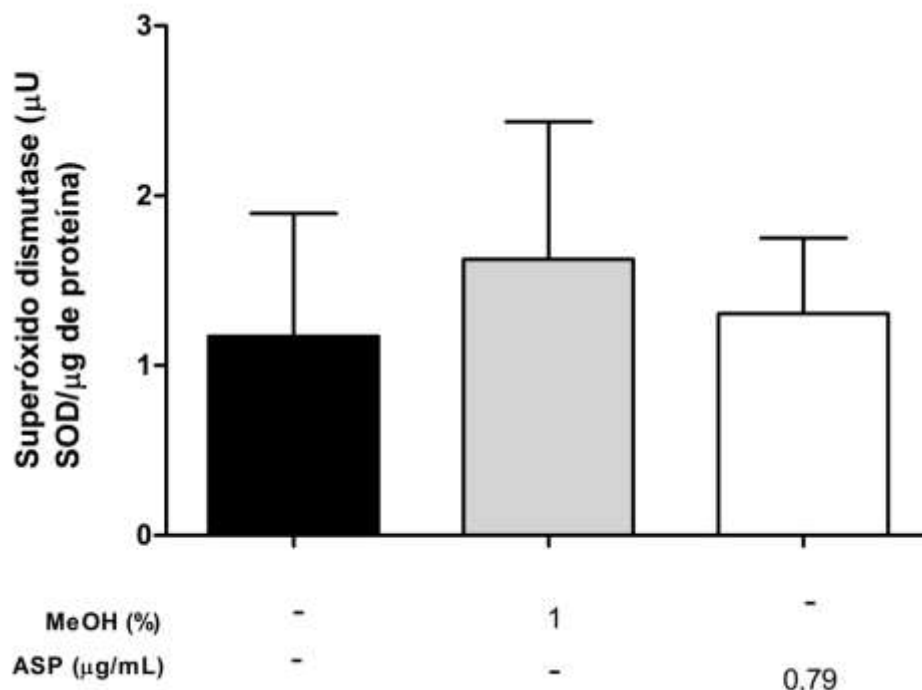


Figura 5. Avaliação da enzima superóxido dismutase.

Células, 3×10^5 , foram incubadas em um placa de 6 poços e tratadas por 48 horas com aspartame ou metanol. Os resultados representam média \pm SEM de 3 ensaios distintos. Os resultados foram comparados aos do grupo controle (células não tratadas).

Ensaio de peroxidação lipídica

Em um ensaio realizado para avaliar o nível de peroxidação lipídica das células após 48 h de tratamento com metanol ou aspartame foi observada uma tendência de aumento de malondialdeído, substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, nas células tratadas com metanol ou aspartame, mas a diferença dos valores não foi estatisticamente significativa quando comparados com ao controle, de células não tratadas.

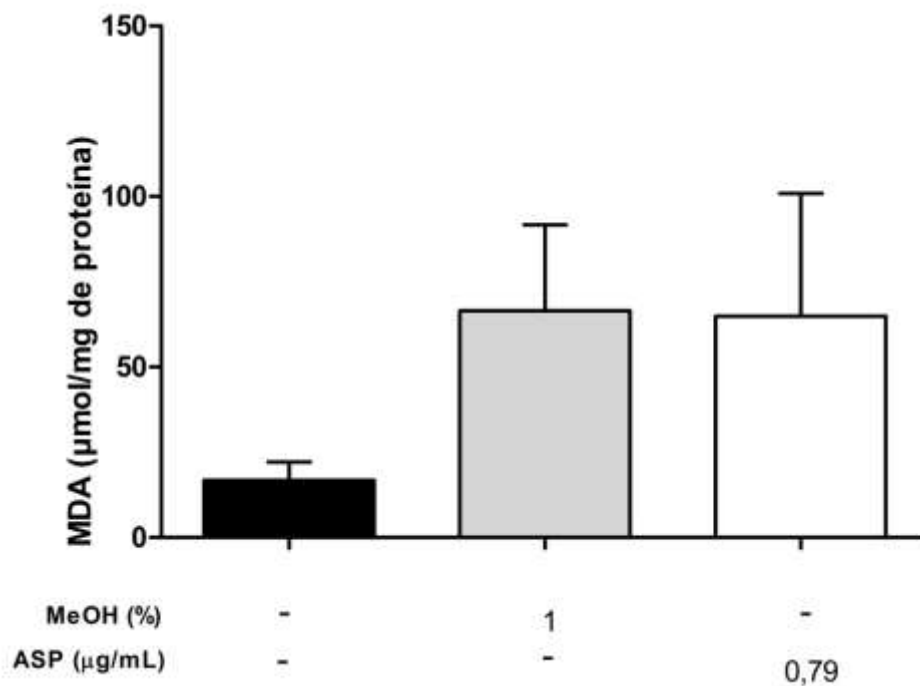


Figura 6. Nível de peroxidação lipídica das células.

Células, 3×10^5 , foram incubadas em um placa de 6 poços e tratadas por 48 horas com aspartame ou metanol. Os resultados representam média \pm SEM de 3 ensaios distintos e foram comparados ao controle (células não tratadas).

Discussão

O aspartame é consumido diariamente em bebidas e produtos alimentícios. Estudos mostram que, após consumido e metabolizado no intestino, o metanol gerado circula livremente no sangue por até 24 horas, e sua quantidade detectável pode ser responsável pelos efeitos de estresse oxidativo observados no organismo (ASHOK; SHEELADEVI; WANKHAR, 2015).

O metanol é metabolizado basicamente por três via enzimáticas, álcool desidrogenase, catalase e enzimas microssomais oxidativas (IYYASWAMY; RATHINASAMY, 2017). KRUSE, 1992, relatou que, seguramente, o metanol pode causar toxicidade sistêmica. Segundo JEGANATHAN e NAMASIVAYAM, 1998, avaliando os efeitos no cérebro, foi possível observar que o aumento do nível de metanol pode ocasionar mudanças severas nos níveis de neurotransmissores, como a monoamina. O metanol prejudica a constituição da membrana mitocondrial, aumentando a proliferação microssomática, o que leva à produção de espécies reativas de oxigênio (CASTRO et al., 2002).

O estresse oxidativo caracteriza-se como um desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, favorecendo os oxidantes, e tendo como consequência danos moleculares (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

A produção mitocondrial do radical superóxido ocorre principalmente em dois pontos da cadeia transportadora de elétrons; são eles, o Complexo I (NADH desidrogenase), presente em neutrófilos, macrófagos e células vasculares, e o Complexo III (coenzima Q - citocromo c redutase) (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

O estudo com cultura de células é universalmente aceito em pesquisas laboratoriais para elucidar vias metabólicas envolvidas na regulação da expressão gênica, proliferação e morte celular (HALLIWELL, 2003).

LEBDA e colaboradores, 2017, trataram ratos com 270 mg de aspartame por kg de massa corpórea por dia e um grupo do controle apenas com água, por 60 dias, e

observaram uma queda significativa da atividade de SOD, CAT e indução do nível de malondialdeído no cérebro dos animais tratados.

Em trabalho realizado *in vitro*, HORIO et al., 2014, investigaram o efeito do aspartame na apoptose das células PC12 (linhagem de células de feocromocitoma) e em seus resultados mostraram que o aspartame induziu a apoptose dessas células, através da via mitocondrial, devido à toxicidade do metanol.

Alguns estudos utilizam, de forma preliminar, ensaios de viabilidade celular para estabelecer parâmetros de integridade celular a fim de realizar testes posteriores PANDURANGAN et al. (2016), trataram células HeLa com aspartame nas concentrações de 0,01 a 0,05 mg/mL por 48 horas e mostraram, por meio da técnica colorimétrica SRB (sulforodamina B), que não houve diferença na viabilidade celular entre as células tratadas e controle. Esses resultados diferem dos encontrados neste estudo com fibroblastos, em que foram observadas diminuições acima de 30% após 48 h de tratamentos com aspartame em concentrações de 1,58 µg/mL a 12,64 µg/mL ou de metanol na concentração de 16%. Curiosamente, o tratamento com aspartame se apresentou mais tóxico às células que a correspondente concentração de metanol que poderia ser gerada por esta quantidade de aspartame.

PANDURANGAN e colaboradores, 2014, trataram células 3T3-L1 com doses crescentes de aspartame, de 5 a 25 µg/mL, por 6 dias e não observaram este efeito de toxicidade às células.

O ensaio de viabilidade celular foi utilizado como teste preliminar na escolha de concentrações de metanol e aspartame que seriam usadas nos outros ensaios. Portanto, foi escolhida a concentração de 0,79 µg de aspartame e 1% de metanol, que permitiram a manutenção da viabilidade celular em pelo menos 70% em relação ao controle, para o tratamento dos fibroblastos para avaliar se os mesmos promoviam o estresse oxidativos nas células.

Foi observado que não houve diferença significativa em relação ao controle nos ensaios de atividade de catalase e SOD, mas foi possível observar uma tendência de

diminuição da atividade da catalase nas células tratadas com aspartame e metanol. A catalase é a principal responsável por converter H_2O_2 em H_2O e oxigênio (ASHOK; SHEELADEVI; WANKHAR, 2015). A diminuição nos níveis de atividade de catalase pode prejudicar o equilíbrio redox das células. Como houve uma variação grande de resultados, não foi possível inferir que os tratamentos aumentam os níveis de SOD. A superóxido dismutase converte o ânion radical superóxido em água oxigenada, que por sua vez é convertida em água e oxigênio molecular pela ação da catalase. SOD elevada indica excesso da produção de superóxido, e exposições elevadas a espécies reativas de oxigênio podem prejudicar importantes células e tecidos (Ashok 2015). Como mostrado na Figura 2, as enzimas superóxido dismutase e catalase trabalham juntas para a eliminação do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Um aumento de SOD em conjunto com a diminuição de catalase provoca um aumento de peróxido de hidrogênio no tecido.

A peroxidação lipídica é um processo mediado por espécies reativas de oxigênio, e é um dos processos oxidativos mais danosos ao organismo, podendo causar perda da integridade da membrana, danos a proteínas e ao DNA (YAN; SOHAL, 2002). Em seus resultados PROKIĆ et al., 2014, em um estudo com animais, observaram que o tratamento com aspartame na dose diária recomendada gerou um aumento nos produtos da peroxidação lipídica. Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa, uma tendência clara de aumento nos produtos da peroxidação lipídica também foi observada nos resultados obtidos neste estudo com fibroblastos tratados com metanol ou aspartame.

Conclusão

Foi observado que o aspartame, nas concentrações de 1,58 a 12,64 $\mu\text{g/mL}$, e o metanol, na concentração de 16%, causaram uma diminuição maior que 30% na viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos, após tratamento por 48 h. As células tratadas por 48 h com 1% de metanol ou aspartame na concentração de 0,79 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma tendência de diminuição na atividade da catalase e de aumento nos produtos da peroxidação lipídica.

Referências Bibliográficas

ASHOK, I.; SHEELADEVI, R.; WANKHAR, D. Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. **The Journal of Biomedical Research**, v. 29, n. 5, p. 390–396, 2015. Disponível em: <www.jbr-pub.org>. Acesso em: 22 nov. 2017.

CASTRO, G. D.; COSTANTINI, M. H.; DELGADO DE LAYÑO, A. M. A.; CASTRO, J. A. Rat liver microsomal and nuclear activation of methanol to hydroxymethyl free radicals. **Toxicology letters**, v. 129, n. 3, p. 227–36, 28 mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11888706>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

CHOUDHARY, A. K.; SHEELA DEVI, R. Longer period of oral administration of aspartame on cytokine response in Wistar albino rats. **Endocrinologia y Nutricion**, v. 62, n. 3, p. 114–122, 1 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1575092214002964?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

DI DALMAZI, G.; HIRSHBERG, J.; LYLE, D.; FREIJ, J. B.; CATUREGLI, P. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. **Auto- immunity highlights**, v. 7, n. 1, p. 11, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27491295>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

FINAMOR, I.; PÉREZ, S.; BRESSAN, C. A.; BRENNER, C. E.; RIUS-PÉREZ, S.; BRITTES, P. C.; CHEIRAN, G.; ROCHA, M. I.; DA VEIGA, M.; SASTRE, J.; PAVANATO, M. A. Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway, glutathione depletion and liver damage in mice. **Redox biology**, v. 11, p. 701–707, abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28187322>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 9 nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089981>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

GARDENER, H.; RUNDEK, T.; MARKERT, M.; WRIGHT, C. B.; ELKIND, M. S. V; SACCO, R. L. Diet soft drink consumption is associated with an increased risk of vascular events in the Northern Manhattan Study. **Journal of general internal medicine**, v. 27, n. 9, p. 1120–6, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282311>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

GUL, S. S.; HAMILTON, A. R. L.; MUNOZ, A. R.; PHUPITAKPHOL, T.; LIU, W.; HYOJU, S. K.; ECONOMOPOULOS, K. P.; MORRISON, S.; HU, D.; ZHANG, W.; GHAREDAGHI, M. H.; HUO, H.; HAMARNEH, S. R.; HODIN, R. A. Inhibition of the gut enzyme intestinal alkaline phosphatase may explain how aspartame promotes glucose intolerance and obesity in mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 1, p. 77–83, jan. 2017. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2016-0346>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

HALLIWELL, R. E. W. Lay TB testing. **The Veterinary record**, v. 153, n. 4, p. 126, 26 jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12918832>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

HORIO, Y.; SUN, Y.; LIU, C.; SAITO, T.; KURASAKI, M. Aspartame-induced apoptosis in PC12 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 158–165, 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913002627?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

IMAMURA, F.; O'CONNOR, L.; YE, Z.; MURSU, J.; HAYASHINO, Y.; BHUPATHIRAJU, S. N.; FOROUHI, N. G. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 351, p. h3576, 21 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26199070>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

IYYASWAMY, A.; RATHINASAMY, S. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the. [s.d.] Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/037/04/0679-0688>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

JEGANATHAN, P. S.; NAMASIVAYAM, A. Methanol-induced monoamine changes in hypothalamus and striatum of albino rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 6, n. 6, p. 451–4, [s.d.] Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2597347>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16–29, 1 maio 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163715000033?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

KOUFEN, P.; STARK, G. Free radical induced inactivation of creatine kinase: Sites of interaction, protection, and recovery. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1501, n. 1, p. 44–50, 15 abr. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443900000053?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

KRUSE, J. A. Methanol poisoning. **Intensive care medicine**, v. 18, n. 7, p. 391–7, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1469176>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

LEBDA, M. A.; SADEK, K. M.; EL-SAYED, Y. S. Aspartame and Soft Drink-Mediated Neurotoxicity in Rats: Implication of Oxidative Stress, Apoptotic Signaling Pathways, Electrolytes and Hormonal Levels. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 5, p. 1639–1647, 28 out. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11011-017-0052-y>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1 jun. 1979. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269779907383?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

PANDURANGAN, M.; ENKHTAIVAN, G.; MISTRY, B.; CHANDRASEKARAN, M.; NOORZAI, R.; KIM, D. H. Investigation of role of aspartame on apoptosis process in HeLa cells --> **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 503–506, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X15001345>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

PANDURANGAN, M.; PARK, J.; KIM, E. Aspartame downregulates 3T3-L1 differentiation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 50, n. 9, p. 851–857, 25 out. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11626-014-9789-3>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

PROKIĆ, M. D.; PAUNOVIĆ, M. G.; MATIĆ, M. M.; DJORDJEVIĆ, N. Z.; OGNJANOVIĆ, B. I.; ŠTAJN, A. Š.; SAIČIĆ, Z. S. Prooxidative effects of aspartame on antioxidant defense status in erythrocytes of rats. **J. Biosci**, v. 39, p. 859–866, [s.d.] Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/039/05/0859-0866>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

SANTOS, N. C.; DE ARAUJO, L. M.; DE LUCA CANTO, G.; GUERRA, E. N. S.; COELHO, M. S.; BORIN, M. de F. Metabolic effects of aspartame in adulthood: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–14, 10 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2017.1304358>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

SWITHERS, S. E. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 24, n. 9, p. 431–41, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850261>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

SWITHERS, S. E.; DAVIDSON, T. L. A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 161–173, 2008. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.122.1.161>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

WHO | JECFA. Disponível em: <<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=62>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

YAN, L.-J.; SOHAL, R. S. Analysis of Oxidative Modification of Proteins. In: **Current Protocols in Cell Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002. Chapter 7p. Unit 7.9.

YANG, Q. Gain weight by “going diet”; Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 83, n. 2, p. 101–8, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589192>>. Acesso em: 23 nov. 2017.