

Efeito da suplementação de beta-caroteno na pressão arterial de ratos

Effect of beta-carotene supplementation on the blood pressure of rats

Giselle Santos de OLIVEIRA¹

Álvaro Souto Padrón de FIGUEIREDO¹

Rosane de Souza SANTOS²

Lucia Marques VIANNA³

RESUMO

Objetivo

Investigar se a suplementação com doses supra-fisiológicas de beta-caroteno exerce efeito positivo no controle da hipertensão arterial, e detectar possíveis efeitos adversos dessa suplementação.

Métodos

Ratos espontaneamente hipertensos (n=12) e normotensos (n=12) com 20 semanas, foram submetidos a um período basal de 10 dias, e subdivididos em 4 grupos de 6 animais, suplementados com beta-caroteno em três diferentes doses: 2,5mg, 3,75mg e 5,0mg por animal, via gavagem orogástrica diária, durante 14 dias para cada dose, intercaladas por um período de *wash-out* de 7 dias; os grupos controle receberam apenas o veículo (óleo de coco). Foram ainda submetidos à avaliação ectoscópica para possível detecção de efeitos tóxicos ou interação entre nutrientes, e à análise dos parâmetros biológicos; a pressão sistólica foi aferida por pletismografia duas vezes na semana, em dias alternados. Após o período de suplementação os animais foram sacrificados, e tiveram o peso do fígado determinado pelo método de Scherle.

Resultados

A administração de beta-caroteno não levou a alterações dos parâmetros biológicos dos animais, assim como não foi detectado efeito tóxico. Quanto à pressão arterial sistólica, as duas linhagens apresentaram redução significativa ($p < 0,05$), sendo a maior redução observada durante administração da terceira dose. O peso médio do fígado foi de 7,25 (desvio-padrão 3,2) gramas, e a relação média do peso do órgão/média do peso corpóreo igual a 0,0192 para o grupo dos hipertensos.

¹ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Escola de Nutrição, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Mestrado em Neurologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Bolsista CAPES.

³ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas, Rua Xavier Sigaud, 290, Térreo, Urca, 22290-180, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: L.M. VIANNA. E-mail: <lindcd@ig.com.br>.

Conclusão

A suplementação de beta-caroteno tem efeito positivo tanto no controle quanto na prevenção da hipertensão arterial de ratos. A relação peso do fígado/peso corpóreo apresentou-se dentro dos padrões de normalidade.

Termos de indexação: beta-caroteno; hipertensão; malondialdeído.

ABSTRACT

Objective

To investigate if supplementation with supraphysiological doses of beta-carotene has a positive effect on controlling hypertension and detect possible adverse effects of this supplementation.

Methods

20-week-old spontaneously hypertensive rats (n=12) and normotensive rats (n=12) were submitted to a basal period of 10 days, then divided into 4 groups of 6 animals and supplemented daily by orogastric gavage with beta-carotene in 3 different doses: 2.5mg, 3.75mg and 5.0mg/animal during 14 days for each dose that was inserted by a seven day wash-out period; control groups received only coconut oil. Animals were submitted to ectoscopic evaluation to detect possible toxic effects or interaction between nutrients and analysis of biological parameters; systolic blood pressure was measured by plethysmography twice a week on alternate days; after the supplementation period, animals were killed and their livers weighed by the Scherle method.

Results

Administration of beta-carotene did not alter the animals' biological parameters or cause any toxic effects. Regarding systolic blood pressure, both lineages showed significant results ($p < 0.05$), with the highest dose presenting the best results. The average liver weight was 7.25 (3.2 standard-deviation) grams, and the relationship between the average liver weight and body weight was 0.0192 for the hypertensive group.

Conclusion

Beta-carotene supplementation was effective in controlling and preventing hypertension in rats. The relationship between liver weight and body weight was normal.

Indexing terms: beta-carotene; hypertension; malondialdehyde.

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, explicando 40% das mortes por acidente vascular encefálico e 25% daquelas por doença arterial coronariana¹.

Evidências experimentais vêm confirmando a implicação do processo oxidativo de macromoléculas na lesão endotelial das doenças cardiovasculares², aumentando consideravelmente o interesse pela investigação da provável ação das vitaminas de poder antioxidante nesse processo³.

Estudos epidemiológicos vêm sugerindo que as vitaminas antioxidantes, entre elas o beta-caroteno, podem desempenhar importante papel no que diz respeito a causas primárias e à

prevenção da hipertensão⁴. Esse fato estaria associado à atividade antioxidante dos carotenóides, que é consequência de sua estrutura singular⁵. Os carotenóides, como o beta-caroteno, podem reagir múltiplas vezes com radicais peroxila para formar moléculas estáveis⁶.

Por outro lado, contrariamente aos efeitos benéficos do beta-caroteno, a literatura apresenta casos de hipervitaminose associada a megadoses, que tiveram como consequência a impregnação hepática, levando a efeitos adversos tais como: injúria, fibrose, hipertensão portal e hidrotórax hepático⁷⁻¹⁰. Encontram-se também, relatos de estudos experimentais e intervencionistas que sugeriram uma possível ação pró-oxidante, que vem contrastar com sua já conhecida ação antioxidante¹¹.

Sendo assim, a prática de suplementação do beta-caroteno com caráter profilático ou terapêutico ainda não está estabelecida, especialmente porque seu real papel no controle da pressão arterial também não está definido¹².

Tendo em vista tal controvérsia, desenvolveu-se um estudo experimental com o objetivo de estabelecer se a suplementação com doses supra-fisiológicas de beta-caroteno exerceria efeito positivo no controle da hipertensão arterial, e detectar possíveis efeitos negativos dessa suplementação.

MÉTODOS

Machos espontaneamente hipertensos SHR (n=12) e Wistar (n=12), de 20 semanas de idade e com peso variando de 245g a 255g, obtidos da colônia do Biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, foram estudados.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas com condições de luminosidade (ciclo claro-escuro/12h), temperatura (média 21°C desvio-padrão (dp) 2) e umidade (60 dp10%) controladas, e ciclo de exaustão de ar (15min/h), recebendo ração Nuvilab (Nuvital Co) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com *Principles of Laboratory Animal Care*¹³. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para experiência com animais, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Após o período basal de 10 dias, os animais foram divididos em 4 grupos: SHR-controle (n=6), Wistar-controle (n=6); SHR-tratado (n=6) e Wistar-tratado (n=6). Os grupos tratados receberam por gavagem orogástrica a suplementação diária de beta-caroteno (C-9750 Sigma, St. Louis, Mo) dissolvido em 0,35mL de óleo de coco em três diferentes doses: 2,5mg, 3,75mg e 5mg por animal. A duração do tratamento foi de 14 dias para cada dose, intercalados com período de *wash-out* (sem suplementação) de 7 dias para

evitar o efeito residual, e os grupos controle receberam apenas o veículo.

Os consumos de ração e água foram monitorados diariamente, assim como a diurese e as condições físicas do animal (avaliação de pele, mucosas, postura do animal), para possível detecção de efeitos tóxicos ou de interação entre nutrientes, seguindo protocolo de inspeção de animais de laboratório.

A pressão arterial sistólica foi aferida duas vezes na semana, usando o método não invasivo de pletismografia em ratos conscientes, seguindo metodologia de Magaldi modificada por Vianna LM¹⁴.

Os animais sob anestesia (tiopental sódico) foram submetidos à coleta de sangue para determinação dos níveis de malondialdeído (MDA), via método colorimétrico (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). A concentração de MDA foi calculada pela absorção a 532nm e os resultados expressos em nmol.

Os animais SHR foram submetidos a sacrifício via indução de coma profundo e morte com anestesia inalatória (éter) e barbitúrico (tiopental sódico) administrado intra peritoneal (i.p.) em doses superiores a 25mg/kg⁻¹. A determinação do peso do fígado foi realizada usando o método de Scherle, que se baseia no Princípio de Arquimedes¹⁵; o órgão removido é suspenso por um fio e imerso em solução salina fisiológica dentro de um becker, sem tocar as paredes, esse sistema encontra-se sobre uma balança analítica de acurácia de 0,001g.

Os resultados foram apresentados como média (M) e desvio-padrão (dp), e foram realizados teste "t" *student* para comparação de duas médias (basal x tratado), e análise de variância para comparar as diferentes doses, sendo o valor de $p < 0,05$ estatisticamente significante.

RESULTADOS

A administração de beta-caroteno não levou a alterações significantes dos parâmetros

biológicos dos animais associados ao consumo de ração, ingestão hídrica, peso e diurese (Tabela 1), assim como não foi detectado um possível efeito tóxico. Entretanto foi observada uma coloração alaranjada no pêlo dos animais tratados (ratos SHR e *Wistar*), sendo esta normalizada aproximadamente 7 dias após o término do tratamento. Quanto ao peso do fígado, obteve-se um peso médio do órgão correspondente a 7,25 (dp=3,2) gramas, e a relação entre a média do

peso do órgão e a média do peso corpóreo igual a 0,0192 após tratamento.

A suplementação oral com beta-caroteno provocou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na pressão arterial sistólica com a dose de 2,5mg, tanto em ratos Wistar (95, dp=3mmHg para 91,7, dp=0,9mmHg) como em ratos SHR (172, dp=0,5mmHg para 169, dp=0,6mmHg) e esse declínio foi mantido ao longo do tratamento com as demais doses. Uma

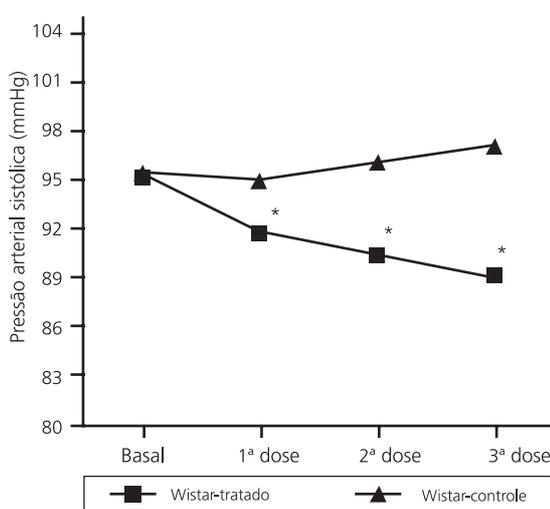


Figura 1. Média e desvio-padrão da pressão arterial sistólica de ratos Wistar normotensos, durante o período basal (Basal) e após a suplementação com beta-caroteno a 2,5mg (1ª dose); 3,75mg (2ª dose) e 5mg (3ª dose).

*Nível de significância $p < 0,05$.

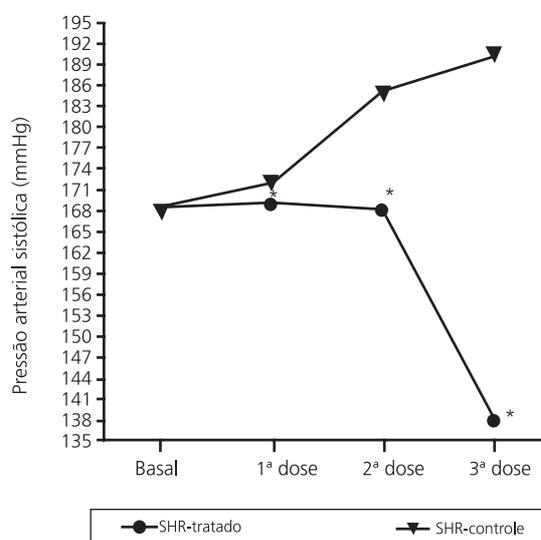


Figura 2. Média e desvio-padrão da pressão arterial sistólica de ratos SHR, durante o período basal (Basal) e após a suplementação com beta-caroteno a 2,5mg (1ª dose); 3,75mg (2ª dose) e 5mg (3ª dose).

*Nível de significância $p < 0,05$.

Tabela 1. Parâmetros biológicos dos animais espontaneamente hipertensos (SHR) e *Wistar* no período basal e durante a suplementação com 2,5mg (1ª dose); 3,75mg (2ª dose) e 5mg (3ª dose) de beta-caroteno.

Ratos	Período	Ingestão hídrica (mL)		Ingestão ração (g)		Peso corporal (g)		Diurese (mL)	
		M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
SHR	Basal	37,4	3,30	23,70	2,00	255,00	2,65	8,60	0,50
	1ªdose	33,0	1,41	21,40	0,50	272,60	5,09	10,80	0,73
	2ªdose	31,0	1,95	29,60	0,75	282,40	4,99	10,00	0,70
	3ªdose	33,0	1,03	31,01	0,70	292,30	5,02	9,80	1,20
Wistar	Basal	20,88	2,36	17,53	0,65	264,38	3,07	4,50	0,41
	1ªdose	22,65	1,73	16,30	2,34	261,55	1,45	4,02	0,38
	2ªdose	18,72	1,97	14,69	2,60	272,80	4,50	4,41	0,61
	3ªdose	17,33	1,66	20,83	3,17	277,33	3,57	4,41	0,68

Os valores representam a média e desvio padrão $p > 0,05$; DP= desvio-padrão.

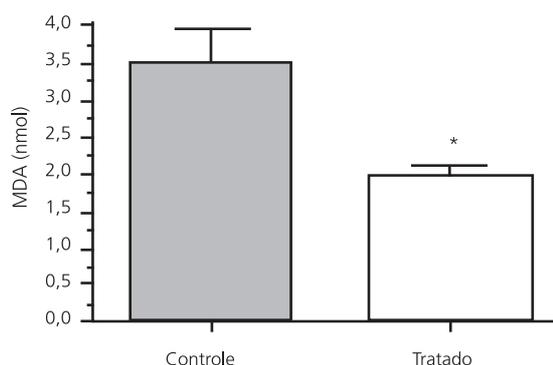


Figura 3. Média e desvio-padrão dos níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) em ratos não tratados (controle) e tratados com beta-caroteno.

Nota: *Nível de significância $p < 0,05$.

redução mais pronunciada foi observada com o uso de beta-caroteno a 5mg, sendo notada uma queda nos níveis pressóricos de 97, $dp=2$ mmHg para 89,1, $dp=0,33$ mmHg e de 190, $dp=0,5$ mmHg para 138, $dp=8,8$ mmHg em ratos Wistar e SHR, respectivamente (Figuras 1 e 2).

A dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico revelou que os níveis plasmáticos de malondialdeído foram significativamente ($p < 0,05$) menores nos ratos tratados com beta-caroteno (1,97, $dp=0,32$ nmol) *versus* os animais dos grupos controles (3,50, $dp=1,19$ nmol) (Figura 3).

DISCUSSÃO

Considerando que megadoses de beta-caroteno parecem estar associadas a hepatotoxicidade, este estudo foi realizado para investigar os possíveis efeitos tóxicos de seu uso em doses supra-fisiológicas e sua ação sobre a pressão arterial. Clássicos relatos citam a hepatomegalia (com hipertrofia e hiperplasia), fibrose portal e peri-portal como resultado da administração crônica de vitamina A⁸, e sinais de hepatotoxicidade na forma de hipertensão portal podem ser observados mesmo após cinco anos da interrupção da suplementação com essa vitamina⁹. Ainda em relação ao uso excessivo da vitamina A, foram

identificadas citações referentes a sintomas respiratórios causados por hidrotórax hepático, o que sugere a existência de uma gama maior de manifestações clínicas¹⁰.

Quanto ao beta-caroteno, Nagai et al.⁷, igualmente, relataram sinais de toxicidade e curiosamente enfatizam que tais efeitos podem ser oriundos de fonte alimentar e não de suplementação.

Na realidade, estudos tanto longitudinais quanto experimentais vêm propondo que altas concentrações de carotenóides estariam relacionadas com a sua atividade pró-oxidante¹⁶⁻¹⁸. Acredita-se também que indivíduos submetidos à suplementação de beta-caroteno, quando expostos ao fumo intenso, podem apresentar aumento na incidência de câncer de pulmão, que estaria relacionado com a oxidação do beta-caroteno pelos compostos presentes na fumaça do cigarro^{11,19}.

Em resumo, a ação pró-oxidante do beta-caroteno estaria ligada à geração de concentrações relativamente altas de produtos oriundos da sua auto-oxidação, conseqüentes da sua exposição a espécies reativas de oxigênio (ROS), ou de processos metabólicos via aumento do catabolismo do ácido retinóico, ou ainda interferência no sinal retinóide de transdução²⁰.

Por outro lado, este trabalho demonstrou que o uso de doses supra-fisiológicas por um período de 14 dias, não provocou efeitos colaterais. A análise macroscópica do fígado, complementando o exame físico dos animais, também não evidenciou alterações, uma vez que o peso médio do órgão e a média da relação peso órgão/peso corpóreo estiveram dentro dos padrões de normalidade, isto é, 4g para cada 100g de peso corpóreo e 0,04, respectivamente^{21,22}.

O estudo de Bando et al.²³, que atingiu até 10mg de beta-caroteno/dia, também não relatou toxicidade. Discute-se também que os supostos efeitos tóxicos relacionados à suplementação de beta-caroteno poderiam estar associados à sua conversão em vitamina A. Entretanto recentes estudos de sua cinética, realizados por Barua²⁴, sugerem que sua toxicidade deve ser

muito reduzida, uma vez que altas doses são necessárias para manutenção do status nutricional da vitamina A. Adicionalmente, tem sido, inclusive, atribuído ao beta-caroteno, um efeito hepatoprotetor em animais portadores de fibrose hepática²⁵.

O objetivo principal deste estudo foi identificar a ação do beta-caroteno sobre a pressão arterial em ratos SHR e *Wistar*, e os resultados sugerem que o objetivo foi alcançado. Na realidade, a literatura vem sugerindo que as vitaminas antioxidantes em geral têm um importante papel na prevenção da hipertensão, já que níveis séricos de alfa-caroteno, beta-caroteno e vitamina C mostram-se significativamente associados a menores níveis de pressão arterial⁴.

Segundo Galley et al.²⁶, a administração de beta-caroteno, associada a outros antioxidantes poderia levar a redução da pressão arterial, entretanto, no que se refere à ação isolada do caroteno seu papel ainda não foi esclarecido. Acrescenta-se também o fato de que nem sempre a literatura sustenta a hipótese de que a suplementação de beta-caroteno exerça efeito protetor nas doenças cardiovasculares^{12,27,28}.

Em contrapartida, os achados deste estudo demonstram claramente um efeito positivo da suplementação isolada de beta-caroteno no controle da pressão arterial sistólica, o qual é atribuído à redução dos níveis plasmáticos de malondialdeído. O malondialdeído tem sido usado por ser um procedimento confiável na análise da peroxidação lipídica em vários órgãos. Neste ensaio, dosou-se o malondialdeído para monitorar o estresse oxidativo. Os carotenóides, por sua vez, devido à sua estrutura, que se trata de um sistema de duplas ligações conjugadas, seriam capazes de interceptar radicais livres oriundos da lipoperoxidação eliminá-los do organismo, o que confirma a ação antioxidante encontrada em nossos resultados. Adicionalmente, sua estrutura ainda permite que eles reajam múltiplas vezes com radicais peróxila^{5,6}. Dessa forma, este trabalho demonstra que a suplementação foi capaz de reduzir o estresse oxidativo medido por meio da dosagem do

malondialdeído, e controlar a pressão arterial, sendo efetiva tanto em animais hipertensos quanto normotensos.

CONCLUSÃO

Quanto aos efeitos tóxicos atribuídos à suplementação com megadoses de beta-caroteno, as análises realizadas, incluindo, entre outras, a determinação do peso do fígado e a sua relação com o peso corpóreo, apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade, descartando a possibilidade de comprometimento hepático.

Estes resultados inéditos apresentam o beta-caroteno como agente hipotensor, sugerindo assim, que sua suplementação, modulando o estresse oxidativo, possa representar uma terapia alternativa ou coadjuvante na hipertensão arterial essencial humana.

Contudo, achados sobre efeitos adversos, causados por excesso de carotenóides na dieta, indicam a necessidade de confirmação de protocolos como o deste ensaio, e ainda em períodos mais longos e com o emprego de indicadores adicionais de estresse oxidativo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

1. Jonasson L, Wikby A, Olsson AG. Low serum beta-carotene reflects immune activation in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2003; 13(3):120-5.
2. Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 1998; 16(9):1267-71.
3. Allard JP, Royall D, Kurian R, Muggli R, Jeejeebhoy KN. Effects of beta-carotene supplementation on lipid peroxidation in humans. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59(4):884-90.

4. Chen J, He J, Hamm L, Bacterman V, Whelton PK. Serum antioxidant vitamins and blood pressure in the United State population. *Hypertation*. 2002; 40(4):810-16.
5. Klein BP, King D, Grossman S. Cooxidation reactions of lipoxygenase of plant systems. *Ady Free Radical Biol Med*. 1985; 1(2):309-43.
6. Burton G W. Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr*. 1989; 119:109-11.
7. Nagai K, Hosaka H, Kubo S, Nakabayashi T, Amagasaki Y, Nacamura N. Vitamin A toxicity secondary to excessive intake of yellow-gree vegetables, liver and laver. *J Hepatol*. 1999; 31(1):142-8.
8. Verneau A, Rosenbaum J, Zafrani ES, Rondot-Thoraval F, Leclercq M, Dhermeaux D. Hepatic fibrosis and portal hypertention in chronic vitamin A poisoning. *Gastroenterol Clinc Biol*. 1984; 8(2):121-5.
9. Croquet V, Pilette C, Lespine A, Vuilemin E, Rousselet MC, Oberti F, et al. Hepatic hyper-vitaminosis A: important of retinyl ester level determination. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12(3):361-4.
10. Miksad R, Lédinghen V, McDougall C, Fiel I, Rosemberg H. Hepatic hidrotorax associated with vitamin A toxicity. *J Clin Gastroenterol*. 2002; 34(3):275-9.
11. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Liverpool John Moores University. 2000.
12. Gaytan RJ, Prisant LM. Oral nutritional supplements and heart disease: a review. *Am J Therapeutics*. 2001; 8(4):255-74.
13. Principles of laboratory animal care. NIH Publ. 1985; n.85-23.
14. Vianna LM, Paiva ACM, Paiva TB. Treatment with vitamin D3 reduces blood pressure of SHR. *Gen Hypertension*. 1992; 218:589-91.
15. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative sterology. *Mikroskopie*. 1970; 26(1):57-60.
16. Omenn GS, et al. The alpha-tocoferol, beta-carotene cancer prevention study group. *N Engl J Med*. 1994; 330(15):1029-35.
17. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung câncer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996; 334:1150-55.
18. Palozza P, Calviello G, Bártoli GM. Prooxidant activity of beta-carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes. *Free Radical Biol Med*. 1995; 19(6):887-92.
19. Baker DL, Krol ES, Jacobsen N, Liebler DC. Reactions of beta-carotene whith cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of the prooxidant/oxidante effect. *Chem Res Toxicol*. 1999; 12(6):535-43.
20. Wang X-D, Russel RM. Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr Rev*. 1999; 57(9 Pt):263-72.
21. Sharp P, Laregina M, Suckow MA. *The Laboratory Rat*. CRC Press; 1998.
22. Baker H, Lindsey RJ. *The Laboratory Rat. Research Application*. Academic Press; 1980.
23. Bando N, Yamanishi R, Terao J. Inhibition of immunoglobulin E production in allergic model mice by supplementation with vitamin E and beta-carotene. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003; 67(10):2176-82.
24. Barua AB. Absorption and conversion of a single oral dose of beta-carotene in corn oil to vitamin A in Sprague-Dawley rats with low reserve of vitamin A. *Int J Vitam Nutr Res*. 2003; 73(4):267-73.
25. Seifert WF, Bosma A, Hendriks HF, van Leeuwen RE, van Thiel-de Ruiten CG, Seifert-Bock I, et al. Beta-carotene (provitamina A) decreases the severity of CCL4-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats. *Liver*. 1995; 15(1):1-8.
26. Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination oral antioxidants supplementation reduces blood pressure. *Clin Sci*. 1997; 92(4):361-5.
27. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Alfa tocoferol, beta-carotene cancer study group_The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung câncer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med*. 1994; 330:1029-35.
28. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2000; 342(3):154-60.

Recebido em: 19/10/2004
 Versão final reapresentada em: 30/10/2006
 Aprovada em: 21/11/2006