

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της Μαρία Σαρικά

ΒΗΑ: ΝΕΟΤΕΡΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τριμελής Επιτροπή
Ε. ΠΟΛΥΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ
Μ. ΣΚΟΥΡΟΛΙΑΚΟΥ
Γ. ΜΠΟΣΚΟΥ (επιβλέπων)

ΠΤΥ
ΣΑΡ

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2004



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της Μαρία Σαρικά

ΒΗΑ: ΝΕΟΤΕΡΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τριμελής Επιτροπή
Ε. ΠΟΛΥΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ
Μ. ΣΚΟΥΡΟΛΙΑΚΟΥ
Γ. ΜΠΟΣΚΟΥ (επιβλέπων)

Οι συγγραφείς και ο επιβλέπων της πτυχιακής διατριβής αυτής επιτρέπουν τη μελέτη και αντιγραφή του περιεχομένου της μόνο σε προσωπικό επίπεδο. Κάθε άλλη χρήση περιορίζεται από το δικαίωμα της πνευματικής ιδιοκτησίας και την υποχρέωση να γίνεται αναφορά της πηγής όταν παραθέτονται αποσπάσματα της διατριβής.

A1. Γενικά για το BHA	4
-----------------------	---

A2. Αντικείμενο της διατριβής	7
-------------------------------	---

Αυθεντικά αντίγραφα φέρουν την υπογραφή των συγγραφέων και του επιβλέποντος

Υπογραφή συγγραφέων	8
Ομόφωνη σύγκληση	9
Ρόλος του αντιπρόεδρου	10
Επικύρωση	11

A3. Χρήση ως πηγή στο έργο	12
----------------------------	----

Οι συγγραφείς

Αναγωγή πηγών αναγκαστικών	13
Μέθοδοι παραγωγής αναγκαστικών και πηγών	14
Τυπικές παραπομπές του BHA	14

A4. Εκπαιδευόμενοι και επισκέψεις στην εργασία	16
--	----

Μελέτες	17
---------	----

A5. Νομοθεσία	20
---------------	----

A6. Εκπαιδευομένοι διδάσκοντες	23
--------------------------------	----

Ο επιβλέπων

Μελέτες σε ζώα που λαμβάνουν την παρανομοιοποίηση του BHA	25
Ανταγωνιστικές μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα	27
Μελέτες σε ανθρώπους (αντικείμενα)	34
Μελέτες σε ανθρώπους (αυθιχισμός)	36
Μελέτες σε ανθρώπους κτηνιάτρων	31

B. Συμπεράσματα	35
-----------------	----

Γ. Βιβλιογραφία	61
-----------------	----

Δ. Περίληψη - Abstract	66
------------------------	----

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
Εισαγωγή	2
A1. Γενικά για το BHA	4
A2. Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης	7
Υδρολυτική τάγγιση	8
Οξειδωτική τάγγιση	8
Ρόλος των αντιοξειδωτικών	10
Συνεργεία	11
A3. Χρήση ως πρόσθετο τροφίμων	12
Δραστική χρήση αντιοξειδωτικών	13
Μέθοδοι εισαγωγής αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα	14
Τυπικές εφαρμογές του BHA	14
A4. Επικινδυνότητα και επιπτώσεις στην υγεία	16
Μελέτες	17
A5. Νομοθεσία	20
A6. Επιδημιολογικά δεδομένα	23
Μελέτες σε ζώα που δείχνουν την καρκινογενετικότητα του BHA	23
Αντικαρκινικές μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα	27
Μελέτες σε ανθρώπους (συνοπτικά)	34
Μελέτες σε ανθρώπους (αναλυτικά)	36
Μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα	51
B. Συμπεράσματα	55
Γ. Βιβλιογραφία	61
Δ. Περίληψη -Abstract.....	66

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ΒΗΑ (βουτυλική υδροξυανισόλη) χρησιμοποιείται ευρέως για πολλά χρόνια ως αντιοξειδωτικό για τη διατήρηση της φρεσκαδας, της θρεπτικής αξίας, της γεύσης και του χρώματος των τροφίμων (JECFA, 1996). Η χρήση όμως του ΒΗΑ ως αντιοξειδωτικό αμφισβητήθηκε για πρώτη φορά από τους Ito *et al.*, (1982, 1983) οι οποίοι έκαναν τη πρώτη βιοανάλυση καρκινογένεσης του ΒΗΑ χρησιμοποιώντας αρχικά συγκεντρώσεις των 5000 ppm και 20000 ppm σε δίαιτα αρουραίων και μετά χαμηλότερες δόσεις των 2500 ppm και 10200 ppm για δυο χρόνια. Τα αποτελέσματα της έδειξαν ότι σχηματίστηκε υπερπλασία σε ποσοστό 100% στους αρσενικούς αρουραίους και σε ποσοστό 98% στους θηλυκούς αρουραίους. Αυτό αποτέλεσε έναυσμα για την εκπόνηση διάφορων μελετών πάνω στις επιδράσεις του ΒΗΑ σε οργανικά συστήματα ζωντανών οργανισμών και κυρίως στον άνθρωπο. Οι μελέτες αυτές ανέδειξαν το ΒΗΑ ως αντιοξειδωτικό, προοξειδωτικό, αντικαρκινικό, καρκινογόνο και προαγωγός σχηματισμού όγκου με αποτέλεσμα να υπάρχει η ανάγκη για βαθύτερη διερεύνηση της σχέσης δόσης-απόκρισης του ΒΗΑ με στόχο την ξεδιαλυνση του ρόλου του (Auroma 1994, Halliwell 1994).

Το θέμα της παρούσας μελέτης ήταν η επιδημιολογική εκτίμηση της επίδρασης της χρήσης του ΒΗΑ ως αντιοξειδωτικό στα τρόφιμα στην υγεία του ανθρώπου μέσω της αξιολόγησης διάφορων ερευνών που έχουν γίνει στο πέρασμα των χρόνων αλλά που έχουν γίνει κατά βάσει σε ζώα και σε ανθρώπινα κύτταρα *in vivo* και περιορισμένα σε ανθρώπους λόγω των δυσκολιών αλλά και των ηθικών φραγμάτων που δημιουργούνται με τη χορήγηση πιθανού καρκινογόνου για ερευνητικούς σκοπούς. Παρόλα αυτά υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα (π.χ. αρουραίοι, ποντίκια) αλλά και σε ανθρώπινα κύτταρα που αξιολόγησαν τις πιθανές καρκινικές, αντικαρκινικές και χημειοθεραπευτικές επιδράσεις του ΒΗΑ. Αρχικά όμως πριν από την επιδημιολογική εκτίμηση γίνεται αναφορά στα γενικά χαρακτηριστικά του ΒΗΑ, στο μηχανισμό της αντιοξειδωτικής του δράσης και στη χρήση του ως προσθετό στα τρόφιμα. Στη συνέχεια παρουσιάζεται και η νομοθετική διάταξη που ισχύει και έχει εκδοθεί από την κοινή επιστημονική επιτροπή του παγκόσμιου οργανισμού υγείας και του οργανισμού γεωργίας και τροφίμων για τη χρήση του ΒΗΑ στα τρόφιμα.

Όσον αφορά το τμήμα της επιδημιολογικής εκτίμησης, παρουσιάζονται με μορφή πίνακα οι μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπους και που αξιολόγησαν τη συσχέτιση της εμφάνισης του καρκίνου μαστού και του καρκίνου στομάχου με τη πρόσληψη του BHA στη συνέχεια γίνεται αναλυτική παρουσίαση όλων των βημάτων αυτών των μελετών από τη μεθοδολογία έως και τη συζήτηση που γίνεται στο τέλος των ερευνών σχετικά με τα αποτελέσματα που έχουν βρεθεί. Επίσης γίνεται αναφορά και σε μελέτη που έγινε στην Ιταλία και είχε ως σκοπό την εκτίμηση της μέσης πρόσληψης του BHA και κατά πόσο αυτή υπερβαίνει το ημερήσιο επιτρεπτό όριο. Παρουσιάζεται επίσης ένας αριθμός μελετών που έχουν γίνει σε ζώα και δείχνουν τις αντικαρκινικές επιδράσεις του BHA μετά από χορήγηση του. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά σε μελέτες που δείχνουν ότι το BHA προκαλεί καρκίνο στον προστόμαχο των αρουραίων αλλά και γενικά στις αρνητικές επιδράσεις της χορήγησης του BHA (σε ζώα). Τέλος γίνεται αναφορά σε μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπινα κύτταρα *in vitro* και δείχνουν διάφορες επιδράσεις του BHA όπως είναι η αναστολή του ένζυμου NAT που σχετίζεται με χημική καρκινογένεση, η απόπτωση προκαρκινικών κυττάρων, η μείωση της παραγωγής των κυτοκινών σε ασθενείς με φλεγμονώδης νόσο εντέρου αλλά και άλλων επιδράσεων. Μετά από την έκθεση όλων των μελετών, καταγράφονται τα συμπεράσματα που έχουν διεξαχθεί από τους μελετητές των επιμέρους μελετών αλλά και τα συμπεράσματα που εξάχθηκαν από την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Η σημαντικότητα της αξιολόγησης του BHA έγκειται στο ότι αυτό αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο προσθετό τροφίμων που βοηθάει στη πρόληψη της οξειδωτικής τάγγισης των λίπων και την επέκταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων στο ράφι. Προϊόντων όπως είναι τα ζωικά λίπη, οι κρέμες, οι σάλτσες, το γάλα, το κρέας και άλλα. Επομένως είναι μείζονος σημασίας να διερευνηθούν οι τυχόν επιδράσεις που μπορεί να έχει το BHA στην υγεία του ανθρώπου καθώς η έκθεση του σε αυτό είναι μακροχρόνια και οι επιπτώσεις μπορεί να είναι πολύ σοβαρές. Βέβαια είναι σημαντικό να γίνουν περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες στους ανθρώπους καθώς τα αποτελέσματα από τις μελέτες σε ζώα δεν μπορούν απόλυτα να γενικευτούν και για τους ανθρώπους.

A1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΒΗΑ

Το ΒΗΑ είναι συνθετικό αντιοξειδωτικό που προστίθεται στα λίπη ή στα τρόφιμα που περιέχουν λίπος με σκοπό την επιβράδυνση της οξείδωσης και τη διατήρηση της ευληπτότητας τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Το ΒΗΑ μαζί με το ΒΗΤ χρησιμοποιούνται ευρέως από το 1950. Το ΒΗΑ ανήκει στα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά τα οποία διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Το ΒΗΑ ανήκει στην κατηγορία των βουτυλιωμένων υδροξυανισολών και είναι μίγμα δυο ισομερών, της 2-tert-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης και του 3-tert-βουτύλο-4-μεθόξυ φαινόλης.

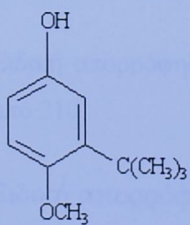
ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (ΚΤΠ,1999):

Κατηγορία: αντιοξειδωτικό

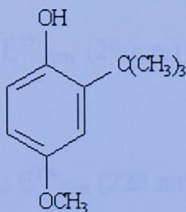
Εναλλακτικά: ΒΗΤ, ΡG, ΤΒΗQ

Συνεργιστικά: ΒΗΤ, ΡG, μεθειονίνη, λεκιθίνη, θειοδιπροπιονικό οξύ, κιτρικό οξύ, φωσφορικό οξύ

Μοριακός Τύπος:



3-isomer



2-isomer

Χημικές Ονομασίες: 3-tert -βούτυλο-4-υδροξυανισόλη, μίγμα 2-tert-βούτυλο-4-υδροξυανισόλη και 3-tert-βούτυλο-4-υδροξυανισόλη

Αριθμός EINECS: 246-563-8

Αριθμός E: E320

Χημικός τύπος: $C_{11}H_{16}O_2$ ή $(CH_3)_3CC_6H_5OCH_2OH$

Μοριακό βάρο: 180,25

Δοκιμασία: Περιεκτικότητα 98,5% τουλάχιστον σε $C_{11}H_{16}O_2$ και 85% τουλάχιστον σε ισομερές 3-tert-βούτυλο-4-υδροξυανισόλη

Περιγραφή: Κρύσταλλοι ή κηρώδης στερεό, λευκού ή υποκίτρινου χρώματος, με ελαφρώς αρωματική οσμή.

Ταυτοποίηση :

A. Διαλυτότητα: Αδιάλυτο στο νερό ευδιάλυτο σε αιθανόλη

B. Πεδίο τιμών σ.τ.: Μεταξύ 48 °C και 63 °C

Γ. Χρωστική αντίδραση: Υποβάλλεται σε δοκιμή για φαινολομάδες

Καθαρότητα:

Θεϊκή τέφρα: 0,05% κατ'ανώτατο όριο έπειτα από πύρωση στους 800 ± 25 °C

Φαινολικές προσμίξεις: 0,5% κατ'ανώτατο όριο

Ειδική απορρόφηση $E^{1\%}_{1cm}$: $E^{1\%}_{1cm}$ (290nm) τουλάχιστον 190 και όχι μεγαλύτερη από 210

Ειδική απορρόφηση $E^{1\%}_{1cm}$: $E^{1\%}_{1cm}$ (228 nm) τουλάχιστον 326 και όχι μεγαλύτερη από 345

Αρσενικό: 3mg/Kg κατ' ανώτατο όριο

Μόλυβδος: 5mg/Kg κατ' ανώτατο όριο

Υδράργυρος: 1mg/Kg κατ' ανώτατο όριο

Σημείο βρασμού: 264-270 °C στις 733 mmHg ,270°C στις 760 mmHg

Καθαρότητα %: Όχι λιγότερο από 98.5 του 2-ισομερούς και όχι λιγότερο από 85 του 3-ισομερούς

Σημείο Ανάφλεξης (°C): 130

Διαλυτότητα %σε διάφορες θερμοκρασίες /pH συνδυασμούς:

σε νερό: 20 °C Αδιάλυτο

σε έλαια: 25 ° 30% βαμβακέλαιο

40% σε έλαια καρύδας, καλαμποκιού, φυστικιού

50% λάδι σόγιας

σε διάλυμα αιθανόλης: 100% 25°C >25%

σε προπύλενο γκυκόλη: 20 °C 70%

Μέγιστη περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα: 10 ppm

Λειτουργία στα τρόφιμα: Ως συντηρητικό, εξαλείφοντας τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά την αυτοοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Παρουσιάζει επίσης και αντιμικροβιακή δράση ως φαινολικό σύμπλοκο.

Τρόφιμα στα οποία χρησιμοποιείται: Προϊόντα αρτοποιείου, κρέας, δημητριακά, μπαχαρικά, πουρές, μίγματα για επιδόρπιο, ξηρούς καρπούς, βιταμίνες, μαγιά, έλαια, ζωικά λίπη, επεξεργασμένα τυριά, μαργαρίνη, βάση τσίχλας

Ασφάλεια: Δεν έχει ακόμη αποδειχθεί η μη ασφαλής χρήση του. Παραταύτα κατηγορείται για την ανάπτυξη όγκων στα ζώα με προστόμαχο (αρουραίοι)

Νομοθεσία:

ΝΟΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΗΠΑ

Το μέγιστο επίπεδο που έχει εγκριθεί για γενική χρήση είναι FDA 0,02% και USDA 0,01% του βάρους του λίπους.

Ειδική προσθήκη σε τσίχλες, 0,01% του βάρους της βάσης της τσίχλας, και ξηρά υλικά ή ζύμες.

ΕΥΡΩΠΗ

Εγκρίνεται

ΚΑΝΑΔΑΣ

Εγκρίνεται

A2.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τερματιστές των ελευθέρων ριζών, χηλικά μεταλλικών ιόντων και δεσμευτές του οξυγόνου που αντιδρούν με το οξυγόνο σε κλειστά συστήματα. Πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά αντιδρούν με υψηλής ενέργειας ρίζες λιπιδίων για τη μετατροπή τους σε θερμοδυναμικά πιο σταθερά προϊόντα. Δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά γνωστά και ως προληπτικά αντιοξειδωτικά, λειτουργούν καθυστερώντας το ρυθμό της αλυσιδωτής αντίδρασης διασπώντας τα υπεροξείδια.

Υπάρχουν δυο είδη ταγίσματος που εμφανίζονται στο λίπος, η υδρολυτική τάγγιση και η αυτοξείδωση ή οξειδωτική τάγγιση. (Corpen, 1994)

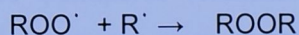
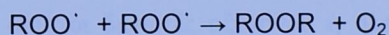
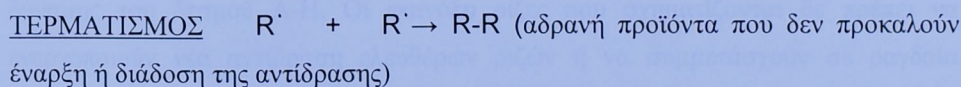
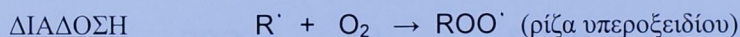
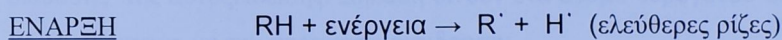
Υδρολυτική τάγγιση

Η υδρολυτική τάγγιση είναι λιγότερο συχνή από την οξειδωτική αλλά εμφανίζεται συχνά σε γαλακτώματα όπως είναι το βούτυρο, η μαργαρίνη, η κρέμα και σε ορισμένους ξηρούς καρπούς και μπισκότα. Για την διεξαγωγή της είναι απαραίτητη η παρουσία του νερού. Με την παρουσία του και μόνο η αντίδραση γίνεται με σχετικά αργό ρυθμό αλλά ειδικά ένζυμα που λέγονται λιπάσες ή αλλιώς λιπολυτικά ένζυμα επιταχύνουν το ρυθμό της σε μεγάλο βαθμό. Επειδή ορισμένα βακτήρια παράγουν αυτά τα ένζυμα, η παρουσία τους στα τρόφιμα μπορεί να προκαλέσει αυτού του είδους τάγγιση. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται από αυτή την υδρόλυση έχουν δυσάρεστη γεύση. Αυτό οφείλεται σε μερικό βαθμό στα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσού αλλά αυτή εξαφανίζεται καθώς αυξάνει το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας (πάνω από 14 άτομα άνθρακα).

Οξειδωτική Τάγγιση ή Αυτοξείδωση

Η αυτοξείδωση είναι η πιο συχνή τάγγιση που εμφανίζεται στα λίπη και στα έλαια. Η οξειδωτική τάγγιση των λιπών και των ελαίων είναι αποτέλεσμα της αυτοξείδωσης δηλαδή της αντίδρασης με το οξυγόνο. Η πρόσληψη οξυγόνου και οι αντιδράσεις που

ακολουθούν σχετίζονται με την ακορεστικότητα του λίπους γιατί και τα σκληρά λίπη ανθίσταται σε αυτού του είδους την οξειδωση αφού περιέχουν διπλούς δεσμούς. Συγκεκριμένα η αυτοοξείδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση που προχωράει με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών ενεργοποιείται από διάφορες πηγές ενέργειας όπως είναι η θερμότητα, το φως, η υπεριώδης ακτινοβολία, αλλά και από ίχνη μετάλλων όπως ο χαλκός και ο σίδηρος και από ορισμένα υπεροξειδία. Η αυτοοξείδωση έχει συνολικά τρία στάδια την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Το στάδιο της έναρξης ξεκινάει με την εμφάνιση των ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Στο στάδιο της διάδοσης κάθε σχηματιζόμενη ρίζα αντιδρά με ένα ουδέτερο μόριο και δίνει μια νέα ρίζα. Συγκεκριμένα τα στάδια είναι τα εξής:



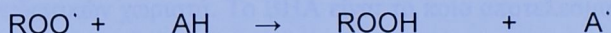
Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοοξείδωσης είναι τα υδρο-υπεροξειδία (ROOH). Αυτά δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, άλλα υδρο-υπεροξειδία και νέες ρίζες από το υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Από τα υπεροξειδία ή τα άλλα ενδιάμεσα προϊόντα σχηματίζεται ένα πλήθος οργανικών ενώσεων όπως αλδεΐδες, κετόνες και αλκοόλες. Από τις ενώσεις αυτές τα οξέα χαμηλού μοριακού βάρους και οι αλδεΐδες συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται με αυξανόμενο ρυθμό μέχρι να ταγγίσει όλο το λίπος ή μέχρι να

τελειώσει όλο το διαθέσιμο οξυγόνο ή μέχρι να αρχίσουν να αντιδρούν οι ελεύθερες ρίζες μεταξύ τους.

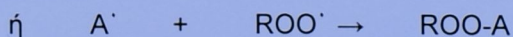
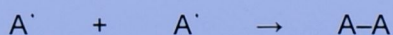
Η αυτοξειδωση είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία και μπορεί μόνο να καθυστερηθεί ο ρυθμός της αλλά δεν μπορεί να προληφθεί η εμφάνιση της. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να απορροφούν το οξυγόνο και επομένως να εμποδίζουν το σχηματισμό των ελευθερων ριζών με τη δημιουργία σταθερών ριζών.

Ρόλος των αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν διακόπτοντας τις αντιδράσεις διάδοσης παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Συγκεκριμένα εμποδίζουν την διαδικασία διάδοσης της αυτοξειδωσης. Δηλαδή δίνουν ένα άτομο υδρογόνου σε ελεύθερη ρίζα ROO[·] σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αποτελεσματικότητα των φαινολικών αντιοξειδωτικών αυξάνει με τη μείωση της δύναμης του δεσμού A-H. Οι φαινόξυ ρίζες που σχηματίζονται δε πρέπει να ενεργοποιούν νέα αντίδραση ελευθέρων ριζών ή να συμμετάσχουν σε ραγδαία οξείδωση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης. Σύμφωνα με αυτά τα φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι άριστοι δωρητές οξυγόνου ή ηλεκτρονίων και είναι σχετικά σταθερά εξαιτίας του φαινομένου *resonance delocalisation* και της απουσίας κατάλληλων περιοχών που να είναι επιδεκτικές στη δράση του οξυγόνου. Συγκεκριμένα οι φαινόξυ ρίζες που σχηματίζονται από την αντίδραση της φαινόλης με τη λιπιδική ρίζα σταθεροποιούνται με τον εκτοπισμό ασύζευγκτων ηλεκτρονίων γύρω από τον αρωματικό κύκλο με αποτέλεσμα να αδυνατούν να συνεχίσουν την αλυσιδωτή αντίδραση. Έτσι φαίνεται ότι καταλήγουν στο τερματισμό με τους παρακάτω μηχανισμούς:



Οι ρίζες αυτές δεν μειώνουν το ανώτερο βαθμό τάγγισης αλλά μεγεθύνουν την περίοδο έναρξης της τάγγισης ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. (Corpen 1994, Coultate 1996)

Συνεργεία

Σε μερικές περιπτώσεις έχει φανεί ότι ο συνδυασμός δυο ή περισσότερων αντιοξειδωτικών δρα καλύτερα από ότι η ισόποση χρήση ενός μόνου αντιοξειδωτικού. Αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός ως συνέργεια. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά υπάρχουν πολλές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών κατά την οξειδωτική διαδικασία οπότε είναι πιθανό τα αντιοξειδωτικά να διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητά τους σε διαφόρους μηχανισμούς. Συγκεκριμένα ο συνδυασμός του BHA με το BHT έχει μεγαλύτερη επίδραση στην αναστολή της οξείδωσης του λίπους από ότι η ισόποση συγκέντρωση των δυο αντιοξειδωτικών χωριστά. Το BHA είναι το πιο αποτελεσματικό όταν είναι μόνο του σε συγκεντρώσεις 100-200 ppm. Όμως ο συνδυασμός BHA με το BHT είναι καλύτερος από ότι το καθένα χωριστά.

Διάφορα σύμπλοκα οξέων όπως το κιτρικό οξύ, το φωσφορικό οξύ, το ασκορβικό οξύ και το EDTA αυξάνουν τη διάρκεια παραμονής στο ράφι ενός λίπους όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με αντιοξειδωτικό. Αυτά δεν είναι πραγματικά αντιοξειδωτικά και δεν εκδηλώνουν αντιοξειδωτική δράση σε λίπος από το οποίο όλα τα μέταλλα έχουν αφαιρεθεί. Αυτό συμβαίνει γιατί η δράση τους σχετίζεται με τη σύνδεση σε ίχνη μετάλλων τα οποία διαφορετικά θα προωθούσαν την οξειδωτική αντίδραση. (Corpen, 1994)

Α3.ΧΡΗΣΗ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Υπάρχουν πολλοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να μειωθεί ο ρυθμός αυτοοξειδωσης των τροφίμων εκτός από τη χρήση αντιοξειδωτικών όπως είναι το πακετάρισμα με εισαγωγή αέρα και η κατάψυξη. Πολλές φορές όμως δεν είναι δυνατή η χρήση αυτών των μεθόδων γιατί είναι δύσκολες και δαπανηρές. Αντίθετα τα αντιοξειδωτικά είναι εύκολα στη χρήση τους και οικονομικά. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να παρατείνουν το χρόνο ζωής του τροφίμου στο ράφι, να μειώσουν τις απώλειες θρεπτικών συστατικών (λιποδιαλυτές βιταμίνες) αναστέλλοντας και καθυστερώντας την οξειδωση και μπορούν να διευρύνουν το εύρος των λιπών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Δεν μπορούν όμως να βελτιώσουν την ποιότητα ενός ήδη οξειδωμένου προϊόντος γεγονός που είναι πολύ σημαντικό για το τεχνολόγο τροφίμων. Σύμφωνα με το USDA Code of Federal Regulations “Αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των τροφίμων καθυστερώντας την αποσύνθεση, το τάγγισμα ή τη δυσχρωμία οφειλόμενη στην οξειδωση.”

Για να χρησιμοποιηθεί ένα αντιοξειδωτικό ως πρόσθετο τροφίμων πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Να είναι ασφαλές
2. Να είναι άοσμο, άχρωμο και εύγευστο
3. Να είναι αποτελεσματικό σε μικρές συγκεντρώσεις
4. Να είναι εύκολη η ενσωμάτωση του στα τρόφιμα
5. Να είναι ανθεκτικό στις διαδικασίες μαγειρέματος όπως το βράσιμο και το τηγάνισμα.
6. Να είναι οικονομική η χρήση του
7. Να είναι να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό

Είναι πολύ σημαντικό να υπάρχει σταθερότητα στο αντιοξειδωτικό κατά τις διαδικασίες μαγειρέματος καθώς μεγάλες ποσότητες λιπών χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα που δέχονται πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να καταστρέψει το λίπος και επομένως να μειώσει τη σταθερότητα του. Αυτό όμως σε πολλές περιπτώσεις είναι δύσκολο καθώς πολλά προϊόντα όπως τα μπισκότα έχουν

κρούστα η οποία μεγαλώνει την επιφάνεια έκθεσης στον αέρα διευκολύνοντας την αυτοξείδωση. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούνται σε επεξεργασμένα τρόφιμα όπως μπισκότα, σνάκ και νούντλς. Η ικανότητα επιβίωσης του αντιοξειδωτικού σε υψηλές θερμοκρασίες λέγεται “carry-through property”.

Υπάρχουν κάποιες παρεξηγήσεις όσον αφορά τις δυνατότητες ενός αντιοξειδωτικού. Συγκεκριμένα ένα αντιοξειδωτικό δεν μπορεί:

1. Να βελτιώσει τη γεύση λιπών και ελαίων φτωχής ποιότητας
2. Να βελτιώσει το έλαιο που έχει ήδη υποστεί τάγγιση
3. Να αποτρέψει την αποσύνθεση του τροφίμου από τα μικρόβια
4. Να απότρεψει το υδρολυτικό τάγγισμα
5. Να αποτρέψει την κετονική τάγγιση
6. Να αποτρέψει την γευστική αλλοίωση

Όσον αφορά τη μικροβιακή αποσύνθεση το BHA εξαιτίας της φαινολικής του φύσης εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον του *Aspergillus parasiticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* και *Staphylococcus aureu*. Η μεγαλύτερη δράση είναι έναντι των μούχλων και των Gram + βακτηριών. Επίσης όσον αφορά την υδρολυτική τάγγιση, τα αντιοξειδωτικά δεν εμποδίζουν την παραγωγή των ελεύθερων λιπαρών οξέων που σχηματίζονται κατά την χημική υδρόλυση του λίπους. Το πρόβλημα εμφανίζεται κυρίως κατά το τηγάνισμα σε υψηλή θερμοκρασία όπου το νερό είναι παρόν και δεν υπάρχει κανένα προσθετικό τροφίμων για την αποτελεσματική εμπόδιση της εμφάνισης της. (Corpen 1994, Μποσκού 1997).

Δραστική χρήση αντιοξειδωτικών

Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα του αντιοξειδωτικού πρέπει αυτό να είναι ισοκατανεμημένο μέσα στο τρόφιμο το οποίο συνήθως είναι λίπος ή έλαιο. Η πιο κοινή μέθοδος είναι η προσθήκη του αντιοξειδωτικού κατευθείαν στο λίπος ή το έλαιο. Επειδή η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού στα τρόφιμα είναι πολύ μικρή, είναι δύσκολο να είναι ισοκατανεμημένο μέσα στο τρόφιμο. Η μόνη περίπτωση στην οποία αυτό μπορεί να γίνει είναι όταν το λίπος ή το έλαιο βρίσκεται σε υγρή φάση και διατηρείται στους 60-80 °C, αυξάνοντας έτσι την κινητικότητα του με αποτέλεσμα την καλύτερη διασπορά του αντιοξειδωτικού στο τρόφιμο. Στα έλαια αυτό μπορεί να συμβεί αμέσως μετά την απόσπηση τους. Έτσι είναι απαραίτητο να γίνεται ανάδευση για να εξασφαλίζεται η ισοκατανομή του αντιοξειδωτικού αλλά αυτή δεν πρέπει να γίνεται με βίαιο ρυθμό γιατί μπορεί να γίνει προσθήκη οξυγόνου κατά τη διαδικασία της ανάδευσης.

Άλλη μέθοδος με την οποία μπορεί να γίνει εισαγωγή του αντιοξειδωτικού στα τρόφιμα είναι με ψεκασμό καθώς περνάει το τρόφιμο από τις ιμάντες πριν το πακετάρισμα (uniform dispersion). Αυτή η μέθοδος μπορεί να είναι προβληματική αλλά μετριάζεται όταν το τρόφιμο πακετάρεται σε σφραγισμένες σακούλες που αποθηκεύονται για ορισμένο χρονικό διάστημα. (Corpen 1994, Proudlove 1994, Coultate 1996)

Μέθοδοι εισαγωγής αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα

1. Άμεση Εφαρμογή: Διαλύεται σε λίπος που έχει ζεσταθεί στους 60°C και γίνεται ήπια ανάμιξη για 20min για ομοιόμορφη κατανομή.
2. Μέθοδος Συγκέντρωσης: Σχηματίζεται συμπυκνωμένο διάλυμα αντιοξειδωτικού με διάλυση αυτού σε μικρή ποσότητα ζεσταμένου λίπους (93-121°C). Αυτό το διάλυμα μπορεί να προστεθεί κατευθείαν στο λίπος με καταμετρητή (metering).
3. Μέθοδος Ψεκασμού: Ένα διάλυμα αντιοξειδωτικού μπορεί να ψεκασθεί απευθείας στα τρόφιμα.

4. Άλλοι Μέθοδοι: Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναμιχθούν με καρυκεύματα για ζωικά προϊόντα όπως είναι τα λουκάνικα. Για τα δημητριακά μπορούν να προστεθούν στη γραμμή από κεριά των πακέτων.

Τυπικές εφαρμογές του ΒΗΑ

Το ΒΗΑ ως φαινολικό αντιοξειδωτικό, είναι κυρίως χρήσιμο για τη προστασία της γεύσης και του χρώματος των ελαίων και θεωρείται το πιο αποτελεσματικό για αυτή τη διαδικασία από όλα τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν. Το ΒΗΑ είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στον έλεγχο της οξείδωσης των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου και ως φαινολικό αντιοξειδωτικό υφίσταται υποβάθμιση κατά την οξείδωση με αποτέλεσμα να παράγονται διάφορα παραπροϊόντα, κυρίως διμερή, των αντιοξειδωτικών. Τα περισσότερα από τα παραπροϊόντα που παράγονται διατηρούν κάποια αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα προϊόντα του ΒΗΑ όμως είναι λιγότερο αποτελεσματικά από το ίδιο (Corpen, 1994).

Τα τρόφιμα στα οποία γίνεται η προσθήκη του ΒΗΑ είναι τα εξής:

- Λίπη και έλαια για επαγγελματική παρασκευή θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων
- Λίπη και έλαια για τηγάνισμα εκτός του πυρηνελαίου
- Χοίρινο λίπος (λαρδί), ιχθυέλαιο, λίπος βοοειδών, πουλερικών και προβάτων
- Μίγματα για παρασκευή γλυκισμάτων
- Σνακ με βάση τα σιτηρά
- Γάλα σε σκόνη για μίγματα πώλησης
- Αφυδατωμένες σούπες και ζωμοί
- Σάλτσες

- Αφυδατωμένο κρέας

- Επεξεργασμένοι ξηροί καρποί

- Αρτύματα και καρκεύματα

- Προμαγειρεμένα σιτηρά

- Αφυδατωμένες πατάτες

- Τσίχλες

- Διαιτητικά συμπληρώματα

Παρακάτω παρουσιάζονται διάφορες μελέτες που έχουν γίνει για την αξιολόγηση των BHA όσον αφορά τις επιπτώσεις που μπορεί να προκαλέσει στην υγεία του ανθρώπου (Alcubilla, 1993).

Μελέτες

1. Δοσικά το BHA μοιάζει με το υδροχολοστερόλιμικό φάρμακο προβιόλη. Έτσι στόχος της μελέτης ήταν να διαπιστωθεί αν το BHA μπορεί να μειώσει τη σύνθεση χοληστερόλης όπως η προβιόλη. Έτσι έγινε χορήγηση 0,75% BHA σε ποντίκια για δέκα ημέρες. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της χοληστερόλης του πλάσματος, η οποία ήταν σύγκριση με την αύξηση που παρατηρήθηκε από την χορήγηση 3% χοληστερόλης για επτά ημέρες συνεχόμενα. Υπήρχε όμως μείωση των ενζύμων *acyl CoA cholesterol acyltransferase* (ACAT) στα ηπατικά μικροσώματα. Έτσι τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η αύξηση χοληστερόλης πλάσματος που συνίσταται με χορήγηση BHA δεν συνδεόταν με αύξηση ηπατικής χοληστερόλης. Σημαντικότερό λοιπόν το BHA αυξάνει τη χοληστερόλη του πλάσματος με μηχανισμό που πιθανώς περιλαμβάνει τη μείωση πρόσληψη του BHA από το ήπαρ (Bellizzi & Gillette 1993).

A4. ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ

ΥΓΕΙΑ

Όσον αφορά τις επιδράσεις του BHA στην υγεία του ανθρώπου έχουν αναφερθεί τα εξής:

- Ορισμένα άτομα είναι αλλεργικά στο BHA ενώ σε κάποια αλλά παρατηρείται διαταραχή του μεταβολισμού των λιπών τους
- Ανεβάζει το επίπεδο των λιπιδίων και της χοληστερόλης
- Προκαλεί μείωση ορισμένων ενζύμων με αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών θρεπτικών συστατικών όπως η βιταμίνη D
- Στα παιδιά προκαλεί σύνδρομο υπερκινητικότητας

Παρακάτω παρουσιάζονται διάφορες μελέτες που έχουν γίνει για την αξιολόγηση του BHA όσον αφορά τις επιπτώσεις που μπορεί να προκαλέσει στην υγεία του ανθρώπου.(Aleuritou, 1993)

Μελέτες

1. Δομικά το BHA μοιάζει με το υποχοληστερολαιμικό φάρμακο προβοκόλη. Έτσι στόχος της μελέτης ήταν να διερευνήσει αν το BHA μπορεί να μειώσει τα επίπεδα χοληστερόλης όπως η προβοκόλη. Έτσι έγινε χορήγηση 0,75% BHA σε ποντίκια για δέκα ημέρες. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της χοληστερόλης του πλάσματος η οποία ήταν συγκρίσιμη με την αύξηση που παρατηρήθηκε από την χορήγηση 3% χοληστερόλης για επτά ημέρες συνεχόμενα. Υπήρχε όμως μείωση των ενζύμου acyl CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) στα ηπατικά μικροσώματα. Έτσι τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η αύξηση χοληστερόλης πλάσματος στα ποντίκια με χορήγηση BHA δεν συνοδεύτηκε από αύξηση ηπατικής χοληστερόλης. Συμπερασματικά λοιπόν το BHA αυξάνει τη χοληστερόλη του πλάσματος με μηχανισμό που πιθανώς περιλαμβάνει τη μειωμένη πρόσληψη του BHA από το ήπαρ (LeBlanc & Gillette 1993).

2. Ο στόχος μιας άλλης μελέτης ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της εμφάνισης ιατρικών συμπτωμάτων και της πρόσληψης προσθέτων τροφίμων. Για το σκοπό αυτό έγινε ανασκόπηση μελετών στο Medline από το 1996 έως το 1999 που αφορούν τα πρόσθετα (συμπεριλαμβανομένου και του BHA) και αναφέρονταν σε πιθανές παρενέργειες. Το συμπέρασμα ήταν ότι για το BHA δεν υπήρχε άρθρο που να το συσχετίζει με την εμφάνιση ιατρικών συμπτωμάτων με την πρόσληψη του. (Reus *et al.* 1999)
3. Το 1973 ο Benjamin Feingold δήλωσε ότι τα σαλικυλικά, οι συνθετικές χρωστικές και γευστικές ουσίες προκαλούν υπερδιέγερση στα παιδιά. Για την αποφυγή αυτής της διαταραχής ο Feingold πρότεινε ότι η διαίτα θα πρέπει να είναι ελεύθερη από τις παραπάνω ουσίες. Πρόσφατες οδηγίες από οπαδούς του προτείνουν ότι θα πρέπει να αποφεύγονται οι συνθετικές χρωστικές και γευστικές ουσίες, τα αντιοξειδωτικά BHA, BHT και TBHQ, τα προϊόντα που περιέχουν ασπιρίνη και τα προϊόντα με φυσικά σαλικυλικά καθώς αυτά σχετίζονται με την εμφάνιση διάφορων συμπτωμάτων. Πολλοί από τους γονείς που ακολούθησαν τις συμβουλές του Feingold δήλωσαν ότι είδαν βελτίωση στη συμπεριφορά των παιδιών τους. Όμως καλά σχεδιασμένες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν την υπόθεση ότι τα προσθετά τροφίμων είναι υπεύθυνα για την υπερκινητικότητα και αλλά συμπτώματα που παρατηρούνται στα παιδιά. Επειδή όμως η διαίτα του Feingold δεν έχει αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου μπορεί να είναι αποτελεσματική σε κάποιες περιπτώσεις (Barrett, 2004).
4. Μελέτη που είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της πρόσληψης τ BHA και άλλων ξενοβιοτικών στα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα και στις ηπατικές δράσεις του ένζυμου σύνθεσης της χοληστερόλης σε αρουραίους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χοληστερόλη πλάσματος ήταν σημαντικά αυξημένη στο πλάσμα των αρουραίων που πήραν BHA σε σχέση με αυτά που ακολούθησαν διαίτα κοντρόλ για επτά ημέρες. Έτσι οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αυξημένη συγκέντρωση της χοληστερόλης πλάσματος που παρατηρήθηκε οφείλεται μάλλον στην ενεργοποίηση της ηπατικής σύνθεσης της χοληστερόλης. (Nagaoka *et al.* 1986)
5. Ο στόχος της μελέτης που έγινε από τους Wilson *et al.* (1978) ήταν η αξιολόγηση των επιδράσεων μεγάλων ποσοτήτων βιταμίνης E, BHA και BHT σε κουνέλια που ακολούθησαν διαίτα χαμηλή σε χοληστερόλη αλλά αθηρογονική και ο εντοπισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης σε αθηροσκληρωτικές κακώσεις. Τα

κουνέλια ακολούθησαν δίαιτα αθηρογονική με βούτυρο ή βασική δίαιτα μαζί με 1.0% βιταμίνη E ή 0,1% BHA και 0,1% BHT για τρία χρόνια ενώ η ομάδα κοντρόλ ακολούθησε βασική δίαιτα με καλαμποκέλαιο αντί για βούτυρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αορτικές και οι στεφανιαίες αθηροσκληρώσεις ήταν πιο συχνές και εκτεταμένες σε κουνέλια που ακολούθησαν τη βασική δίαιτα ή τη βασική με BHA και BHT σε σχέση με τη βασική δίαιτα που ήταν εμπλουτισμένη με βιταμίνη E ή με την αρνητική κοντρόλ.

6. Δύο ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθή ουρτικάρια είχαν έξαρση των συμπτωμάτων τους όταν συμμετείχαν σε διπλή τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με placebo με BHA και BHT. Μετά από περιορισμό του BHA και του BHT από τη δίαιτα των εξεταζόμενων, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη συχνότητα, τη σοβαρότητα και τη διάρκεια των συμπτωμάτων της ουρτικαρίας. Έτσι φαίνεται ότι τα αντιοξειδωτικά αυτά επιδεινώνουν τα συμπτώματα σε ασθενείς με χρόνια ουρτικάρια. (Goodman *et al.* 1990).

Από τις παραπάνω μελέτες φαίνεται ότι όντως το BHA μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα των αρουραίων, των ποντικών και των κουνελιών. Δεν αναφέρεται όμως η επίδραση του BHA στη χοληστερόλη πλάσματος του ανθρώπου. Επίσης δεν υπάρχουν καλά σχεδιασμένες μελέτες που να υποστηρίζουν την υπόθεση του Feingold και επιπλέον μελέτη που έκανε ανασκόπηση στο Medline δεν βρήκε κανένα άρθρο που να συσχετίζει την πρόσληψη του BHA με την εμφάνιση ιατρικών συμπτωμάτων. Σημαντικό βέβαια είναι το εύρημα ότι το BHA προκαλεί έξαρση των συμπτωμάτων σε ασθενείς με ουρτικάρια.

A5. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Η Κοινή Επιτροπή Εμπειρογνώμων (JECFA) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) και του Οργανισμού Γεωργίας και Τροφίμων (FAO) συναντήθηκε για πρώτη φορά το 1956 για την σύνταξη γενικών αρχών σχετικά με τη χρήση των προσθέτων τροφίμων (FAO 1950). Εκεί προτάθηκε ότι η πρόσληψη ενός προσθέτου θα πρέπει να είναι κάτω από οποιοδήποτε επίπεδο που μπορεί να είναι επιβλαβής για τους καταναλωτές. Θεωρήθηκε ότι είναι απαραίτητο ο καθορισμός ενός ασφαλούς ορίου χρήσης ενός προσθέτου στα τρόφιμα. Έτσι καθιερώθηκε το ADI (Acceptable Daily Intake) που είναι η μέση πρόσληψη της ποσότητας μιας ουσίας στα τρόφιμα ή στο πόσιμο νερό που μπορεί να είναι προσλαμβάνεται καθημερινά κάθ' όλη τη διάρκεια της ζωής χωρίς να ενέχει κινδύνους στην υγεία του ανθρώπου.

Όσον αφορά την νομοθεσία για τη χρήση του ΒΗΑ έχει εκδοθεί η οδηγία 2000/63/EK της επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων για την τροποποίηση της οδηγίας 96/77/EK περί θεσπίσεως ειδικών κριτηρίων καθαρότητας για τα προσθετά τροφίμων πλην των χρωστικών και των γλυκαντικών υλών. Έτσι έχοντας υπόψη η επιτροπή την συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, την οδηγία 89/107/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 21^{ης} Δεκεμβρίου 1988, για τη προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα προσθετά που επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα που προορίζονται για την ανθρώπινη διατροφή, όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 94/34/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, και ιδίως το άρθρο3, μετά από διαβούλευση με την επιστημονική επιτροπή για την ανθρώπινη διατροφή και εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Είναι αναγκαίο να θεσπιστούν κριτήρια καθαρότητας για όλα τα προσθετά πλην των χρωστικών και γλυκαντικών υλών που αναφέρονται στην οδηγία 95/2/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 20^{ης} Φεβρουάριου 1995, για τα προσθετά τροφίμων πλην των χρωστικών και των γλυκαντικών υλών, όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 98/72/EK.

(2) Η οδηγία 96/77/EK της Επιτροπής, της 2ας Δεκεμβρίου 1996, περί θεσπίσεως ειδικών κριτηρίων καθαρότητας για τα προσθετά τροφίμων πλην των χρωστικών και των γλυκαντικών υλών, όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 98/86/EK ,θεσπίζει κριτήρια καθαρότητας για ορισμένα προσθετά τροφίμων η εν λόγω

οδηγία θα πρέπει τώρα να συμπληρωθεί με κριτήρια καθαρότητας για τα υπόλοιπα προσθετά τροφίμων που αναφέρονται στην οδηγία 95/2/EK.

(3) Είναι αναγκαίο, υπό το φως των τεχνικών εξελίξεων, να τροποποιηθούν τα κριτήρια καθαρότητας που προβλέπονται στην οδηγία 96/77/EK για τη βουτυλοϋδροξυανισόλη ΒΗΑ). Είναι συνεπώς αναγκαίο να προσαρμοστεί αυτή η οδηγία.

(4) Είναι αναγκαίο να ληφθούν υπόψη οι προδιαγραφές και οι αναλυτικές τεχνικές για τα προσθετά Codex Alimentarius που έχει καταρτίσει η κοινή επιτροπή εμπειρογνομόνων του FAO/WHO για τα προσθετά τροφίμων (JECFA)

(5) Σε περίπτωση κατά την οποία τα προσθετά τροφίμων παρασκευάζονται με μεθόδους παραγωγής ή από πρώτες ύλες σημαντικά διαφορετικές από εκείνες που καλύπτει η αξιολόγηση της επιστημονικής επιτροπής τροφίμων ή διαφέρουν από τα αναφερόμενα στην παρούσα οδηγία, πρέπει να παραπέμπονται για πλήρη αξιολόγηση στην εν λόγω επιτροπή με ιδιαίτερη έμφαση στα κριτήρια καθαρότητας.

(6) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής τροφίμων.

Εξέδωσε την παρακάτω οδηγία

άρθρο 1

Η οδηγία 96/77/EK τροποποιείται ως ακολούθως:

* Στο παράρτημα, το κείμενο για το E320–βουτυλοϋδροξυανισόλη αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος 1 της παρούσας οδηγίας.

Βρυξέλλες, 5 Οκτωβρίου 2000 .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

E 320 ΒΟΥΤΥΛΟΥΔΡΟΞΥΑΝΙΣΟΛΗ (ΒΗΑ)

Συνώνυμα	BHA
Ορισμός <i>Χημικές ονομασίες</i>	3-tert-βουτυλο-4-υδροξυανισόλη ,Μίγμα 2-tert-βούτυλο-4-υδροξυανισόλης και 3-tert-βούτυλο-4-υδροξυανισόλης
EINECS	246-563-8
<i>Χημικός τύπος</i>	C ₁₁ H ₁₆ O ₂
<i>Τυπικό βάρος</i>	180,25
<i>Δοκιμασία</i>	Περιεκτικότητα 98.5% τουλάχιστον σε C ₁₁ H ₁₆ O ₂ και 85% τουλάχιστον σε ισόμερες 3-tert-βούτυλο-4-υδροξυανισόλης
<i>Περιγραφή</i>	Κρύσταλλοι ή κηρώδης στέρεο ,λευκού ή υποκίτρινου χρώματος με ελαφρώς αρωματική οσμή
Ταυτοποίηση	
A.Διαλυτότητα	Αδιάλυτο στο νερό ,ευδιάλυτο σε αιθανόλη
B.Πεδίο τιμών σ.τ.	Μεταξύ 48 °C και 63 °C
Γ.Χρωστική αντίδραση	Υποβάλλεται σε δόκιμη για φαινολομάδες
Καθαρότητα <i>Θετική τεφρά</i>	0,05% κατ'ανώτατο όριο έπειτα από πύρωση στους 800 ±25 °C
<i>Φαινολικές προσμίξεις</i>	0,5% κατ'ανώτατο όριο
<i>Ειδική απορρόφηση</i>	Τουλάχιστον 190 και όχι μεγαλύτερη από 210 (290nm)
<i>Ειδική απορρόφηση</i>	Τουλάχιστον 326 και όχι μεγαλύτερη από 345 (228 nm)
Αρσενικό	3 mg/Kg κατ'ανώτατο όριο
Μόλυβδος	5 mg/Kg κατ'ανώτατο όριο
Υδράργυρος	1 mg/Kg κατ'ανώτατο όριο

Σύμφωνα με την απόφαση ΑΧΣ 412/99 ,ΦΕΚ 1964/Β/1.11.99 τα ανώτατα επίπεδα για το ΒΗΑ (E320) στα τρόφιμα στα οποία επιτρέπεται η προσθήκη του είναι τα εξής

τρόφιμα	ανώτατα επίπεδα
Λίπη και έλαια για επαγγελματική Παρασκευή θερμικός επεξεργασμένων τροφίμων	200 * (εστέρες του γαλλικού οξέος και BHA, μόνα ή σε συνδυασμό)
Λίπη και έλαια για τηγάνισμα ,εκτός του πυρηνελαίου	100* BHT
Χοιρινό λίπος (λαρδί), ιχθυέλαιο, λίπος βοοειδών, πουλερικών και πρόβατων	εκφρασμένα και τα δυο επί λιπαρών ουσιών
Μίγματα για Παρασκευή γλυκισμάτων Σνακ με βάση τα σιτηρά Γάλα σε σκόνη για μηχανήματα πωλήσεως Αφυδατωμένες σούπες και ζωμοί Σάλτσες Αφυδατωμένο κρέας Επεξεργασμένοι ξηροί καρποί Αρτύματα και καρυκεύματα Προμαγειρευμένα σιτηρά	200 (εστέρες του γαλλικού οξέος και BHA, μόνα ή σε συνδυασμό) εκφρασμένα και τα δυο επί λιπαρών ουσιών
Αφυδατωμένες πατάτες	25 (εστέρες του γαλλικού οξέος και BHA, μόνα ή σε συνδυασμό)
Τσίχλες Διαιτητικά συμπληρώματα	400 (εστέρες του γαλλικού οξέος, BHT και BHA, μόνα ή σε συνδυασμό)

* Αναφορά στον κανόνα της αναλογικότητας δηλαδή όταν χρησιμοποιούνται συνδυασμοί εστέρων του γαλλικού οξέος, BHA και BHT ,τα επιμέρους επίπεδα πρέπει να μειώνονται κατά αναλογία. (ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΥΛΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ)

A6. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Μελέτες σε ζώα που δείχνουν την καρκινογενετικότητα του BHA

1. Η πρώτη μελέτη που ανέφερε την ύπαρξη καρκινογενετικής δράσης του BHA έγινε από τους Ito *et al.* (1982, 1983a). Χρησιμοποίησαν αρχικά συγκεντρώσεις των 5000ppm και 20000ppm BHA σε δίαιτα έξι εβδομάδων για θηλυκού και αρσενικούς F344 αρουραίους και μετά τις μείωσε σε 2500 και 10,200ppm για δυο χρόνια. Στη συνέχεια μετρήθηκε η πρόσληψη τροφής και βρέθηκε ότι η τελική ημερήσια πρόσληψη του BHA ήταν 98 και 414mg/Kg/ημ για τα αρσενικά και 108 και 474 mg/Kg/ημ για τα θηλυκά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εμφάνιση αναπαραγωγικών κακώσεων στο προστόμαχο των ομάδων αρουραίων υψηλής

δόσης ήταν 100% για υπερπλασία στα αρσενικά και 98% στα θηλυκά. Η εμφάνιση παпилωμάτων ήταν 100% στα αρσενικά και 96,1% στα θηλυκά ενώ η παρουσία λεπιοειδούς καρκινώματος στο προστόμαχο των αρουραίων ήταν 34,6% στα αρσενικά και 29,4% στα θηλυκά. Στην ομάδα χαμηλής δόσης δεν υπήρχαν καρκινώματα, μόνο 2% παпилωματα και στα δυο φυλά και 26% και 19,6% υπερπλασία στα αρσενικά και θηλυκά αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο προστόμαχο των ομάδων μαρτύρων.

2. Στη συνέχεια οι Ito *et al.* (1986) μελέτησαν περαιτέρω τη σχέση δόση-απόκρισης του BHA στο σχηματισμό νεοπλασίας στο προστόμαχο αρουραίων F344 ηλικίας έξι εβδομάδων. Οι δόσεις που δόθηκαν ήταν 0, 1250, 2500, 5000, 10000 και 20000ppm BHA σε δίαιτα για 104 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η εμφάνιση υπερπλασίας, παпилωμάτων και λεπιοειδούς καρκινώματος παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη αύξηση, με NOEL (no observed effect level) για το BHA στα 1250 ppm για υπερπλασία, 5000 ppm για παпилωματα και 10000 ppm για εμφάνιση καρκινώματος.
3. Οι Ito *et al.* (1983b) και ο Masui *et al.* (1986) ανέφεραν ότι αρουραίοι F344 ηλικίας 6 εβδομάδων και συριανά χρυσά χαμστεράκια ανέπτυξαν υπερπλασία, παпилωματα και καρκινώματα στο προστόμαχο όταν τους δόθηκε 20000 ppm BHA σε δίαιτα για 104 εβδομάδες. Ενώ δόση 10000 ppm προκάλεσε παρόμοιες κακώσεις στα αστεράκια αλλά στους αρουραίους μόνο υπερπλασία και παпилωματα είχαν εμφανιστεί.
4. Οι επιδράσεις της δόσης των 12000 ppm BHA σε δίαιτα για 110 εβδομάδες σε αρσενικούς F344 αρουραίους ηλικίας έξι ή έντεκα εβδομάδων μελετήθηκε από τους Williams (1986) και Williams *et al.* (1990b). Στους 20 μήνες, από ζώα που είχαν πεθάνει υπήρχε μόνο ένα περιστατικό εμφάνισης παпилωματος οδηγώντας σε πιθανότητα εμφάνισης 4% (Williams 1986). Στο τέλος της μελέτης όταν η επιβίωση ήταν 63% ,υπήρχε σημαντική εμφάνιση παпилωματος (Williams *et al* 1990b). Δεν υπήρχε αύξηση σε κανένα όγκο σε αλλά όργανα όπως στο αδενικό τμήμα του στόμαχου και κυρίως δεν υπήρχαν κακώσεις στον οισοφάγο.
5. Οι Amo *et al.* (1990) έκανε μελέτη πάνω σε Γιαπωνέζικα house musk shrews τα οποία δεν έχουν προστομαχο. Το BHA δόθηκε και στα δυο φυλά για 80 εβδομάδες σε δόσεις 0,5, 1.0 και 2% BHA σε δίαιτα. Οι ομάδες της μεσαίας και της υψηλής δόσης είχαν 50-67% εμφάνιση αδενοματωδούς υπερπλασία στο πνεύμονα σε σύγκριση με το 0-3% των κοντρόλ ενώ ένα ζώο από την ομάδα της

- χαμηλής δόσης και δυο ζώα από την ομάδα μεσαίας δόσης είχαν αδένωμα πνεύμονος. Δεν υπήρχαν σημαντικά ευρήματα όγκων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε κανένα από τους ιστούς που είχαν εξετασθεί.
6. Οι Takahashi *et al.* (1986) βρήκαν ότι το BHA εμφανίζει σε δόσεις 1% και 2% δράση προαγωγής για τον καρκίνο προστομαχου από τη καρκινογόνο ουσία N-μέθυλ-N'-νίτρο-N-νιτροζογουανιδίνη (MNNG) σε αρσενικούς αρουραίους Wistar που δόθηκε σε πόσιμο νερό μαζί με NaCl.
 7. Μια μελέτη της σχέσης δόσης-απόκρισης που έγινε από τους Williams (1986) και Whysner *et al.* (1994) σε ηλικίας έξι εβδομάδων αρσενικούς αρουραίους F344, εξέτασε την επίδραση διάφορων δόσεων του BHA με εύρος από 60-12000ppm, ξεκινώντας 3 εβδομάδες μετά από τη χορήγηση μόνης δόσης 200mg/Kg του καρκινογόνου MNNG και συνεχίζοντας καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής ή μέχρι το χρόνο τερμάτισης της ζωής του που έγινε στις 110 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δε βρέθηκε καμία ενίσχυση του καρκίνου που είχε προκληθεί από το MNNG στο αδενικό τμήμα του στόμαχου σε καμία από τις δόσεις εύρους του BHA. Στο προστόμαχο όμως η χορήγηση των 6000 ppm BHA και των 12000 ppm BHA αλλά όχι των 3000 ppm BHA ή λιγότερο, αύξησε σημαντικά την εμφάνιση λεπιοειδούς καρκινώματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στις 600 ημέρες της μελέτης. Χαμηλότερες δόσεις μείωσαν την εμφάνιση όγκων λόγω MNNG στις 600 ημέρες και αυτή η επίδραση ήταν στατιστικά σημαντική. Δεν εμφανίστηκαν όγκοι στον οισοφάγο ή σε άλλα όργανα που να σχετίζονταν με τη χορήγηση του BHA.
 8. Μελέτη που έγινε από τους Sakai *et al.* (1997) είχε σαν σκοπό την αξιολόγηση του BHA όσον αφορά την ενισχυτική του δράση στη μεταμόρφωση εμβρυϊκών κύτταρων ποντικού που έχει προκληθεί από τη 3-μεθυλοχολανθρίνη (MCA). Το BHA χορηγήθηκε σε δόσεις με εύρος από 5-20μg/mL. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το BHA ενίσχυσε τη μεταμόρφωση των κύτταρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο στις παραπάνω συγκεντρώσεις. Όταν όμως το BHA προστέθηκε σε καλλιέργειες που βρισκόταν είτε στο στάδιο της έναρξης είτε στο στάδιο της διάδοσης με απουσία αλλού ενισχυτή ή προαγωγέα, δεν αυξήθηκε η συχνότητα μεταμόρφωσης, πράγμα που δείχνει ότι οι μεταμορφωτικές ιδιότητες του BHA είναι πολύ ασθενής και χρειάζονται το συνδυασμό ενός δυνητικού προαγωγέα ή ενισχυτή για να προκαλέσουν πλήρη μεταμόρφωση.

9. Έχειδειχθείότι το BHA το οποίο είναι ενεργοποιητής του ένζυμου DT-diaphorase όταν δοθεί σε αρουραίους προστατεύει έναντι των επιβλαβών επιδράσεων της 2-μεθυλ-1,4-ναφθοκινόνης. Σε μελέτη που έγινε από τους Munday *et al.* (1999) χορηγήθηκε σε αρουραίους BHA μέσω σωλήνα σε ομάδες έξι αρουραίων σε δόση 500mg/Kg/day για εννέα συνεχόμενες ημέρες. Για τη μελέτη της επίδρασης του BHA στη δράση του ένζυμου DT-diaphorase, τα ζώα θανατώθηκαν μετά από 24ωρες μετά από τη τελική δόση. Επίσης ένα μέρος του ήπατος μαζί με τα νεφρά και το σπλήνα χρησιμοποιήθηκαν για μελέτη. Μετά για τη μελέτη της επίδρασης του BHA στη τοξικότητα της 2-μεθυλ-1,4-ναφθοκινόνης, δόθηκε σε ομάδες κοντρόλ και σε ομάδες μελέτης με σωλήνα από το στόμα τοξική δόση 3000μmol/Kg 2-υδροξυ-1,4-ναφθοκινόνη μια ουσία που προκαλεί αιμολυτική αναιμία και νεφρικές κακώσεις σε ζωντανούς οργανισμούς, μετά από τη τελική δόση του BHA και θανατώθηκαν τέσσερις ημέρες αργότερα. Η προθεραπεία με BHA δεν είχε καμία επίδραση πάνω στη νεφροτοξικότητα της 2-μεθυλ-1,4-ναφθοκινόνης αλλά η σοβαρότητα της αιμόλυσης που προκαλείται από αυτήν την τοξική ουσία αυξήθηκε στα ζώα που είχαν δεχθεί BHA. Όσον αφορά την επίδραση του πάνω στις δράσεις του ενζύμου, παρατηρήθηκαν αυξήσεις του στο ήπαρ και στο προστόμαχο.
10. Σε μελέτη που έγινε το 2002 από Sasaki *et al.* αξιολογήθηκε η γενοτοξικότητα 39 διαφορετικών προσθέτων τροφίμων. Μελετήθηκαν ομάδες τεσσάρων αρσενικών ποντικών και δόθηκε από το στόμα ένα προσθετό τροφίμων κάθε φορά σε δόση έως 0,5XLD₅₀ ή σε περιορισμένη δόση των 2000mg/Kg. Μετά έγινε ανάλυση του αδενικού τμήματος του στομάχου, του εντέρου, του ήπατος, του πνεύμονος, των νεφρών, της ουροδόχου κύστης, του εγκεφάλου και του μυελού των οστών 3 και 24ωρες μετά την αγωγή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αντιοξειδωτικό BHA και αλλά αντιοξειδωτικά προκάλεσαν κάκωση στο γενετικό υλικό των γαστρεντερικών οργάνων. Συγκεκριμένα προκάλεσαν ζημία στο γενετικό υλικό του αδενικού στομάχου και του εντέρου τρεις ώρες μετά από τη χορήγηση του. Οι χαμηλότερες δόσεις του BHA που προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της ζημίας ήταν 500mg/Kg. Έτσι το BHA έδειξε να είναι γενοτοξικό στα γαστρεντερικά όργανα του ποντικού, δείχνοντας έτσι την ανάγκη να γίνουν επιπλέον μελέτες για να αποφασισθεί αν ενδείκνυται η συνέχιση της χρήσης του στα τρόφιμα.

Αντικαρκινικές μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα

1. Οι Williams *et al.* (1986) έδειξαν ότι η χορήγηση μιας δόσης 1000 ppm BHA σε αρουραίους ξεκινώντας μια εβδομάδα πριν από τη χορήγηση της ηπατοτοξικής ουσίας αφλατοξίνης B1 (AFB1) και συνεχίζοντας για μια εβδομάδα μετά από την υπότροπη, μειώνεται ο σχηματισμός νεοπλασίας στο ήπαρ.
2. Σε επακόλουθη μελέτη το BHA σε δόση 125 ppm ανέστειλε την έναρξη ηπατοκαρκινογένεσης από την τοξίνη AFB1 σε αρουραίους που είχαν μελετηθεί πάνω από 42 εβδομάδες (Williams & Iatropoulos, 1996). Έτσι φάνηκε από τη μελέτη αυτή ότι οι χημειοπροστατευτικές ιδιότητες του BHA εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 1000 ppm όπως είναι 125 ppm.
3. Η μελέτη του Hirose *et al.* (1997) έδειξε ότι το BHA σε δίαιτα σε δόση 800 ppm φάνηκε να προστατεύει έναντι του σχηματισμού καρκινώματος του παχέος εντέρου που προκαλείται από καρκινογόνες ουσίες.
4. Μελέτη που έγινε πάλι από τον Hirose *et al.* (1991) έδειξε ότι η προ-θεραπεία αρσενικών αρουραίων F344 με 2% BHA για δυο εβδομάδες μείωσε την πιθανότητα εμφάνισης λεπιοειδούς καρκινώματος του οισοφάγου που είχε προκληθεί από την χορήγηση 0,025 % DBN σε πόσιμο νερό.
5. Το BHA όπως φάνηκε από μελέτη που έγινε από McCormick *et al.* (1984) μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό όγκου μετά από την χορήγηση καρκινογόνου. Συγκεκριμένα χορηγήθηκε μόνη δόση των 8mg της 3,2-διμεθυλ-4-αμινο-διφαινόλης σε 50 ημερών αρουραίους τύπου Sprague-Dawley. Μια εβδομάδα αργότερα δόθηκαν 0,25% και 0,5% BHA σε δίαιτα για 29 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε σημαντική μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου στους μαστικούς αδένες στην ομάδα του 0,5% BHA σε σχέση με την ομάδα κοντρόλ.
6. Σε μελέτη που έγινε από τους Ikeda *et al.* (1986) σε αρσενικά και θηλυκά κυνηγετικά σκυλιά στα οποία δόθηκαν 1,0 και 1,3% BHA για 180 ημέρες δε βρέθηκαν κακώσεις στο στόμαχο ή στον οισοφάγο από την αξιολόγηση με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Σε άλλη μελέτη πάνω στα ίδια ζώα, δόθηκε 1,0% BHA για έξι μήνες και δεν βρέθηκε καμία παθολογική επίδραση στο

στόμαχο, στον οισοφάγο, στο δωδεκαδάκτυλο ή στο ήπαρ μετά από χορήγηση BHA (Tobe *et al.* 1986).

7. Στο Καναδά έγινε μελέτη σε πιθήκους (Iverson *et al.* 1985, 1986). Όπως και οι άνθρωποι τα ζώα αυτά δεν έχουν προστόμαχο παρόλο που ο κυτταρικός του τύπος μοιάζει με αυτό του οισοφάγου. Το BHA χορηγήθηκε σε έλαιο σε συγκέντρωση 125mg/Kg και σε μέγιστη ανεκτή δόση των 250mg/Kg. Υψηλότερη δόση δε μπορούσε να χορηγηθεί καθώς προκαλούσε έμμεση. Ιστοπαθολογικά μετά από 12 εβδομάδες χορήγηση BHA δεν εμφανίστηκαν αλλαγές στο στόμαχο ή στον οισοφάγο αλλά υπήρχε διπλασιασμός του μιτωτικού δείκτη στον οισοφάγο κοντά στη καρδιά. Επίσης υπήρχε αύξηση του βάρους του ήπατος αλλά η ενζυμική του δραστηριότητα παρέμεινε φυσιολογική. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονταν άμεσα σε αντιπαράθεση με τις παθολογικές επιδράσεις που είχαν αναφερθεί για το BHA.
8. Οι Fukushima *et al.* (1987) και Uwagawa *et al.* (1992) ανέφεραν ότι το BHA δεν προωθεί την ανάπτυξη καρκίνου του οισοφάγου ή την εμφάνιση υπερπλασίας όταν χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικές προαγωγικές ουσίες του καρκίνου αλλά η προ-θεραπεία με BHA έχει φανεί ότι μειώνει την εμφάνιση όγκων που προκαλείται από το καρκινογόνο DBN όταν είναι μόνο του.
9. Σε μια ερευνά μελετήθηκε η επίδραση του BHA στην αναστολή της ανάπτυξης του καρκίνου του πνεύμονα από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες που είναι συστατικά του καπνού, σε ποντίκια A/J. Χορηγήθηκε το BHA σε δόση 13,4 μmol (υψηλή δόση) ή σε δόση 6,7 μmol (χαμηλή δόση) σε ποντίκια στα οποία είχαν εισαχθεί 3 μmol BaP (πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας). Το BHA μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό του όγκου του πνεύμονα κατά 54% (υψηλή δόση) και 37% (χαμηλή δόση). Έτσι φάνηκε ότι το BHA μπορεί να περιέχει κάποια στοιχεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αντικαρκινική θεραπεία. (Hecht *et al.* 2002)
10. Οι δυνητικές δράσεις του BHA ως χημειοπροστατευτικό μόριο έναντι του σχηματισμού καρκίνου πνεύμονας από καρκινογόνα καπνού μελετήθηκε από τον Hecht *et al.* (1999). Ομάδες 20 ποντικών εκτέθηκαν σε καρκινογόνες ουσίες του καπνού για 8 εβδομάδες και θυσιάστηκαν μετά από 26 εβδομάδες. Στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν 20 ή 40 μmol BHA με καθετήρα 2 ώρες πριν από τη κάθε δόση των καρκινογόνων BaP και NNK παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού του όγκου του πνεύμονα. Η χορήγηση όμως του BHA μια

εβδομάδα μετά από την έκθεση στα καρκινογόνα του καπνού δεν είχε καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό του όγκου. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι το BHA είναι σημαντικός αναστολέας της καρκινογένεσης που προκαλείται από τα καρκινογόνα του καπνού όταν δοθεί κατά τη διάρκεια έκθεσης στα καρκινογόνα και όχι μετά από αυτήν.

11. Ο παράγοντας- α νέκρωσης όγκου (TNF- α) και η αγγειοτενσίνη 2 πιθανόν να προκαλούν καρδιακή μυοκυτταρική υπερτροφία μέσω των ενδιάμεσων αντιδρώντων οξυγόνου (Gilbert *et al.* 1994, Beltrami *et al.* 1994). Έτσι για να εξετασθεί αυτή η υπόθεση και επιπλέον εάν το αντιοξειδωτικό BHA μπορεί να αναστείλει την υπερτροφία στα καρδιακά μυοκύτταρα έγινε μελέτη σε νεογνήντους αρουραίους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο παράγοντας α - νέκρωσης όγκου και η αγγειοτενσίνη 2 μεγέθυναν τα καρδιακά μυοκύτταρα και αύξησαν τη πρόσληψη της λεύκινης ενώ το BHA (10 μ mol/L) μείωσε σημαντικά αυτές τις δυο επιδράσεις. Έτσι η μελέτη αυτή έδειξε ότι το BHA μπορεί να προλαμβάνει τη μεγέθυνση των μυϊκών κύτταρων της καρδιάς και την αύξηση της πρωτεΐνης που προκαλείται από το παράγοντα- α νέκρωσης όγκου και την αγγειοτενσίνη 2 (Nakamura *et al.* 1998).
12. Οι Slamenova *et al.* (2003) μελέτησαν τους πιθανούς μηχανισμούς της αντιμεταλλαξιογόνου δράσης του BHA διερευνώντας τις επιδράσεις του σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε MNNG και έχουν απομονωθεί από κινεζικό χαμστερακι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρόλο που η υψηλότερη δόση του BHA (0,5mM) αύξησε την τοξικότητα του MNNG ενώ η χαμηλότερη δόση του BHA (0,25) δεν είχε καμία επίδραση, και οι δυο συγκεντρώσεις είχαν αντιμεταλλαξιογόνες δράσεις στα κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε MNNG, με μεγαλύτερη επίδραση να εμφανίζεται στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Έτσι τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προστατευτική δράση του BHA έναντι της μετάλλαξης που προκαλείται από το MNNG εξηγείται καλύτερα με το μηχανισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του BHA.
13. Σε μια μελέτη που έγινε από τους Mizutani και Miyamoto (1999), ποντίκια ακολούθησαν δίαιτα με 0,5% BHA για τρεις ημέρες. Το BHA είναι ενεργοποιητής του ένζυμου DT-diaphorase το οποίο θεωρείται ότι συμμετέχει στις αντιδράσεις αποτοξίνωσης ηπατοτοξικών ουσιών (Lind *et al.* 1982, Cadenas 1995). Μετά από τη χορήγηση του BHA, δόθηκε στα ποντίκια βρωμοβενζόλιο (2.5 ή 3.5 mmol/Kg) και 1,2,4-τριχλωροβενζόλιο (0,75 ή 1.5mmol/Kg) οι οποίες

είναι ηπατοτοξικές ουσίες. Το BHA μείωσε σημαντικά την ηπατοτοξικότητα που προκλήθηκε από τις παραπάνω ουσίες και συγκεκριμένα κατά την χορήγηση του βρωμοβενζολίου σε διάφορες χρονικές στιγμές. Μετά από την υιοθέτηση της διαίτας με BHA τα ποντίκια είχαν πλήρως ή μερική προστασία από την ηπατοτοξικότητα της ουσίας.

14. Σε μελέτη που έγινε από Soni *et al.* (1997) διερευνήθηκε η επίδραση του BHA στη μείωση της μεταλλακτικότητας και της ηπατοκαρκινογενετικότητας που προκαλείται από την αφλατοξίνη B1. Για το σκοπό αυτό το BHA και αλλά προσθετά δόθηκαν μια εβδομάδα πριν από τη χορήγηση του καρκινογόνου και επιπλέον καθ'όλη τη διάρκεια έκθεσης στο καρκινογόνο αλλά και για μια εβδομάδα επιπλέον. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το BHA μείωσε σημαντικά τον αριθμό των τοξικών προϊόντων της αφλατοξίνης. Έτσι το BHA φάνηκε να είναι αρκετά αποτελεσματικό στην αναστολή της μετάλλαξης του γενετικού υλικού που μπορεί να προκληθεί από την αφλατοξίνη και αυτό ανάδειξε τη χρησιμότητα του να μετριάξει την μεταλλακτικότητα και την καρκινογενετικότητα που προκαλείται από την αφλατοξίνη.
15. Το φαινολικό αντιοξειδωτικό BHA μελετήθηκε για την ανασταλτική του δράση έναντι της ηπατοκαρκινογένεσης της αφλατοξίνης B1 σε αρσενικούς αρουραίους Fischer F344 από τους Williams και Iatropoulos (1996). Το BHA δόθηκε σε δόσεις 5, 25 και 125 ppm σε διαίτα για 42 εβδομάδες. Τη δεύτερη εβδομάδα δόθηκε 5mg/Kg αφλατοξίνης B1 ενδογαστρικά τρεις φορές την εβδομάδα για 40 εβδομάδες είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με το BHA. Στους αρουραίους που είχε χορηγηθεί το BHA μαζί με την αφλατοξίνη, η υψηλότερη δόση (125 ppm) του BHA μείωσε την ηπατοκαρκινογενετικότητα ενώ οι χαμηλότερες δόσεις δεν είχαν αυτή την επίδραση. Η εύρεση ότι η χαμηλή συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού BHA σε διαίτα μπορεί να αναστέλλει την ηπατοκαρκινογενετικότητα της αφλατοξίνης B1 είναι θετική για τη προφύλαξη του ανθρώπου από τον καρκίνο. Έτσι η αντικαρκινική δράση του BHA σε χαμηλά επίπεδα έναντι της αφλατοξίνης έδειξε ότι η πρόσληψη του σε δόσεις παρόμοιες με αυτές που προκύπτουν από τη χρήση του ως προσθετό στα τρόφιμα (0,5mg/Kg σωματικού βάρους/ημέρα) μπορεί να είναι αποτελεσματική έναντι της έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα.
16. Μελέτη που έγινε από M.Hirose *et al.* (1999) είχε ως σκοπό τη διερεύνηση των αντικαρκινικών επιδράσεων των φαινολικών αντιοξειδωτικών στη καρκινογένεση

που προκαλείται από τις ετεροκυκλικές αμίνες (HCA). Οι ετεροκυκλικές αμίνες έχουν βρεθεί σε μαγειρεμένα κρέατα και έχει δείχθει ότι είναι καρκινογόνα στο παχύ έντερο, στους μαστικούς αδένες, στο προστάτη, στην ουροδόχο κύστη και στο λεπτό έντερο των αρουραίων (Wakabayashi *et al.* 1993). Στους ανθρώπους οι ουσίες αυτές εκκρίνονται από τα ουρά μετά τη πρόσληψη μαγειρευμένων τροφίμων (Wakabayashi *et al.* 1993) και σχετίζονται με μεταλλαξιογόνο δράση σε δείγματα ουρών (Hayatsy *et al.* 1985). Αρουραίοι ηλικίας έξι εβδομάδων και αρσενικού φύλου ακολούθησαν είτε διαίτα με 0,03% MeIQx (ένα είδος HCA) είτε διαίτα με MeIQx μαζί με το BHA και αλλά αντιοξειδωτικά σε δόσεις 0,25% το καθένα ή βασική διαίτα, για 6 εβδομάδες και τη τρίτη εβδομάδα έγινε μερική ηπατεκτομή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το BHA και τα αλλά συνθετικά αντιοξειδωτικά ανέστειλαν την ηπατοκαρκινογένεση που προκλήθηκε από το MeIQx. Συμπερασματικά λοιπόν η μελέτη έδειξε ότι το BHA και αλλά συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι ισχυρά προστατευτικά μόρια έναντι του καρκινογόνου HCA και ο κύριος μηχανισμός της ανασταλτικής τους δράσης είναι η παρέμβαση μέσω μεταβολικής δραστηριότητας παρά μια απλή αντιοξειδωτική δράση.

17. Παρόμοια μελέτη που έγινε την ίδια χρόνια από τον M.Hirose *et al.* (1999) είχε πάλι ως σκοπό την αξιολόγηση της χημειοπροστατευτικής δράσης και των ανασταλτικών μηχανισμών διάφορων αντιοξειδωτικών μεταξύ των οποίων και το BHA στην καρκινογένεση που προκαλείται από τις ετεροκυκλικές αμίνες (HCA) οι οποίες όπως έχουμε αναφέρει και προηγουμένως έχουν βρεθεί σε μαγειρεμένα κρέατα και έχει δείχθει ότι είναι γενοτοξικές. Τουλάχιστον 10 HCA έχουν δείξει καρκινική δράση στο παχύ έντερο, στους μαστικούς αδένες, στο προστάτη, στο ήπαρ και σε άλλα όργανα (Hayatsu *et al.* 1985). Έτσι οι ετεροκυκλικές αμίνες αποτελούν ένα είδος περιβαλλοντικών καρκινογόνων που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου κυρίως σε δυτικές χώρες. Τα φαινορικά αντιοξειδωτικά έχουν διάφορες βιολογικές δράσεις επιπλέον των αντιοξειδωτικών όπως είναι η επίδραση σε ένζυμα της φάσης 1 και της φάσης 2, στην κυτταρική αναπαραγωγή, στα ένζυμα επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού, στην απόπτωση και στη πορεία της κυκλοξυγενάσης (Kahl 1984). Έτσι είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η επίδραση του BHA έναντι στις HCA και γι'αυτό τον σκοπό αρσενικοί αρουραίοι έξι εβδομάδων ακολούθησαν διαίτα με BHA 0,25% μαζί με αλλά αντιοξειδωτικά και ενός είδους HCA (MeIQx). Την τρίτη εβδομάδα της μελέτης οι αρουραίοι υποβλήθηκαν σε 2/3 μερική ηπατεκτομή και θανατώθηκαν

την όγδοη εβδομάδα όπου τα τμήματα τους εξετάσθηκαν ανοσοιστολογικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά μείωσαν το σχηματικό GST-P foci και ανέστειλαν την ηπατοκαρκινογένεση που προκαλείται από τις HCA και όπως φάνηκε από την βιοανάλυση τα συνθετικά αντιοξειδωτικά φαίνεται να είναι πιο δυναμικά από τα φυσικά στην αναστολή της καρκινογένεσης που προκαλείται από HCA και επίσης φάνηκε ότι οι μηχανισμοί της ανασταλτικής δράσης σχετίζονται με κάποια μεταβολική δραστηριότητα παρά με μια αντιοξειδωτική δράση, παρόλα αυτά δεν μπορούν να αποκλειστούν και άλλοι πιθανοί μηχανισμοί.

18. Ο σκοπός της μελέτης που έγινε από τους Mohan *et al.* (2003) είχε ως σκοπό την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης διάφορων αντιοξειδωτικών μεταξύ των οποίων ήταν και το BHA, στην απόπτωση κύτταρων καλλιέργειας Sf9 που έχει ενεργοποιηθεί από υπεριώδη ακτινοβολία UVb. Τα κύτταρα Sf9 είχαν υποβληθεί σε αγωγή με διάφορα αντιοξειδωτικά όπως το BHA πριν από την έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα 1.5×10^6 κύτταρα δέχθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις BHA (0,75mM, 1mM και 1.5mM) και εκτέθηκαν σε ακτινοβολία δυο ώρες μετά. Στη συνέχεια έγιναν διάφορα πειράματα για την αξιολόγηση της ικανότητας του BHA να αναστέλλει την απόπτωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα που είχαν δεχτεί το BHA δυο ώρες πριν την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία είχαν προστασία έναντι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Ο αριθμός των αποπτωτικών κύτταρων μειώθηκε από 86% σε 25% στα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί BHA σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει προσθήκη. Είναι ενδιαφέρον ότι η ανασταλτική δράση του BHA στην απόπτωση ήταν εμφανές μόνο στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,75 και 1 mM) αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 1.5 mM. Το BHA σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 5 mM προκάλεσε απόπτωση. Αυτό έδειξε ότι τα αντιοξειδωτικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να σώζουν τα κύτταρα από τον θάνατο ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις κάνουν ακριβώς αντίθετο. Έτσι η χρήση των αντιοξειδωτικών ως προστατευτικά μέσα έναντι του κυτταρικού θανάτου δείχνει την ικανότητα τους να δρουν και ως σημαντικά αποπτωτικά μέσα.
19. Μελέτη που έγινε από Moore *et al.* (1998) είχε ως στόχο την αξιολόγηση της χορήγησης μιας ορμόνης ή του αντιοξειδωτικού BHA στην ενεργοποίηση κακώσεων σε κύτταρα. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκαν αυτά τα μόρια είναι

επειδή και τα δυο μπορούν να λειτουργήσουν ως χημειοπροστατευτικά μέσα. Έτσι για τους σκοπούς της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 140 αρσενικά χαμστεράκια ηλικίας 6-8 εβδομάδων τα οποία είχαν χωριστεί σε δυο κύριες ομάδες και η καθεμία από αυτές σε τέσσερις υποομάδες. Τη 16^η εβδομάδα χορηγήθηκε σε δυο υποομάδες τροφή με 1% BHA και μετά θανατώθηκαν τη 24^η εβδομάδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν μετά από ιστολογική εξέταση ότι το BHA προκαλεί μείωση του σχηματισμού κακώσεων στα κύτταρα της χολής αλλά όχι στα κύτταρα του ήπατος. Έτσι η μελέτη αυτή έδειξε ότι το BHA είναι αποτελεσματικό στη πρόληψη σχηματισμού κακώσεων στα χολικά κύτταρα αλλά όχι στα ηπατικά και μια πιθανή εξήγηση γι'αυτό μπορεί να είναι ότι οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις επηρεάζονται κάτω από συνθήκες κίρρωσης και μόλυνσης.

Μελέτες σε ανθρώπους (συνοπτικά)

	ΕΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
1	Ξεκίνησε το 1986 και εγκρίθηκε το 1999	120,852 γυναίκες και άνδρες 55-69 ετών	Χρησιμοποιήθηκε ημιοσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων για την αξιολόγηση της πρόσληψης τροφίμων με BHA . Μετά από 6,3 χρόνια follow-up υπήρχαν πλήρη στοιχεία για τη πρόσληψη του BHA και BHT για 192 περιστατικά καρκίνου στόμαχου και 2035 sub cohort μέλη διαθέσιμα για case-cohort ανάλυση Οι γυναίκες συμμετείχαν σε συνέντευξη για τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τους παράγοντες κίνδυνου για την ανάπτυξη καρκίνου μαστού και πληροφορίες για τις εργασίες πλήρης απασχόλησης που είχαν από την ηλικία των 18 ετών. Η αξιολόγηση της έκθεσης σε χημικές ουσίες έγινε με το database NIOSH , με πληροφορίες για τη χημική παραγωγή και χρήση και με την αξιολόγηση ειδικού βιομηχανικού υγειονομικού .	Η μέση πρόσληψη BHA ανάμεσα στα μέλη ήταν 105μg/ημ. Για την κατανάλωση σαλτσών και μαγιονέζων με BHA δεν υπήρχε συσχέτιση με καρκίνο στόμαχου. Παρατηρήθηκε μείωση στο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου με την αύξηση της πρόσληψης του BHA. Δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση της ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου με τη συνήθη χαμηλή πρόσληψη του BHA
2	1998	261 γυναίκες-ασθενείς με καρκίνο μαστού διαγνωσμένες από το 1983-1986 και 758 γυναίκες-μάρτυρες		Η πιθανή έκθεση στο BHA(7,3%των ασθενών και 9,6% των μαρτύρων) ήταν σχετικά συχνή. Δεν υπήρχε εμφανής συσχέτιση της έκθεσης σε BHA με την εμφάνιση καρκίνου μαστού . Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες .

	ΕΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
3	1994-1996	1200 σπιτικά με 3000 άτομα τυχαία επιλεγμένα από τους 4 γεωγραφικούς ορίζοντες της Ιταλίας	Η μελέτη έγινε σε 3 βήματα με προσανατολισμό από την λιγότερο ακριβή προς την περισσότερο ακριβή μέθοδο. Η πρώτη μέθοδος ήταν η μέθοδος των εσόδων (Budget Method.) . Η δεύτερη ήταν η μέθοδος της χρήσης πληροφοριών για τη πρόσληψη τροφίμων διαχωρισμένες σε κατηγορίες . Η τρίτη ήταν η μέθοδος της χρήσης πληροφοριών για τη πρόσληψη τροφίμων χωρίς να είναι οργανωμένοι σε κατηγορίες .	Η πρώτη μέθοδος έδειξε ότι η πρόσληψη του ΒΗΑ των Ιταλών μόλις ξεπερνά το ADI . Χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες . Η δεύτερη μέθοδος έδειξε ότι η πρόσληψη του ΒΗΑ ήταν κάτω από το ADI για τη μέτρια και υπερβολική πρόσληψη . Θεωρήθηκε μη αναγκαία η διεξαγωγή του τρίτου βήματος για το ΒΗΑ . Το MPL (μέγιστο επιτρεπτό όριο) του ΒΗΑ είναι επαρκής για την αποφυγή της πρόσληψης ΒΗΑ πάνω από το ADI στην Ιταλία ακόμα και για τους που καταναλώνουν σχετικά μεγάλες ποσότητες τροφίμων στα οποία βρίσκεται το ΒΗΑ .
4	1983	2 άνθρωποι	Χορηγήθηκαν περίπου 2mg/Kg από το στόμα.	Βρέθηκαν γλυκονουρίδια και θειαζίδια του ΒΗΑ και του TBHQ στα ούρα .Αυτό δείχνει ότι το ΒΗΑ μπορεί να μετατραπεί σε TBHQ και επιπλέον το ΒΗΑ και το TBHQ μπορούν να εκκρίνονται ως συζυγής ουσίες.
5	1989	1 άνθρωπος	Δόθηκε μόνη δόση από το στόμα 0,5mg/Kg	Το περισσότερο από το χορηγούμενο ΒΗΑ αποβλήθηκε από τα ούρα ως συζυγής ΒΗΑ και λιγότερο πόσο ως συζυγής TBHQ και δε βρέθηκε καθόλου στα κόπρανα .

Μελέτες σε ανθρώπους (αναλυτικά)

1. Botterweck *et al.* (1999)

Στη μελέτη που έγινε στην Ολλανδία από τους Botterweck *et al.* (1999) είχε ως σκοπό τη μελέτη της συσχέτισης μεταξύ της διαιτητικής πρόσληψης του ΒΗΑ και του ΒΗΑ με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στομάχου. Αυτή η προοπτική μελέτη είναι η πρώτη επιδημιολογική μελέτη που αξιολόγησε τη σχέση μεταξύ της πρόσληψης του ΒΗΑ και του ΒΗΤ με το κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στομάχου. Εξαιτίας της εξάπλωσης της χρήσης του ΒΗΑ στα τρόφιμα και της επακόλουθης μακρόχρονης και εκτεταμένης έκθεσης στους ανθρώπους ήταν σημαντικό να διερευνηθούν οι δυνητικές επιπτώσεις του ΒΗΑ στην υγεία που σχετίζονται με τη πρόσληψη του. Η μελέτη αυτή ξεκίνησε το Σεπτέμβριο 1986 ανάμεσα στο γενικό πληθυσμό της Ολλανδίας (van den Brandt *et al.* 1990a).

Δείγμα και σχεδιασμός της μελέτης

Το δείγμα αποτελούνταν από 62,573 γυναίκες και από 58,279 άνδρες ηλικίας από 55 έως 69 ετών το έτος 1986. Στην αρχή της μελέτης οι συμμετέχοντες συμπληρώσαν ένα ερωτηματολόγιο που τους είχε αποσταλεί για τη καταγραφή των διαιτητικών συνηθειών, για το κάπνισμα, το επάγγελμα, το ιατρικό ιστορικό, το προσωπικό και οικογενειακό ιστορικό για την ύπαρξη καρκίνου και για δημογραφικά χαρακτηριστικά. Το follow-up για τον έλεγχο ύπαρξης καρκίνου έγινε με τη τήρηση αρχείου για τα περιστατικά καρκίνου και για παθολογικά περιστατικά (van den Brandt *et al.* 1990b). Για την ανάλυση των πληροφοριών ακολουθήθηκε η μέθοδος case-cohort στην οποία επιλέγονται κάποιες περιπτώσεις από το σύνολο, ενώ τα ανθρωποχρόνια κινδύνου από το σύνολο των ατόμων υπολογίστηκε από τυχαίο δείγμα 3500 ατόμων (sub cohort). Αυτή η υποομάδα των 1812 γυναικών και των 1688 ανδρών είχαν παρακολουθηθεί ανά διετία για πληροφορίες σχετικά με τη ζωτική τους κατάσταση με σκοπό τον υπολογισμό της συνολικής χρονικής διάρκειας του ατόμου στη μελέτη. Η ανάλυση περιορίστηκε στην εμφάνιση καρκίνου στα πρώτα 6,3 χρόνια του follow-up από το Σεπτέμβριο του 1986 έως το Δεκέμβριο του 1992. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν τα άτομα που είχαν ήδη καρκίνο εκτός από το καρκίνο του δέρματος. Έτσι στην υποομάδα παρέμειναν 1630 άνδρες και 1716 γυναίκες.

Αξιολόγηση της έκθεσης σε BHA

Για την αξιολόγηση της πρόσληψης τροφίμων με BHA χρησιμοποιήθηκε το τμήμα του ερωτηματολογίου που δόθηκε στην αρχή της μελέτης και αναφέρεται στις διαιτητικές συνήθειες. Το τμήμα αυτό αποτελούνταν από ημιποσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων με 150 θέματα που επισυγκεντρωνόνταν στη συνήθη πρόσληψη τροφίμων και ποτών κατά τη διάρκεια του έτους πριν από το ξεκίνημα της μελέτης. Για την εγκυρότητα του ερωτηματολογίου έγινε καταγραφή 9-ημερου ερωτηματολογίου. Στο ερωτηματολόγιο ζητήθηκε μεταξύ άλλων να αναφερθεί η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν σημαντικές ποσότητες BHA όπως λίπη, έλαια, έτοιμες σούπες, μαγιονέζα και αλλά ντρεσινγκ, προϊόντα πατάτας, δημητριακά, γλυκά, μπισκότα, ζάχαρη, ξηροί καρποί και σνακ (Verhagen *et al.* 1990a). Επίσης έπρεπε να αναφέρουν το τύπο και τη μάρκα των λιπών, των ελαίων, της μαγιονέζας, των ντρεσινγκ και των έτοιμων σουπών. Υπήρχαν έξι κατηγορίες συχνότητας από το καθόλου έως το 6-7 φορές την εβδομάδα.

Συλλογή πληροφοριών για τη περιεκτικότητα του BHA στα τρόφιμα

Πληροφορίες για τη περιεκτικότητα του BHA συγκεντρώθηκαν με χημική ανάλυση επιλεγμένων τροφίμων που περιέχουν σημαντική ποσότητα BHA και με τη χρήση δυο άλλων πηγών πληροφοριών το Dutch Database Of Food Additives για ανθρώπους με δυσανεξία και αλλεργία στη τροφή (ALBA) και το Dutch Compendium of Foods and Diet Products (Compendium of Food and Diet Products, 1989/1990).

Υπολογισμός της πρόσληψης του BHA

Τα τρόφιμα θεωρούνταν ότι περιείχαν BHA όταν τουλάχιστον μια από τις τρεις πηγες (χημική ανάλυση, ALBA ή το Compendium) έδειχναν ότι το BHA περιείχονταν σε αυτά. Η μέση ημερήσια πρόσληψη υπολογίστηκε με πολλαπλασιασμό της περιεκτικότητας του BHA στα τρόφιμα σε μg ανά γραμμάριο και η πρόσληψη της μαγιονέζας και άλλων ντρεσινγκ σε γραμμάρια ανά ημέρα.

Υπολογισμός πιθανών συμπαράγοντων

Άλλοι παράγοντες που πιθανών σχετίζονται με τη συσχέτιση του ΒΗΑ και της εμφάνισης καρκίνου στόμαχου και μετρήθηκαν στο ερωτηματολόγιο ήταν η ηλικία, το φύλο, το επίπεδο μόρφωσης (χαμηλό, μέτριο και υψηλού επιπέδου), οι διαταραχές στόμαχου, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου στόμαχου, το κάπνισμα, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών σε γραμμάρια ανά ημέρα και η κατανάλωση μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (γραμμάρια ανά ημέρα). Με τον όρο διαταραχές στόμαχου εννοούνταν η ύπαρξη στομαχικής ασθένειας στο παρελθόν που χρειαζόταν ιατρική παρακολούθηση (π.χ. πεπτικό έλκος, γαστρίτιδα).

Ανάλυση πληροφοριών

Από επιδημιολογική άποψη ήταν σημαντικό να μελετηθεί η σχέση μεταξύ της πρόσληψης της μαγιονέζας και άλλων ντρεσινγκ από το στόμα της εμφάνισης καρκίνου στόμαχου. Όλες οι περιπτώσεις (282) και τα μέλη της υποομάδας (3123) κατηγοριοποιήθηκαν σε χρηστές ή μη της μαγιονέζας ή των ντρεσινγκ με ΒΗΑ και μετά μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ του καρκίνου και της πρόσληψης ΒΗΑ. Αυτές οι αναλύσεις βασίστηκαν σε 192 περιπτώσεις και σε 2035 μέλη της υποομάδας με πλήρη στοιχεία για τη περιεκτικότητα του ΒΗΑ στη μαγιονέζα και σε αλλά ντρεσινγκ. Αυτά τα άτομα ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες του ΒΗΑ (0, >0-70, >70μg /ημ).

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τα μέλη της υποομάδας το 65,8% των μελών κατανάλωσαν μαγιονέζα και ντρεσινγκ σαλάτας. Η μέση πρόσληψη του ΒΗΑ στα μέλη της υποομάδας ήταν 105μg/ημ. Για την κατανάλωση μαγιονέζας και ντρεσινγκ και τροφίμων που περιέχουν ΒΗΑ δε παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση με το κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου. Παρατηρήθηκε μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου με την αύξηση της πρόσληψης του ΒΗΑ.

Συζήτηση

Ένα από τα δυνατά σημεία της μελέτης ήταν το γεγονός ότι το η πρόσληψη τροφής καταγράφηκε πριν από τη διάγνωση του καρκίνου στόμαχου αποφεύγοντας έτσι την επιρροή από τις ανακλήσεις των διαιτητικών συνηθειών. Επίσης το follow-up των

ατόμων ήταν 100% και η ολοκλήρωση του follow-up για το καρκίνο ήταν πολύ υψηλή δείχνοντας ότι η αναγκαστική επιλογή λόγω απωλειών στο follow-up ήταν απίθανη. Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρέασε τα αποτελέσματα ήταν η κακή ταξινόμηση της έκθεσης. Το ερωτηματολόγιο είχε σχεδιαστεί για να αξιολογήσει την μακρόχρονη πρόσληψη των τροφίμων και όχι τη πρόσληψη του BHA. Παρόλα αυτά υπήρχαν πληροφορίες για την ακριβή μάρκα των λιπών και ελαίων, των έτοιμων σουπών, των μαγιονέζων και των ντρεσσιγκ που είναι σημαντικές πηγές του BHA.

Στον πίνακα 1 φαίνεται η κατανάλωση της μαγιονέζας και των ντρεσσιγκ στα μέλη των περιστατικών καρκίνου στόμαχου και των υποομάδων με πλήρη στοιχεία για τις καταναλωτικές τους συνήθειες (1986-1992). Από τα άτομα της υποομάδας το 65.8% κατανάλωσε μαγιονέζα και ντρεσσιγκ. Για τα άτομα που υπήρχαν πλήρη στοιχεία για την κατανάλωση μαγιονέζας και ντρεσσιγκ με BHA η BHT, σχετικά μικρότερο ποσοστό των περιστατικών κατανάλωσαν τρόφιμα με αυτά τα δυο αντιοξειδωτικά από ότι τα μέλη της υποομάδας.

Πίνακας Χρήστες της μαγιονέζας και των ντρεσσιγκ και η κατανάλωση μαγιονέζας και ντρεσσιγκ με BHA απο άτομα με καρκίνο στόμαχου και από τα μέλη της υποομάδας με πλήρη στοιχεία κατανάλωσης (1986-1992)

	Περιπτώσεις n=282 n %	Υποομάδες n=3 23 n %
Χρηστές μαγιονέζας και άλλων ντρεσσιγκ	180 (63.8)	2056 (65.8)
Μη χρηστές	102 (36.2)	1067 (34.2)
Κατανάλωση μαγιονέζας και ντρεσσιγκ *		
με BHA	43 (15.2)	497 (15.9)
χωρίς BHA	149 (52.8)	1538 (49.2)

* Δεν υπήρχαν πληροφορίες για την περιεκτικότητα του BHA σε 90 περιπτώσεις (31.9%) και σε 1088 μέλη της υποομάδας (34.8%)

Πίνακας 2 Μέση πρόσληψη του BHA ανάμεσα στους καταναλωτές της μαγιονέζας και των ντρέσσινγκ και η κατανομή της πρόσληψης BHA στα περιστατικά καρκίνου στόμαχου και στα άτομα της υποομάδας (1986-1992)

	Περιστατικά	Υποομάδες
Μέση πρόσληψη (±SD) σε $\mu\text{g}/\eta\mu$ του :		
BHA	89(±83)	105 (±183)
Πρόσληψη BHA ($\mu\text{g}/\eta\mu$)	n(%)	n(%)
0	1638(52.4)	161 (57.1)
> 0-70	19(6.7)	207(6.6)
> 70	12(4.3)	190(6.1)

Στον πίνακα 2 φαίνεται η κατανομή της μέσης πρόσληψης του BHA μέσω της κατανάλωσης μαγιονέζας και ντρεσινγκ στα περιστατικά καρκίνου στόμαχου και στις υποομάδες. Η μέση πρόσληψη του BHA στα μέλη της υποομάδας ήταν 105 $\mu\text{g}/\eta\mu$ και η πρόσληψη του ήταν χαμηλότερη στα περιστατικά κατά 89 $\mu\text{g}/\eta\mu$. Γενικά όμως υπήρχαν μικρές διαφορές στη κατανομή του BHA στις κατηγορίες πρόσληψης μεταξύ των περιστατικών και των υποομάδων.

Πίνακας 3 Σχετικός κίνδυνος και διάστημα εμπιστοσύνης (95%) του καρκίνου στόμαχου σχετικά με τη χρήση μαγιονέζας και ντρέσσινγκ, την κατανάλωση τροφίμων με BHA και πρόσληψη BHA ($\mu\text{g}/\eta\mu$)

	RR	5% CI *	RR	5% CI **
Χρήση μαγιονέζας και ντρέσσινγκ				
Όχι	1,00		1,00	
Ναι	0,97	(0,74-1,26)	0,93	(0,70-1,25)
Χρήση μαγιονέζας και ντρέσσινγκ χωρίς BHA	1,00		1,00	
με BHA	0,97	(0,67-1,40)	0,89	(0,58-1,37)
Πρόσληψη BHA ($\mu\text{g}/\eta\mu$)				
0	1,00		1,00	
> 0-70	0,96	(0,57-1.61)	0,80	(0,43-1.48)
> 70	0,84	(0,45-1.57)	0,57	(0,25-1.30)

* Προσαρμοσμένα για την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, το επίπεδο μόρφωσης, τις στομαχικές διαταραχές και του οικογενειακού ιστορικού καρκίνου στόμαχου

** Αναλύσεις με αποκλεισμένα τα περιστατικά του πρώτου και δεύτερου χρόνου και προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, το επίπεδο μόρφωσης, τις στομαχικές διαταραχές και το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου στόμαχου

Στον πίνακα 3 φαίνεται ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου σχετικά με την κατανάλωση μαγιονέζας και ντρέσσινγκ, τη χρήση μαγιονέζας και ντρέσσινγκ με BHA και η πρόσληψη του BHA. Συγκεκριμένα φαίνεται η πολυπαραγοντική ανάλυση όλων των περιστατικών καρκίνου στόμαχου και η πολυπαραγοντική ανάλυση μετά από τον αποκλεισμό των περιστατικών διαγνωσμένα στο πρώτο και δεύτερο χρόνο του follow-up. Μετά τον αποκλεισμό των περιστατικών του πρώτου και δεύτερου χρόνου, ο σχετικός κίνδυνος για καρκίνου στόμαχου με την κατανάλωση τροφίμων με BHA μειώθηκε σε 0,89 (95% CI 0,58-1.37). Παρατηρήθηκε μείωση του κίνδυνου ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου με την αύξηση της πρόσληψης BHA.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Στη μελέτη αυτή, η πρόσληψη του BHA ήταν 105 (εύρος 2-322) $\mu\text{g}/\text{ημ}$ η οποία είναι περίπου 10 φορές χαμηλότερη από αυτή που έχει υπολογισθεί από άλλες μελέτες (Kirckpatrick & Lauren 1986, Van Dokkum *et al.* 1982, Verhagen *et al.* 1990a). Στη μελέτη αυτή οι τιμές των προσλήψεων βασίζονται μόνο στη κατανάλωση της μαγιονέζας και άλλων ντρέσσινγκ σαλατών. Η εύρεση ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης του BHA και του κίνδυνου ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου δείχνει ότι η χαμηλή πρόσληψη του BHA δεν είναι καρκινογονική για τους ανθρώπους. Δεν υπάρχουν όμως σχετικές πληροφορίες για την αξιολόγηση του κίνδυνου καρκινογένεσης στους ανθρώπους έτσι τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής μπορούν να συγκριθούν με ευρήματα μελετών που έχουν γίνει σε ζώα για το BHA. Τα στοιχεία από πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα δείχνουν τις καρκινικές

και αντικαρκινικές επιδράσεις του ΒΗΑ. Για παράδειγμα μια μελέτη έδειξε ότι εκτός από το στομάχι υπάρχουν και άλλα όργανα του πεπτικού σωλήνα (οισοφάγος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο) που είναι δυνητικοί στόχοι για την καρκινική δράση του ΒΗΑ (Verhagen *et al.*, 1990b). Η Παγκόσμια Εταιρεία Μελέτης Καρκίνου (IARC) που αξιολόγησε το ΒΗΑ, συμπέρανε ότι υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τη καρκινική δράση του ΒΗΑ σε πειραματόζωα (IARC, 1986a). Τα αποτελέσματα όμως των μελετών που έχουν γίνει σε ζώα είναι δύσκολο να συγκριθούν με αυτά των ανθρώπων γι'αυτό και χρειάζεται προσοχή κατά την ερμηνεία τους. Συγκεκριμένα η ποσότητα του ΒΗΑ που χρησιμοποιείται στη διαίτα των ζώων είναι πολύ υψηλότερη από αυτή που επιτρέπεται στη διαίτα των ανθρώπων. Οι άνθρωποι εκτίθενται σε χαμηλά επίπεδα καθ'ολη τη διάρκεια της ζωής τους και επιπλέον οι άνθρωποι δεν διαθέτουν στομάχι και υπάρχουν μεταβολικές διαφορές μεταξύ των ανθρώπων και των ζώων. Η εύρεση ότι υπάρχει μειωμένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου με την αύξηση της πρόσληψης του ΒΗΑ φαίνεται να ταιριάζει με την υπόθεση ότι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά μπορεί να προστατεύουν έναντι του καρκίνου και να υποστηρίζουν τα ευρήματα των μελετών ότι οι χαμηλές δόσεις του ΒΗΑ αναστέλλουν τη καρκινογένεση (Hocman 1988; Wattenberg 1986; Williams 1986; Williams *et al* 1999).

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή βρήκε ότι δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία που να υποστηρίζουν τη συσχέτιση μεταξύ της συνήθους διαιτητικής πρόσληψης χαμηλών επιπέδων ΒΗΑ και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου στομάχου στους ανθρώπου

2 As heng au *et al.* 3, 6

Μελέτη ασθενών μαρτύρων με βάση το πληθυσμό είχε ως στόχο την περιγραφή της σχέσης μεταξύ της έκθεσης στον εργασιακό χώρο σε οιστρογονικά χημικά και της εμφάνισης καρκίνου μαστού στη Μασσαχουσέτη των ΗΠΑ. Η ποικιλοότητα της εμφάνισης του καρκίνου και τα αποτελέσματα διάφορων ερευνών έδειξαν ότι η περιβαλλοντική και εργασιακή έκθεση σε χημικές ουσίες παίζει ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου (Kelsey *et al* 1993). Ο σκοπός της μελέτης ήταν 1) ο προσδιορισμός του επιπολασμού της έκθεσης στον χώρο εργασίας σε ξενοστρογόνα που έχουν αναγνωρισθεί από την βιοανάλυση του E-SCREEN και 2) η περιγραφή της σχέσης μεταξύ της έκθεσης στον εργασιακό χώρο σε ξενοστρογόνα και της εμφάνισης καρκίνου μαστού. Η ανάλυση έγινε ανάμεσα σε άτομα με βάση το πληθυσμό και ο

σκοπός της ήταν η μελέτη της σχέσης μεταξύ της περιβαλλοντικής ρύπανσης και της εμφάνισης εννέα τύπων καρκίνων συμπεριλαμβανόμενων και του καρκίνου μαστού (Aschengrau *et al* 1993, 1996).

Μεθοδολογία

Όλα τα θηλυκά άτομα που είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο μαστού από το 1983 έως το 1986 και άνηκαν στους μόνιμους κάτοικους πέντε πόλεων της Μασσαχουσέτης και είχαν καταχωρηθεί στο Massachusetts Cancer Registry ήταν κατάλληλοι για τη μελέτη. Ένα σύνολο 79% των καταχωρημένων περιστατικών είχαν συμμετάσχει σε συνέντευξη. Οι μάρτυρες επιλέχθηκαν από το γενικό πληθυσμό των ασθενών και ήταν γυναίκες παρόμοιας ηλικίας και φυλής και ήταν επίσης μόνιμοι κάτοικοι των πέντε πόλεων από το 1983-1986. Επειδή πολλοί από τους ασθενείς είχαν αποθάνει ή ήταν ηλικιωμένοι στην αρχή της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τρεις πηγές για την αναγνώριση συγκρίσιμων μαρτύρων με αποτελεσματικό τρόπο 1) τυχαίο κάλεσμα ψηφίων (Random Digit Dialing), 2) λίστα παροχής ιατρικής φροντίδας από το Health Care Financing Administration (HCFA) και 3) πιστοποιητικό θανάτου.

Αξιολόγηση της έκθεσης

Ξενοστρογόνο ορίστηκε ως μια από τις 33 ουσίες που εμφάνισαν οιστρογονική δράση κατά την βιοανάλυση E-SCREEN που έγινε από τον Soto *et al.* (1992). Η πιθανότητα έκθεσης σε ένα ή παραπάνω οιστρογόνα προσδιορίστηκε για την κάθε εργασία των ατόμων της μελέτης με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων του National Institute for Occupational Safety and Health National Exposure Survey (NIOSH/NOES) (Sieber *et al* 1991), με πληροφορίες για τη χημική παραγωγή και χρήση και με την ειδική κρίση ενός έμπειρου υγειονομικού ιατρού. Έγινε επιθεώρηση σε περισσότερες από 4,000 εγκαταστάσεις όπου συγκεντρώθηκαν πληροφορίες για την δυνητική έκθεση σε όλα τα αναγνωρισμένα χημικά, φυσικά και βιολογικά μόρια συμπεριλαμβανόμενου και εμπορικών προϊόντων και των συστατικών τους. Η αξιολόγηση της έκθεσης σε ξενοστρογόνα έγινε σε δυο φάσεις. Στη πρώτη φάση ο βιομηχανικός υγειονομικός ιατρός αντιστοίχησε τη λίστα των οιστρογόνων με το NIOSH database και αναγνώρισε επιτυχώς 18 από τα 33 ξενοστρογόνα. Στη δεύτερη φάση το σύνολο των εργασιών των συμμετεχόντων που προέκυψε από τη λίστα που βγήκε από την αντιστοίχιση των εργασιών με την πιθανή έκθεση σε ένα ή παραπάνω οιστρογόνα,

επεξεργάστηκε περαιτέρω με τη βοήθεια εκτενούς ανασκόπησης της βιβλιογραφίας και βάσης δεδομένων για τη παραγωγή και τη χρήση καθένα από τα παραπάνω 18 ξενοστρογόνα, για την ημερομηνία έναρξης και λήξης της εμπορικής παραγωγής των ξενοστρογόνων και για το είδος και τη χρήση των εμπορικών προϊόντων που τα εμπεριέχουν.

Ανάλυση

Η έκθεση σε ξενοστρογόνα στον εργασιακό χώρο ορίστηκε ως η ενασχόληση με μια ή παραπάνω εργασία που είχε πιθανή έκθεση σε οποιοδήποτε ξενοστρογόνο και σε συγκεκριμένες χημικές ουσίες. Αν μια γυναίκα είχε εργασία με πιθανή έκθεση σε οποιοδήποτε ξενοστρογόνο θεωρήθηκε ότι πιθανώς έχει εκτεθεί σε ξενοστρογόνο και σε κάποια χημική ουσία, εάν είχε μόνο δουλείες με πιθανή έκθεση τότε θεωρούνταν ότι είχε πιθανώς εκτεθεί. Για τον υπολογισμό του σχετικού κίνδυνου για ανάπτυξη καρκίνου μαστού σε διαφορετικές κατηγορίες έκθεσης σε ξενοστρογόνα χρησιμοποιήθηκαν odds ratios ενώ για τη μείωση της δυσταξινόμησης της έκθεσης τα odds ratios υπολογίστηκαν μόνο για τη κατηγορία της πιθανής έκθεσης. Όταν οι αριθμοί ήταν επαρκείς η πιθανή έκθεση χωρίστηκε σε δυο επιπλέον υποκατηγορίες 1) έκθεση σε ένα μόνο ξενοστρογόνο και 2) η έκθεση σε αυτό το ξενοστρογόνο και σε κάποιο άλλο ξενοστρογόνο.

Αποτελέσματα

Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού ήταν άνω των 60 ετών, λευκοί, καθολικοί ή προτεστάντες και είχαν αποφοιτήσει από το λύκειο. Περίπου το 90% των ασθενών και των μαρτύρων είχαν δουλεία επί πληρωμής από την ηλικία των 18 ετών. Ένα σύνολο 67% των ασθενών και 55% των μαρτύρων ήταν εν ζωή όταν έγινε συνέντευξη. Η κατανομή μερικών από των μεταβλητών που σχετίζονται με την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού ήταν ως αναμενόμενο με περισσότερους ασθενείς από μάρτυρες να αναφέρουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού, χρήση αντισυλληπτικών, και αλκοολ. Περίπου το 39,5% των ασθενών και το 38,7% των μαρτύρων είχαν δουλεία με είτε δυνατή είτε πιθανή έκθεση σε ξενοστρογόνα. Η έκθεση σε πέντε χημικές ουσίες εκ των οποίων ήταν και το BHA ήταν πιο συχνή με το 15-29% των ασθενών ή των μαρτύρων να θεωρούνται δυνατά είτε πιθανά εκτεθειμένοι. Ενώ ένας μεγάλος αριθμός εργασιών σχετίζονταν με πιθανή έκθεση σε

5 ξενοστρογόνα ,είναι αξιόλογο ότι ένας σημαντικό μέρος της έκθεσης ήταν από μια συγκεκριμένη κατηγορία εργασίας. Για παράδειγμα οι χειριστές τροφίμων (μάγειροι, φούρναροι, εργαζόμενοι κουζίνας ,σερβιτόρες) αποτελούσαν το 41% των εργασιών με πιθανή έκθεση σε BHA. Κατά τη ανάλυση της πιθανής έκθεσης περίπου το μισό των εκτιθέμενων ασθενών και μαρτύρων είχαν εκτεθεί σε ένα μόνο ξενοστρογόνο ενώ το υπόλοιπο σε 2 ή 3 ή 4 ή παραπάνω ξενοστρογόνα. Δεν βρέθηκε καμία σχέση δόση –απάντησης με τη αύξηση της διάρκειας έκθεσης σε BHA. Όπως φαίνεται και από το πίνακα 4 περίπου το μισό των εκτεθειμένων ασθενών και μαρτύρων είχε εκτεθεί σε ένα μόνο ξενοστρογόνο ενώ το υπόλοιπο σε 2 ή 3 ή 4 ή και παραπάνω ξενοστρογόνα.

Πίνακας 4 Πιθανή έκθεση σε ξενοστρογόνα, γενικός και προσαρμοσμένος λόγος πιθανοτήτων, διάστημα εμπιστοσύνης (95%) ,1986-6

Εκθεση	Ασθενείς (n=261)	Μάρτυρες (n=753)	Γενικός λόγος πιθανοτήτων	Προσαρμοσμένος λόγος πιθα/των
Σε BHA	19(7.3)	72(9.6)	0,8(0,5-1.3)	0,8(0,5-1.5)
μόνο BHA	3(1.1)	18(2.4)	0,5(0,1-1.7)	0,8(0,5-1.6)
Μαζί με αλλά ξενοστρογονα	16(6.1)	54(7.2)	0,9(0,5-1.6)	0,9(0,5-1.7)

Συμπεράσματα

Τα περισσότερα από τα ξενοστρογόνα που αξιολογήθηκαν στη μελέτη δεν είχαν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού. Χρειάζεται όμως προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθώς βασίζονται σε μικρό αριθμό εκτεθειμένων ατόμων και είναι ασταθή .Επίσης χρειάζεται όμως προσοχή λόγω των περιορισμών που έγιναν κατά την αξιολόγηση της έκθεσης .Τέτοιοι περιορισμοί είναι 1) η έκθεση E–SCREEN είναι μόνο μια από τις προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό των οιστρογονικων συμπλοκών 2) η αξιολόγηση της έκθεσης βασιζόταν σε πληροφορίες που είχαν δοθεί κατά την συνέντευξη των συμμετεχόντων ή των

απόγονων τους 3) η δημοσκόπηση δεν συμπεριλάμβανε γεωργικές εγκαταστάσεις όπου η έκθεση σε οιστρογονικά εντομοκτόνα ήταν πιθανή και 4) οι πληροφορίες NIOSH/NOES βασίζονταν σε δημοσκόπηση που έγινε το 1981 έως το 1983 με αποτέλεσμα τα ξενοστρογόνα που δεν χρησιμοποιούνταν εκείνη τη περίοδο να έχουν παραληφθεί. Επίσης μπορεί να είχαν παραληφθεί χημικές ουσίες που δεν είχαν αναγνωρισθεί από το προσωπικό δημοσκόπησης ή δεν είχαν αναγνωρισθεί ως συστατικά εμπορικών προϊόντων.

3 Leclercq *et al.* 2000

Μελέτη που έγινε από Leclercq *et al.* (2000) είχε ως σκοπό τον υπολογισμό μέσω κλιμακωτής προσέγγισης της διαιτητικής πρόσληψης του BHA και άλλων προσθέτων τροφίμων στην Ιταλία για την αξιολόγηση της ασφάλειας της χρήσης τους δηλαδή τον κίνδυνο που υπάρχει όταν ξεπεραστεί το ADI (Acceptable Daily Intake) που έχει οριστεί από το SCF (Scientific Committee for Food) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

Μεθοδολογία

Η μελέτη έγινε σε τρία βήματα ακολουθώντας την προσέγγιση από πάνω προς τα κάτω δηλαδή από τη λιγότερο ακριβή μέθοδο στη πιο ακριβή μέθοδο. Στις τρεις μεθόδους που εφαρμόστηκαν υιοθετήθηκε η υπόθεση ότι τα προσθετά τροφίμων χρησιμοποιούνται πάντα στο μέγιστο επιτρεπτό όριο (MPL) σε όλα τα τρόφιμα στα οποία η προσθήκη τους είναι επιτρεπτή. Το πρώτο βήμα περιλάμβανε την οικονομική μέθοδο (Budget Method). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ύπαρξη ανώτερου φυσιολογικού ορίου για την ποσότητα τροφής και ποτού που μπορεί να προσληφθεί από τον άνθρωπο κάθε ημέρα. Άλλη υπόθεση που έγινε είναι ότι τα προσθετά τροφίμων χρησιμοποιούνται πάντα στο ανώτερο επιτρεπτό όριο που έχει καθορισθεί στα τρόφιμα και τα ποτά και επίσης ότι το τμήμα της διαίτας που μπορεί να τα περιέχει μπορεί σε αδρές γραμμές να υπολογισθεί. Η μεγαλύτερη χρήση του BHA γίνεται στα λίπη και στην Ιταλία το ποσοστό ενέργειας που αντιστοιχεί στη πρόσληψη λίπους είναι 29-36% που είναι σαφώς χαμηλότερο από αυτό των άλλων Ευρωπαϊκών χωρών (EURODIET, 2000). Έτσι η υπόθεση ότι στην ιταλική διαίτα το λιγότερο από το 1/8 της τροφής μπορεί να περιέχει BHA ή άλλα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιήθηκε στον υπολογισμό. Το δεύτερο βήμα που έγινε βασίστηκε σε πληροφορίες οργανωμένες σε κατηγορίες που είχαν συγκεντρωθεί για την

κατανάλωση τροφίμων από την πιο πρόσφατη δημοσκόπηση που είχε γίνει σε εθνικό επίπεδο από το INRAN (National Institute for Food and Nutrition Research). Η μελέτη αυτή έγινε το 1994-96 με τη συμμετοχή 1200 σπιτικών και συνολικά πάνω από 3000 ατόμων τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία ως αντιπροσωπευτικά για τις τέσσερις κύριες γεωγραφικές περιοχές της Ιταλίας. Οι πληροφορίες συλλέχθηκαν από προσωπικά ημερολόγια όπου τα άτομα κατέγραψαν τη πρόσληψη τροφίμων και ποτών για 7 συνεχόμενες ημέρες. Άλλες πηγές πληροφοριών ήταν το καταστατικό των τροφίμων μέσα στο σπίτι, ένα ημερολόγιο αγορας/καταναλωσης, η καταγραφή συνταγών για τα φαγητά που μαγειρεύονταν στο σπίτι και τρία ερωτηματολόγια για την επεξήγηση των μεταβλητών. Οι πληροφορίες για την κατανάλωση των τροφίμων συγκεντρώθηκαν σε 62 ομάδες τροφίμων και η μέση πρόσληψη των προσθέτων από την κάθε κατηγορία τροφίμων υπολογίστηκε με συνδυασμό των πληροφοριών για τη πρόσληψη τροφής μαζί με το μέγιστο επιτρεπτό όριο εντός της κατηγορίας. Σύμφωνα με την ΕΕ όλα τα αντιοξειδωτικά για τα οποία η SCF έχει καθορίσει ένα όριο ημερήσιας επιτρεπτής πρόσληψης (ADI) επιτρέπονται σε ειδικά επεξεργασμένα τρόφιμα σε μέγιστα επιτρεπτά όρια MPL (Πίνακας 5) αλλά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλα προϊόντα εάν τουλάχιστον ένα από τα παραπάνω αποτελούν συστατικό τους. Το τρίτο βήμα συνιστούσε τη χρησιμοποίηση μη οργανωμένων πληροφοριών για τη πρόσληψη τροφίμων. Σ'αυτό το βήμα οι πληροφορίες συλλέχθηκαν από το Multicentre Study on Food Additives που οργανώθηκε από το Institute of European Food Studies. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι μαθητές 11 τάξεων ενός γυμνασίου της Ρώμης με σύνολο 212 ατόμων ηλικίας 13-19 ετών (μέσος όρος ηλικίας 16, 70% του συνόλου ήταν γυναίκες). Οι μαθητές κατέγραψαν όλα τα τρόφιμα και ποτά που είχαν καταναλωθεί κατά τη διάρκεια 14 συνεχόμενων ημερών και μετά ακολούθησε ιατρική εξέταση που περιλάμβανε τη μέτρηση του ύψους και του βάρους τους. Το ακριβές βάρος του κάθε συμμετέχοντα επέτρεψε τη σύγκριση των μέσων προσλήψεων με το ADI. Επίσης για το κάθε άτομο υπολογίστηκε θεωρητικά η μέγιστη ημερήσια πρόσληψη και συγκρίθηκε με το ADI.

Αποτελέσματα

Σύμφωνα με την οικονομική μέθοδο (Budget Method) που προσαρμόστηκε στο ιταλικό σχήμα κατανάλωσης η θεωρητικά μέγιστη ημερήσια πρόσληψη μόλις

ξεπερνά το ADI για το BHA και αλλά προσθετά. Στη δεύτερη μέθοδο η μέση πρόσληψη για το BHA ήταν κάτω από το ADI για τα σχήματα της μέτριας και υπερβολικής πρόσληψης γιαυτό και θεωρήθηκε μη χρήσιμη η εφαρμογή της τρίτης μεθόδου.

Συζήτηση

Χρησιμοποιήθηκε γιαυτη την μελέτη μια κλιμακωτή προσέγγιση για τον υπολογισμό της πρόσληψης προσθέτων με πρωταρχική αντιοξειδωτική δράση στην Ιταλία. Καμία από τις προσλήψεις που υπολογίστηκαν δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα της Ιταλίας. Ως απόρροια των συντηρητικών υποθέσεων που έγιναν για τη παρουσία και τη συγκέντρωση των προσθέτων στα τρόφιμα, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι εσκεμμένα υπερεκτιμημένα.

Συμπέρασμα

Τα αποτελέσματα από τις έρευνες της μελέτης αυτής δείχνουν ότι το ανώτατο επιτρεπτό όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το BHA και αλλά αντιοξειδωτικά είναι επαρκή για την αποφυγή του κινδύνου της πρόσληψης του BHA πάνω από το ADI στην Ιταλία ακόμα και γιαυτους που καταναλώνουν σχετικά μεγάλες ποσότητες τροφίμων στις οποίες εμπεριέχονται αυτά (Leclercq *et al* 2000).

Πίνακας 5 Ιταλικη/ΕΕ Νομοθεσία για τα προσθετά με αντιοξειδωτική δράση

Αντιοξειδωτικά	Τρόφιμα στα οποία επιτρέπεται η χρήση	MPL ¹ mg/ g
BHA (E320) και εστέρες (E310-E312)	Τσίχλα ,διαιτητικά συμπληρώματα Λαρδί , ιχθυέλαιο, μοσχάρι, πουλερικά, κατσικίσιο λίπος Λαδί τηγανίσματος και λίπος τηγανίσματος	400 ²
	Λίπη και έλαια για τον παραγωγό θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων Μίγμα για κέικ ,σνακ με βάση τα δημητριακά, αφυδατωμένες σούπες και ζωμοί, σάλτσες, αφυδατωμένο κρέας, μπαχαρικά και καρυκεύματα	200 ³
	Αφυδατωμένες πατάτες	25

¹ Μέγιστο επιτρεπτό όριο χρήσης

² Οι εστέρες, το BHA η το BHT χωριστά η σε συνδυασμό

³ Εκφρασμένο σε λίπος, εστέρες και BHA είτε χωριστά είτε σε συνδυασμό

Πίνακας 6 TMDI/ADI κλάσμα αξιολογημένο με τη μέθοδο Budget

Υπόθεση	
Συγκέντρωση προσθέτου BHA με αντιοξειδωτική δράση ²	
Μέρος των τροφίμων με το πρόσθετο ³	1/8
Τρόφιμα (mg/Kg)	200
Υγρά (mg/L)	0
TMDI/ADI ¹	1.3

¹ TMDI: Θεωρητικά Μέγιστη Ημερήσια πρόσληψη, ADI: Ημερήσια Επιτρεπτή πρόσληψη

² Για το καθορισμό της υπόθεσης πάνω στη συγκέντρωση των προσθέτων για το BHA, BHT και τους εστέρες οι τσίχλες και τα διαιτητικά συμπληρώματα θεωρήθηκαν ότι δεν χρησιμοποιούνται σημαντικά

³ Υποθέσεις προσαρμοσμένες στα σχήματα κατανάλωσης των Ιταλών

Στον πίνακα 6 φαίνεται ότι το TMDI που υπολογίστηκε με την μέθοδο Budget και με υποθέσεις προσαρμοσμένες στο ιταλικό σχήμα κατανάλωσης μόλις ξεπερνάει το ADI για το BHA (1.3). Γι'αυτο και κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθούν επιπλέον μελέτες.

Σε μια μελέτη χορηγήθηκαν σε δυο ανθρώπους περίπου 2mg BHA/Kg από το στόμα. Μετά από τη χορήγηση βρέθηκαν γλυκονουρίδια και θειαζίδια του BHA και του TBHQ, ενός μεταβολίτη του BHA, στα ουρά (El-Rashidy & Niazi 1983). Ο χρόνος ημίσειας ζωής του BHA στους ανθρώπους έχει αναφερθεί ότι είναι 3 ώρες μετά από τη χορήγηση στο στόμα είτε 5 είτε 30 mg BHA (Castelli *et al* 1984). Έτσι οι μεταβολίτες που βρέθηκαν στα ουρά των ανθρώπων και των αρουραίων υπονοούν ότι το BHA μπορεί να μεταβολισθεί σε TBHQ και το BHA με το TBHQ να αποβάλλονται ως συζυγής ουσίες.

5 Verhagen *et al* 8

Σε μελέτη που έγινε από τους Verhagen *et al.* (1989) χορηγήθηκε σε αρσενικούς αρουραίους Wister μόνη δόση από το στόμα είτε 2 είτε 20 είτε 200 mg BHA/Kg και στους ανθρώπους μονή δόση 0,5mg BHA/Kg. Από τη χορηγούμενη δόση στους αρουραίους τα ουρά περιείχαν 48% συζυγής BHA, 9% συζυγής TBHQ και 2% BHA ενώ τα κόπρανα είχαν 36% BHA. Στους ανθρώπους η μεγαλύτερη ποσότητα του BHA αποβλήθηκε στα ουρά με τη μορφή συζυγούς BHA ενώ μικρότερη ποσότητα με τη μορφή συζυγούς TBHQ και κανένα από αυτά δεν βρέθηκε στα κόπρανα.

Μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα

Yeh *et al.* 2000

Μελέτη που έγινε από τους Yeh *et al* 2000 είχε ως στόχο τη διερεύνηση των επιδράσεων του BHA στη δράση του ένζυμου ακετυλοτρανσφεράση (NAT) και στο σχηματισμό DNA adduct σε καρκινικά κύτταρα από προστάτη ανθρώπινου οργανισμού PC-3. Το πρώτο βήμα για την έναρξη της καρκινογένεσης από αρυλάμινο-καρκινογόνα είναι η μεταβολική τους ενεργοποίηση σε ενεργά ενδιάμεσα που μπορούν να δεσμευθούν σε μακρομορια των οργάνων-στόχων. Η N-ακετυλίωση αποτελεί σημαντική μεταβολική πορεία για τα αρυλάμινο-καρκινογόνα και αυτή η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο NAT. Παρόλο που δεν είναι ακόμα γνωστό εάν η μείωση της δράσης του NAT οδηγεί σε μείωση του σχηματισμού του όγκου ή εάν το BHA μπορεί να αναστείλει το σχηματισμού του καρκίνου του προστάτη, ερευνητές έχουν δείξει ότι αυξημένα επίπεδα δράσης του NAT σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία των μεταλλαξιογόνων επιδράσεων πολλών αρυλάμινο-καρκινογόνων. Έτσι για τη διερεύνηση της επίδρασης του BHA στη δράση του NAT, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες οστικής καλλιέργειας και αναπτύχθηκαν σε θερμοκοιτίδα ως κυτοσόλια και ως άθικτα κύτταρα. Στη συνέχεια προστέθηκε το BHA σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0,8 έως 160μM. Τα αποτελέσματα έδειξαν το BHA εμφανίζει δοσό-εξαρτώμενη επίδραση στη δράση του NAT στα κυτοσόλια και στα άθικτα κύτταρα των PC-3 κύτταρων. Συγκεκριμένα η δράση του NAT στα κύτταρα PC-3 και στα κυτοσόλια αναστάλθηκε από το BHA με δοσοεξαρτώμενο τρόπο δηλαδή όσο πιο υψηλές ήταν οι συγκεντρώσεις του BHA τόσο αναστελλόταν η δράση του NAT. Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν ότι η επακόλουθη έκθεση BHA μείωσε το AF-DNA adduct σχηματισμό που είχε εμφανιστεί στα PC-3 κύτταρα.

2 Hsueh *et al* 2002

Παρόμοια μελέτη με την προηγούμενη έγινε από τους Hsueh *et al* 2002 όπου μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση του BHA στη δράση της αρυλαμίνης N-ακετυλοτρανσφεράσης (NAT) και ο σχηματισμός DNA-adduct στη καρκινική κυτταρική γραμμή T-24 ανθρώπινης ουροδόχου κύστεως. Η δράση του NAT σε ανθρώπους και σε μερικά ζώα καθορίζεται γενετικά και ο φαινότυπος της ραгдаίας ακετυλίωσης σχετίζεται με καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού ενώ ο αργός

φαινότυπος σχετίζεται καρκίνο ουροδόχου κύστεως που προκαλείται από αρυλαμίνες (Weber *et al* 1985). Στους ανθρώπους η δράση του NAT έχει σημειωθεί στο έντερο και στη κύστη (Kirlin *et al* 1989). Έτσι για τη μελέτη της επίδρασης του BHA, απομονώθηκε καρκινική κυτταρική γραμμή (T-24) από γυναίκα 81 ετών, καυκάσιας φυλής. Στη συνέχεια έγινε έκθεση των κύτταρων αυτών σε BHA σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0,8 έως 1600μΜ και η δράση του NAT μετρήθηκε με HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης). Μετά έγινε μελέτη σε ανθρώπινη καρκινική κυτταρική γραμμή T-24 των κυτοσολίων και των άθικτων κύτταρων για τη δράση NAT και το σχηματισμό DNA-adduct. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση του NAT και ο σχηματισμός DNA-adduct σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινης κύστεως είχε ανασταλεί και μειωθεί από το BHA με δόσο-εξαρτώμενη τρόπο, δηλαδή η αύξηση της συγκέντρωσης BHA προκάλεσε την αύξηση της αναστολής της δράσης του NAT στα κυτοσολία και στα άθικτα κύτταρα. Παρόλο που δεν είναι γνωστό εάν αυτή η μείωση της δράσης του NAT οδηγεί σε μείωση του σχηματισμού του όγκου ή εάν το BHA μπορεί να προλαμβάνει το σχηματισμό καρκίνου της κύστεως, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένη δραστηριότητα του NAT σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στις μεταλλαξιογόνες επιδράσεις πολλών αρυλαμινών. Περαιτέρω διερεύνηση χρειάζεται για να εξετασθεί εάν η μείωση της δράσης του NAT οδηγεί σε μείωση της κακοήθειας οργάνων στόχων μετά από έκθεση σε καρκινογόνα. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το BHA προκάλεσε αναστολή της δράσης του NAT σε κυτοσολία ανθρώπινων καρκινικών κύτταρων κύστεως *in vit* ο και σε άθικτα κύτταρα.

3 Ki lin *et al*.

Μελέτη που έγινε από τους Kirlin *et al* 1999 έδειξε ότι το BHA μεταξύ άλλων ουσιών ενεργοποίησε την απόπτωση σε καλλιέργεια κύτταρων καρκινώματος ανθρώπινου εντέρου με συγκέντρωση που είχε εύρος από 15-60 μmol/L. Συγκεκριμένα διαιτητικά μόρια που ενεργοποιούν τη γλουταθιόνη S-τρανσφεράση το οποίο είναι ένζυμο αποτοξίνωσης και παρόμοια συστήματα αποτοξίνωσης (ενεργοποιητές ενζύμων φάσης 2) θεωρείται ότι προλαμβάνουν το καρκίνο μέσω του περιορισμού των χημικών καρκινογόνων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι μετά από 24ωρη έκθεση σε BHA εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δράσης της γλουταθιονίνης S-τρανσφεράσης (36 σε 86%). Έτσι η μελέτη έδειξε ότι

τα μόρια που ενεργοποιούν τα ένζυμα αποτοξίνωσης της φάσης 2 μπορούν να ενεργοποιήσουν και απόπτωση όταν χρησιμοποιηθούν στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης σε HT29 κύτταρα. Επομένως αυτά θα μπορούσαν να προστατέψουν έναντι του καρκίνου με δυο ξεχωριστούς μηχανισμούς, με ενισχυμένη αποτοξίνωση καρκινικών συμπλόκων (ενεργοποίηση ένζυμων φάσης 2) και ενισχυμένο περιορισμό των προκαρκινικών κυττάρων (απόπτωση). Η ενεργοποίηση της απόπτωσης σε προκαρκινικά κύτταρα μπορεί να προστατέψει έναντι του σχηματισμού καρκίνου ακόμη και μετά από μετάλλαξη που προκαλείται από χημική ουσία και επομένως να αποτελεί βάση για διαιτητική αντιμετώπιση πρόληψης καρκίνου.

4 Reimund *et al.* 8

Μελέτη που έγινε από τους Reimund *et al*, 1998 είχε ως σκοπό την εξέταση *in vit* ο της επίδρασης του BHA και άλλων αντιοξειδωτικών στον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) και στην παραγωγή της ιντερλευκίνης IL-1, IL-6 και IL-8 από περιφερικά μονοκυτταρικά κύτταρα αίματος (PBMCs) και από καλλιέργειες οργάνων φλεγμονώδους βλεννογόνου εντέρου από ασθενείς με νόσο Crohn και εντερική κολίτιδα. Απομονώθηκαν PBMCs και εντερική βλέννα από ασθενείς με ενεργό φλεγμονώδη νόσο εντέρου. Τέσσερις ασθενείς με νόσο Crohn (μέσος όρος ηλικίας 38, εύρος 26-57) και τέσσερις με εντερική κολίτιδα (μέσος όρος ηλικίας 32, εύρος 30-34) χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη. Τα PBMCs απομονώθηκαν από 6 ασθενείς (3 με νόσο Crohn και 3 με εντερική κολίτιδα) τουλάχιστον 12 ώρες μετά την τελευταία φαρμακευτική αγωγή. Εντερικές βιοψίες έγιναν κατά την κολονοσκόπηση (4 για νόσο Crohn και 4 για εντερική κολίτιδα) από ενδοσκοπικά φλεγμονώδους περιοχές εντερικού βλεννογόνου σύμφωνα με τον Wardle *et al* 1992. Η δομική ακεραιότητα των βιοψιών αξιολογήθηκε με ιστολογική εξέταση. Η παραγωγή της IL-1, IL-6 και IL-8 και του TNF μετρήθηκε με τη χρήση ειδικών ανοσοεκθέσεων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το BHA μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις της IL-1 σε καλλιέργεια supernatants και τις IL-6. Αντιθέτως οι συγκεντρώσεις των IL-8 και ο παράγοντας TNF δεν μεταβλήθηκαν. Έτσι το BHA ανέστειλε σημαντικά την παραγωγή IL-1 σε καλλιέργειες οργάνων εντερικού βλεννογόνου από ασθενείς με εντερική κολίτιδα και νόσο Crohn. Επομένως η μελέτη αυτή έδειξε ότι το BHA σε συγκέντρωση 5μmol/L κοντά στο IC50, ανέστειλε σημαντικά την παραγωγή κυτοκινών φλεγμονώδους απάντησης με τη χρήση PBMCs και βλέννας

φλεγμονώδους εντέρου από ασθενείς με φλεγμονώδης νόσο εντέρου. Έτσι τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ΒΗΑ και άλλα αντιοξειδωτικά μπορούν να μειώσουν την παραγωγή κυτοκινών σε ασθενείς με φλεγμονώδης νόσο εντέρου και επομένως μπορεί να θεωρηθούν ως βοηθητικά θεραπευτικά μέσα για αυτή τη νόσο. Χρειάζονται όμως περαιτέρω μελέτες για τη καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της αναστολής των κυτοκινών με τη βοήθεια των αντιοξειδωτικών στο εντερικό βλεννογόνο.

B. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επιδημιολογική εκτίμηση που έγινε στα πλαίσια αυτής της εργασίας έδειξε ότι οι πλειοψηφία των μελετών που έχουν γίνει για την αξιολόγηση των πολλαπλών δράσεων του ΒΗΑ έχουν γίνει σε ζώα, αρκετές έχουν γίνει σε ανθρώπινα κύτταρα *in vivo* και περιορισμένες έχουν γίνει σε ανθρώπους.

Από τις μελέτες που έγιναν στους ανθρώπους αυτή που αξιολόγησε την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου στόμαχου από την συνήθη χαμηλή πρόσληψη του ΒΗΑ (Botterwecke *et al* 2000) δε βρήκε καμία συσχέτιση μεταξύ αυτών των δυο παραγόντων. Επίσης μια άλλη αναδρομική μελέτη αξιολόγησε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης καρκίνου μαστού στις γυναίκες και της έκθεσης στο ΒΗΑ στον εργασιακό χώρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου μαστού με την πρόσληψη του ΒΗΑ. Παραταυτα χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων καθώς η μελέτη έγινε σε μικρό αριθμό ανθρώπων με αποτέλεσμα τα ευρήματα να είναι ασταθή. Άλλη μελέτη που έγινε από την Ιταλία και είχε ως σκοπό τον προσδιορισμό της μέσης πρόσληψης του ΒΗΑ έδειξε ότι η πιθανότητα να ξεπεραστεί το ADI (Ημερήσιο Επιτρεπτό Όριο) για το ΒΗΑ είναι πολύ μικρή. Αυτό είναι σημαντικό καθώς μας δείχνει ότι ο κίνδυνος που σχετίζεται με την αυξημένη πρόσληψη του ΒΗΑ είναι μειωμένος για τους ανθρώπους αφού το MPL (Μέγιστο Επιτρεπτό Όριο) που έχει καθορισθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για το ΒΗΑ είναι επαρκές για την αποφυγή των πιθανά δυσμενών επιπτώσεων που σχετίζονται με την πρόσληψη άνω του ADI για το ΒΗΑ, ακόμα και για τα άτομα που καταναλώνουν σχετικά μεγάλες ποσότητες τροφίμων που το περιέχουν (Leclercq *et al* 2000). Άλλες μελέτες που έγιναν στους ανθρώπους έδειξαν ότι το ΒΗΑ που χορηγείται από το στόμα αποβάλλεται από τα νεφρά (Rashidy & Niazi 1983, Verhagen *et al* 1989).

Οι μελέτες που έγιναν σε ανθρώπινα κύτταρα *in vitro* έδειξαν ότι το ΒΗΑ μπορεί να αναστείλει τη δράση του ένζυμου NAT και το σχηματισμό των DNA adduct σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα κόστεως. Αυτό το εύρημα είναι σημαντικό καθώς η N-ακετυλίωση είναι η κύρια μεταβολική πορεία των αρυλαμινό-καρκινογόνων (Hsueh *et al* 2000) και η ταχεία δράση του NAT έχει φανεί ότι προδιαθέτει τον άνθρωπο για ανάπτυξη του καρκίνου εντέρου και του μαστού ενώ η βραδεία φάση σχετίζεται με

καρκίνο κύστεως που προκαλείται από τις αρυλαμίνες (Weber *et al.* 1986). Άλλη μελέτη έδειξε ότι το BHA μπορεί επίσης να αναστείλει τη δράση του NAT και το σχηματισμό DNA adduct σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Yeh *et al.* 2000). Μελέτη που έγινε σε κύτταρα καρκινώματος ανθρώπινου εντέρου έδειξε ότι το BHA μπορεί να ενεργοποιήσει την απόπτωση σε αυτά τα κύτταρα λειτουργώντας ως ενεργοποιητής των ένζυμων της φάσης 2. Έτσι η μελέτη αυτή έδειξε ότι το BHA και παρόμοια μόρια μπορούν να προστατέψουν έναντι του καρκίνου με μηχανισμό διαφορετικό και επιπλέον σε αυτόν που σχετίζεται με τον περιορισμό των καρκινογόνων. Αυτό είναι σπουδαίο γιατί αν γίνεται και *in vivo*, δίαιτα υψηλή σε αυτά τα μόρια μπορεί να περιορίσει τα προκαρκινικά κύτταρα που σχηματίζονται με το μηχανισμό της απόπτωσης σε χρόνο μετά από την αρχική έκθεση σε καρκινογόνα. Σε άλλη μελέτη που αξιολογήθηκε η επίδραση του BHA στο παράγοντα TNF και στις ιντερλευκίνες IL-1, IL-6, IL-8 σε περιφερικά μονοκυτταρικά κύτταρα και σε βιοψία βλέννας εντέρου από ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο εντέρου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μειώθηκε η παραγωγή της IL-1 και IL-6 και αναστάλθηκε σε κάποιο βαθμό η παραγωγή του TNF μετά από έκθεση σε BHA. Έτσι η σημαντικότητα αυτών των αποτελεσμάτων είναι ότι το BHA μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπευτική αντιμετώπιση της φλεγμονώδους νόσου εντέρου.

Οι μελέτες που έγιναν σε ζώα είναι σε αριθμό περισσότερες και τα αποτελέσματα τους είναι ποικιλόμορφα. Μια μελέτη (Manjari *et al.* 2002) έδειξε ότι το BHA αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c δείχνοντας ότι αυτά τα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την απόπτωση που προκαλείται από την υπερϊώδη ακτινοβολία προστατεύοντας από τον κυτταρικό θάνατο. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σημαντικό καθώς αναδεικνύει την ικανότητα του BHA να λειτουργεί ως αντι-αποπτωτικό μόριο. Άλλη σημαντική μελέτη έδειξε ότι το BHA μειώνει την ηπατοτοξικότητα που προκαλείται από τις ηπατοτοξικές ουσίες βρωμοβενζόλιο και τριχλωροβενζόλιο (Mizutani & Miyamoto 1999). Άλλη μελέτη έδειξε ότι το BHA μπορεί να προστατεύει έναντι καρκινογόνων ουσιών όπως είναι το MNNG. Συγκεκριμένα η μελέτη έδειξε ότι το BHA προστατεύει από τις μεταλλακτικές δράσεις του MNNG χωρίς όμως να προκαλεί το ίδιο κυτταροτοξικότητα, απόπτωση και διάσπαση του γενετικού υλικού (Slamenova *et al.* 2003). Μελέτη που έγινε σε αρουραίους έδειξε ότι το BHA μπορεί να αναστείλει την υπερτροφία καρδιακών μυοκυττάρων που προκαλείται από τον παράγοντα TNF-α και την αγγειοτενσίνη 2.

Αυτό είναι σημαντικό καθώς μυοκαρδιακή υπερτροφία είναι μια από τις πιο σημαντικές εκδηλώσεις των καρδιακών ασθενειών (Nakamura *et al* 1998). Σημαντικό επίσης είναι το εύρημα ότι το BHA αναστέλλει την ογκογένεση που προκαλείται από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες οι οποίοι αποτελούν σημαντική ομάδα καρκινογόνων ουσιών που είναι πολύ πιθανό να αποτελούν μια από τις αιτίες καρκίνου των πνευμόνων σε καπνιστές και σε άτομα που περιστασιακά εκτίθενται σε αυτούς (Hecht *et al* 2002). Μελέτη που έγινε από τον προηγούμενο ερευνητή έδειξε πάλι ότι BHA μπορεί να προστατέψει από την ανάπτυξη όγκου του πνεύμονα σε ποντίκια από καρκινογόνα του καπνού όταν χορηγηθεί κατά την περίοδο έκθεσης σε αυτά. Έτσι θα μπορούσε να χρησιμοποιείται από τους καπνιστές με σκοπό τη προστασία τους από τον καρκίνο πνεύμονα (Hecht *et al* 1999). Άλλη σημαντική μελέτη έδειξε ότι το BHA έχει χημειοπροστατευτική δράση έναντι των ετεροκυκλικών αμινών. Αυτό το εύρημα είναι σημαντικό καθώς οι ετεροκυκλικές άμινες βρίσκονται σε μαγειρευμένα τρόφιμα και μελέτες έχουν δείξει έχουν γενοτοξικές και μεταλλακτικές επιδράσεις (Hayatsu *et al* 1999). Παρόμοια μελέτη που έγινε σε αρουραίους έδειξε πάλι ότι το BHA αποτελεί προστατευτικούς παράγοντας έναντι των σημαντικά περιβαλλοντικών καρκινογόνων ετεροκυκλικών αμινών (Hirose *et al* 1999). Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι το BHA μπορεί να αναστείλει την μεταλλαξιογόνο δράση που προκαλείται από την αφλατοξίνη B1, η οποία αποτελεί σημαντική απειλή για τον άνθρωπο αν εισαχθεί σε αυτόν μέσω της τροφής καθώς είναι μια από τις πιο δυνητικές τοξίνες που παράγεται από μύκητες που μπορούν να αναπτυχθούν στη τροφή (Soni *et al*. 1997).

Όσον αφορά τις μελέτες που αξιολόγησαν τις αρνητικές επιδράσεις του BHA, μια ανάλυση που είχε ως σκοπό την αξιολόγηση της γενοτοξικότητας χημικών ουσιών μεταξύ των οποίων και το BHA σε 8 όργανα ποντικών έδειξε ότι το BHA προκαλεί διαταραχές στα γαστρεντερικά όργανα. Έτσι τα αποτελέσματα αυτά ανέδειξαν την ανάγκη για πιο εκτεταμένη μελέτη πάνω σε αντιοξειδωτικά όπως το BHA (Sasaki *et al* 2002). Πολλές μελέτες έδειξαν ότι το BHA προκαλεί καρκίνο στο προστόμαχο των αρουραίων. Συγκεκριμένα (Ito *et al* 1983) ότι το BHA σε συγκέντρωση 2% προκάλεσε σε αρουραίους και σε χαμστεράκια υπερπλασία, παπλώματα, και καρκινώματα στο προστόμαχο. Επιπλέον (Ito *et al* 1983) συνέχισε τη μελέτη του για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ δόσης-απόκρισης της πρόσληψης του BHA και του σχηματισμού καρκίνου στο προστόμαχο των αρουραίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν

ότι υπάρχει η σχέση αυτή μεταξύ της πρόσληψης του BHA και της ανάπτυξης της υπερπλασίας, παπλώματος και λεπιοειδούς καρκίνου. Επίσης οι Masui *et al* 1986 την καρκινογονική δράση του BHA στο προστόμαχο όπως και οι Tamano *et al* 1998 που σύγκρινε την καρκινογονική δράση του BHA σε διαφορετικές οικογένειες αρουραίων.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν δείξει ότι η χορήγηση από το στόμα του BHA προκαλεί υπερπλασία, παπλωματά, και λεπιοειδή καρκινώματα στο προστόμαχο των αρουραίων, των ποντικών και των χαμστερ. Δεν υπάρχει όμως καμία συσχέτιση μεταξύ και του καρκίνου στο αδενικό τμήμα του στόμαχου ή στον οισοφάγο αυτών των πειραματόζων. Επίσης ο σχηματισμός του όγκου συνήθως δεν εμφανίζεται μέχρι πολύ αργά στη ζωή των αρουραίων και μετά από συνεχή έκθεση σε υψηλές δόσεις BHA. Ο προστόμαχος είναι ένα τμήμα του στομάχου των αρουραίων που αποτελείται από διαστρωματικά λεπιοειδή επιθηλιακά κύτταρα που διαφέρουν από τα αδενικά, οξυοεκκρινόμενα κύτταρα του ανθρώπινου στόμαχου. Ενώ, ο οισοφάγος των ανθρώπων έχει τον ίδιο επιθηλιακό τύπο με το προστόμαχο αλλά δεν έχει βρεθεί ογκογονική επίδραση του BHA σε αυτό το τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα. Επειδή ο επιγενετικός μηχανισμός φαίνεται να περιλαμβάνει τοπική κυτοτοξική διαδικασία εντοπισμένη στο λεπιοειδή επιθήλιο της πεπτικής οδού πιθανός στόχος στους ανθρώπους θα ήταν το λεπιοειδή επιθήλιο του άνω πεπτικού συστήματος. Όμως η έλλειψη ογκογονικής επίδρασης του BHA στον οισοφάγο πιθανώς να οφείλεται στη γρήγορη μεταβίβαση του BHA κατά μήκος του οισοφάγου σε σχέση με το μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης του BHA στο προστόμαχο των αρουραίων έτσι η έκθεση είναι πολύ μικρότερη από αυτήν που υπάρχει στο προστόμαχο των αρουραίων. Επομένως είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η εμφάνιση του καρκίνου περιορίζεται στο προστόμαχο των αρουραίων που δεν υπάρχει στον άνθρωπο ενώ καμία επίδραση του BHA δεν έχει βρεθεί στο αδενικό τμήμα του στόμαχου, στον οισοφάγο και σε άλλα όργανα. Επομένως αναμένεται ότι οι άνθρωποι είναι λιγότερο επηρεπής στις καρκινογονικές επιδράσεις του BHA απ'ότι οι αρουραίοι.

Οι Ito *et al* 1986 είχαν διατυπώσει ότι το NOEL για υπερπλασία, παπλωματά και καρκινώματα είναι 1250, 5000, και 10000ppm αντίστοιχα. Ενώ το NOEL για τον σχηματισμό όγκου είχε καθορισθεί στα 3000ppm (Williams *et al* 1986). Η πρόσληψη

από τους ανθρώπους έχει βρεθεί ότι είναι $<0,1\text{mg/Kg}$ ενώ το NOEL για τους αρουραίους για καλοήγησ όγκους και υπερπλασία αντιστοιχούν σε δόσεις 230 και 55mg/Kg/ημ αντίστοιχα. Έτσι οι δόσεις που είναι απαραίτητες για την εμφάνιση των ογκογονικών ιδιοτήτων στους αρουραίους είναι τουλάχιστον μερικές εκατοντάδες φορές μεγαλύτερες από τη μέση διαιτητική πρόσληψη του BHA των ανθρώπων ενώ για τον καρκίνο η διάφορα είναι μερικές χιλιάδες φορές μεγαλύτερη. Συμπερασματικά λοιπόν η δυνατότητα καρκινογένεση του BHA στους ανθρώπους είναι πιθανή μόνο σε πολύ υψηλές δόσεις. Επιπλέον λόγω των ατομικών διαφορών που υπάρχουν προβλέπεται ότι οι άνθρωποι έχουν μικρότερη ευαισθησία στις επιδράσεις του BHA σε σχέση με τους αρουραίους. Έτσι το BHA παρουσιάζει ιδιότητες που είναι ειδικές για το κάθε είδος. Συνεπώς λοιπόν λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση δόσης-απόκρισης και την ειδική για το είδος ογκογονική απάντηση του BHA, η χρήση του BHA ως προσθετό τροφίμων δεν προβλέπεται να αποτελεί καρκινογονικό παράγοντα για τον άνθρωπο (Williams & Whysner, 1995). Αυτό υποστηρίζει και την απόφαση των αρχών που αξιολόγησαν αυτά τα δεδομένα να προτείνουν τη συνέχιση της χρήσης του BHA ως προσθετό στα τρόφιμα (Iverson 1995, JECFA 1996) παρά την αξιολόγηση του International Agency for Research on Cancer ότι το BHA αποτελεί πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (IARC, 1987). Επιπλέον οι χαμηλές συγκεντρώσεις των 125 ppm που πλησιάζουν επίπεδα των προσθέτων στα τρόφιμα παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα εξάγεται το συμπέρασμα ότι για τη χρήση του BHA ως προσθετό στα τρόφιμα θα πρέπει να γίνουν περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες που να αξιολογούν τις επιδράσεις της μακροχρόνιας έκθεσης του ανθρώπου στο BHA για να αποφασισθεί με βεβαιότητα εάν η χρήση του BHA είναι ασφαλής ή όχι. Έτσι δε μπορεί να ειπωθεί με απόλυτη σιγουριά ότι δε θα έπρεπε να χρησιμοποιείται το BHA στη βιομηχανία τροφίμων γιατί δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να συνηγορούν υπέρ αυτού. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει αμφιβολία ότι το BHA προκαλεί καρκίνο στο προστομαχο των αρουραίων αλλά όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως στον άνθρωπο δεν υπάρχει ο προστομαχος έτσι δεν μπορεί αυτό το εύρημα να γενικευτεί και για τους ανθρώπους. Επιπλέον το γεγονός ότι το επιθήλιο του προστόμαχου μοιάζει με αυτό του οισοφάγου στον ανθρώπινο οργανισμό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη για την απαγόρευση του BHA καθώς ο χρόνος διέλευσης κατά μήκος του οισοφάγου των περιεχομένων που εισάγονται από το

στόμα, είναι πολύ μικρός για να μπορεί να δράσει αρνητικά το BHA. Επίσης είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι δεν υπάρχουν μελέτες, ακόμη και σε ζώα που να δείχνουν ότι επίπεδα του BHA κοντά σ'αυτα που προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο μέσω της διατροφής μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στον άνθρωπο γιατί οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν πολύ υψηλές δόσεις BHA που ξεπερνούν κατά εκατοντάδες έως και χιλιάδες φορές τα επίπεδα του BHA που επιτρέπεται να χρησιμοποιείται στα τρόφιμα και που τελικά προσλαμβάνεται από τον άνθρωπο μέσω της τροφής. Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι το BHA έχει και πολλές ευεργετικές επιδράσεις και μάλιστα αντικαρκινικές καθώς προστατεύει από τις επιβλαβείς δράσεις διάφορων καρκινογόνων ουσιών. Επίσης προστατεύει από τις τοξικές δράσεις των αφλατοξινών που παράγονται από μύκητες που μπορεί να προσβάλλουν τα τρόφιμα και να είναι απειλητικές για τον άνθρωπο. Έτσι εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά στοιχεία που να δείχνουν ότι δε θα έπρεπε να συνεχίζεται η χρήση του BHA στα τρόφιμα .

Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allen J.C. and Hamilton R.J. (1994), The use of antioxidants, In: “Rancidity in Foods”, J.C.Allen ,R.J Hamilton ,Chapman &Hall ,London, pp 85-103
2. Aleuritou-Gouliemou Eleni (1993), Boutyliki Ydroxyanisoli, In:“ Ta Prostheta sta Trofima”, Aleuritou-Gouliemou Eleni , EK, POI. ZO, Athina, pp126-127
3. Aschengrau Ann, Coogan F. Patricia, Quinn M. Margaret and Cashins J.Lisa. (1998) Occupational Exposure to Estrogenic Chemicals and the Occurrence of Breast Cancer: An Explanatory Analysis. **American Journal of Industrial Medicine** 34, 6-14
4. Boskou D. (1997), Alla Epithimita Systatika Trofimon kai Ximika Prostheta, In “Ximeia Trofimon”, Ekdoseis Gargatani. Thessalloniki, pp 240-243
5. Botterweck A.A.M., Verhagen H., Goldbohm R.A., Kleinjans J. and van den Brandt P.A., (1999) Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analysis in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology** 38, 599-605
6. Chung T. Effects of Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Acetylation of 2-Aminofluorene and DNA-2-Amino-fluorene Adducts in the Rat. **Toxicological Sciences** 51, 202-210
7. Coultate T.P. (1996), Lipids, In “FOOD. The Chemistry of its Components”, Coultate T.P, Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 69-78
8. Fulu Hseuh, Wu His-Chin, Hsiu Te-Chun, Chen When -Chi, Hung Chi-Fu and Chung Jing-Gung. (2002) Effects of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene on DNA Adduct Formation and Arylamine N-Acetyltransferase Activity in Human Bladder Tumor Cells. **Journal of Applied Toxicology** 22, 37-44
9. Hecht S, Kenney P, Wang M, Trushin N, Agarwal S, Rao A, Upadhyaya. (1999) Evaluation of butylated hydroxyanisole, myo-inositol, curcumin, esculetin, resveratrol and lycopene as inhibitors of benzo (a) pyrene plus 4-(methylnitrosominol-1- (3-pyridyl))-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. **Cancer Letters** 137, 123-130
10. Hecht S, Kenney P, Wang M, Upadhyaya. (2002) Benzyl-isothiocyanate: an effective inhibitor of polycyclic aromatic hydrocarbon tumorigenesis in A/J mouse lung. **Cancer Letters** 187, 87-94

11. Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Futacuchi M and Shirai T. (1999) Phenolics: Blocking Agents for Eterocyclic Amine-induced Carcinogenesis. *Food and Chemi al Toxi ology* 37, 985-992
12. Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Futakuchi M, Shirai T, Shibutani M, Uneyama C, Toyoda K, Iwata H. (1999) Chemoprevention of eterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. *Can e Lette s* 143, 173-178
13. Iverson F. (1995) Phenolic Antioxidants: health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. *Can e Lette s* 93, 49-54
14. Iverson F. (1999) **In vivo** Studies on Butylated Hydroxyanisole Hydroxyanisole. *Food and Chemi a Toxi ology* 37, 993-997
15. Kazafumi Nakamura, Kazuo Fushimi, Hirosuke Kouchi, Kochiro Mihara, Masahiro Miyazaki, Tohru Ohe, Massayoshi Namba. (1998) Inhibitory Effects of Antioxidants on Neonatal Rat Cardiac Myocyte Hypertrophy Induced by Tumor Necrosis Factor- α and Angiotensin 2. *Ci ulation* 98, 794-799
16. Kirlin G Ward, Cal Jiyang, De Long Mary, Patton J.Emma and Jones P. Dean. (1999) Dietary Compounds that Induced Cancer Preventive Phase 2 Enzymes Activate Cells. *Jou nal of Nut ition* 129, 1827-1835
17. Le Blanc GA, Gillette JS. (1993) Elevation of serun cholesterol levels in mice by the antioxidant butylated hydroxyanisole. *Bio hem Pha ma ol* 2, 513-515
18. Leclerq C., Arcella D.and Turrini A. (2000) Estimates of the theoretical daily intake of erythorbic acid, gallates, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in Italy: a stepwise approach. *Food and Chemi al Toxi ology* 38, 1075-1084
19. Luetzow Manfred. (2003) Harmonization of Exposure Assessment for Food Chemicals: The International Perspective. *Toxi ology Lette s* 140-141, 419-425
20. Mizutani Tamio, Miyamoto Yoko. (1999) Modulation of Halobenzene-induced Hepatotxicity by DT-diaphorase Modulators, butylated hydroxyanisole and dicoumarol: evidence for possible involvement of quinone metabolites in the toxicity of halobenzenes. *Toxi ology Lette s* 105, 25-30

21. Mohan Manjari, Taneja K.Tarvinder, Sahdev Sadhir, Mohareer Krishnaveni, Begum R, Athar M, Sah.N, Hasnein S. (2003) Antioxidants Prevent UV-induced apoptosis by Inhibiting Mitochondrial Cytochrome C Release and Caspase Activation in *Sphodopte a f ugipe da* (sf Cells. *Cell Biology Inte national* 27, 483-490
22. Moore A.M, Thanavit W, Tiwawech D, Ho N, Tsuda H. (1998) Modulation of Dihydroxy-di-n-propylnitrosamine-induced Liver Lesion Development in Opisthorhise-infected Syrian Hamsters by Praziquantel Dehydroepiandrosterone Administration. *Jpn J Can e Res* 89, 1113-1117
23. Munday R, Smith B, Munday C. (1999) Effect of butylated hydroxyanisole on the toxicity of 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone to rats. *Chemi o-Biologi al Inte a tions* 117, 241-256
24. Nagaoka S, Masaki H, Aoganna Y, Yoshida A. (1986) Effects of sxcess dietary tyrosine or certain xenobiotics on the cholesterogenesis in rats. *J Nut* 5, 726-32
25. Proudlove RK (1994), Lipids, In "The Science and Technology of Foods", ,Forbes Publications Limited, London, pp 40-42
26. Reimund J.M, Allison A.C., Muller C.D., Dumont S., Kenney J.S., Baumann R., Duclos B. and Poindron P. (1998) Antioxidants inhibit the *in vit o* production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eu opean Jou nal of Clini al Investigation* 28, 145-150
27. Reus KE, Houben GF, Stam M, Dubois AE. (2000) Food additives as a cause of medical symptoms: relationship between sulfites and asthma and anaphylaxis; results of a literative review. *Ned Tijds Genees d* 38, 1836-9
28. Sakai A, Miyata N, Takahashi A. (1996) Promoting activity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) in BALB/3T3 cell transformation. *Can e Lette s* 115,213-220
29. Sasaki F.Y, Kavaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama M, Taniguchi, Tsuda S. (2002) The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Resea h* 519, 103-119.
30. Shahidi Fereidon and Naczk Marian, (2004), Antioxidant Properties of Food Phenolics, In "Phenolics in Food and Nutraceuticals", Shahidi Fereidon and Naczk Marian, CRC Press, Florida, pp 403-417

31. Slamenova Dorina, Horvathova Eva, Robichova Sona, Itrusovska Lubica, Gabelova Alena, Kleibl Karol, Jabikova Jang and Sedlack Jan. (2003) Molecular and Cellular Cells Treated with N-Methy-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: Antimutagenicity of Butylated Hydroxyanisole. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 41, 28-36
32. Smith Jim and Hong-Shum Lily (2003), Antioxidants, In "Food Additives Data Book", Smith Jim and Hong-Shum Lily, Blackwell Science Ltd, Oxford, pp 86-88
33. Soni K.B, Lahiri M, Chackrade P, Bhide S.V, Kuttan R. (1997) Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenicity. **Cancer Letters** 115, 129-133
34. Whysner John and Williams M.Gary. (1996) Butylated Hydroxyanisole Mechanistic Data and Risk Assessment: Conditional Species-Specific Cytotoxicity, Enhanced Cell Proliferation and Tumor Promotion. **Pharmacology Therapeutics** 71, 137-151
35. Williams GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM (2002) Anticarcinogenicity of monocyclic phenolic compounds. **Eur J Cancer Prevention** 2, 101-7
36. Williams G, Iatropoulos M. (1996) Inhibition of the hepatocarcinogenicity of aflatoxin B in rats by low levels of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Cancer Letters** 104, 49-53
37. Williams G.M., Iatropoulos M.J. and Whysner J. (1999) Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. **Food and Chemical Toxicology** 37, 1027-1038
38. Wilson RB, Middleton CC, Sun GY. (1978) Vitamin E, antioxidants and lipid peroxidation in experimental atherosclerosis of rabbits. **J Nutrition** 111, 1858-67
39. Yeh C.C, Chung J.G, Wu H.C, Li Y.C, Lee Y.M and Hung C.F. (2000) Effects of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene on DNA Adduct Formation and Arylamines N-acetyltransferase Activity in PC-3 Cells (human prostate tumor) *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology** 38, 977-983

Δ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συνθετικό αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της φρεσκάδας, της θρεπτικής αξίας, της γεύσης και του χρώματος των τροφίμων. Στο πέρασμα των χρόνων έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για τη διερεύνηση πιθανών δυσμενών επιδράσεων που μπορεί να έχει η πρόσληψη του BHA στην υγεία του ανθρώπου. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το BHA έχει αντικαρκινικές επιδράσεις ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το BHA σε υψηλές δόσεις προκαλεί λεπιοειδή κυτταρικό καρκίνωμα στο προστόμαχο των τρωκτικών, το οποίο όμως δε διαθέτουν οι άνθρωποι. Επίσης έχουν δείξει ότι το BHA δεν είναι DNA-αντιδραστικό και ο επιγενετικός μηχανισμός του σχηματισμού όγκου περιλαμβάνει κυτταροτοξικότητα και αναπαραγωγή κύτταρων, οι οποίες διαδικασίες είναι κυρίως αντιστρέψιμες.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επιδημιολογική εκτίμηση της επίδρασης της χρήσης του BHA στην υγεία του ανθρώπου μέσα από την ανασκόπηση διάφορων μελετών που έχουν γίνει τις τελευταίες δυο δεκαετίες. Οι επιδημιολογικές μελέτες που εξετάζουν την επίδραση του BHA στην υγεία του ανθρώπου είναι πολύ περιορισμένες ενώ η πλειοψηφία των μελετών έχουν γίνει σε ζώα και αρκετές έχουν γίνει σε ανθρώπινα κύτταρα. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι το BHA σε υψηλές της τάξεως των 3000 ppm μπορεί να προκαλέσει λεπιοειδή κυτταρικό καρκίνωμα στο προστόμαχο των αρουραίων αλλά όχι αδενικό κυτταρικό καρκίνωμα ή άλλων ειδών νεοπλασιών στον αδενικό στόμαχο. Αυτό όμως δε μπορεί να γενικευθεί και για τους ανθρώπους καθώς αυτοί δε διαθέτουν προστόμαχο. Επιπλέον η μέση πρόσληψη του BHA από τους ανθρώπους είναι $<0.1 \text{ mg/Kg/ημ}$ η οποία είναι κάτω από τα χαμηλότερα επίπεδα επίδρασης των 230 mg/Kg/ημ που έχει βρεθεί για υπερπλασία στους αρουραίους. Έτσι λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα έχουν αναφερθεί για τις επιδράσεις του BHA σε αρουραίους και σε ανθρώπους καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά στοιχεία που να συνηγορούν υπέρ της απαγόρευσης της χρήσης του BHA στα τρόφιμα και επιπλέον είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους διότι τα μέχρι στιγμής δεδομένα δείχνουν ότι η καρκινογενετικότητα του BHA είναι ειδική για το είδος και δε σχετίζεται με τον άνθρωπο ενώ οι καρκινικές του δράσεις εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενο χαρακτήρα.

ABSTRACT

Butylated hydroxyanisole (BHA) is a widely used synthetic antioxidant that is used to preserve the freshness, the nutritive value, the flavour and the colour in foods. Within the years it has been subjected to extensive testing and research to determine whether it has the potential of harmful effects. Many studies have shown that BHA has anticarcinogenic effects and others have shown that BHA at high levels causes squamous cell carcinoma in the forestomach of rodents, which is not found in humans. The studies have also shown that BHA is not DNA-reactive and the epigenetic mechanism of tumor formation involves cytotoxicity and enhanced cell proliferation which is mostly reversible.

The aim of this research paper was the epidemiologic evaluation of the potential effects of the use of BHA as an antioxidant in foods, on people's health through the examination of scientific studies that have been done over the past two decades. Because there are very few reported human epidemiological studies, the majority of the studies that were found, were on animals and a smaller number was found on isolated human cells. The results of the studies showed that BHA has many effects and that it can be referred to as an antioxidant, a prooxidant, an anticarcinogen, a carcinogen and a tumor promoter. It is important to state that the experimental studies that were found showed that BHA causes squamous cell carcinoma only at high doses above 3000ppm in the forestomach of rodents but not glandular cell or other types of neoplasms in the glandular stomach. However this finding cannot be generalized for humans, because they don't have a forestomach. Also, even though the squamous epithelium is similar to that of the esophagus in humans it is expected that the exposure to BHA would be much less compared with the rodent forestomach due to the short time in which contents reside in the esophagus. Moreover the human average intake of BHA is <0,1 mg/kg/day which is well below the lowest effect level of 230 mg/kg/day for hyperplasia in rodents. Also at concentrations as low as 125 ppm which are closer to the food additive level, BHA exhibits anticarcinogenic properties. Therefore we conclude that there aren't sufficient evidence to recommend the discontinuation of the use of BHA in foods and that it is important that more human epidemiological studies are conducted in the near future because today's data show that BHA exhibits a species-specific tumorigenic response that is irrelevant to humans and that its carcinogenic effects have a dose-response relationship.

ΒΗΑ: ΔΕΥΤΕΡΑ ΕΠΙΔΗ- ΠΤΥ ΣΑΡ
ΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

ΣΑΡΙΚΑ Μ.

13057

10061

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



★ 1 3 0 5 7 ★