

## CAPÍTULO 3

# EFEITO *IN VITRO* DO GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*, MART) NA PROTEÇÃO DE CÉLULAS NEURAIS SH-SY5Y EXPOSTAS AO METILMERCÚRIO

*Data de aceite: 01/02/2024*

### **Suziane da Cruz**

Biomédica, Centro Universitário  
Franciscano  
Santa Maria, RS, Brasil

### **Verônica Farina Azzolin**

Biomédica, Mestre em Farmacologia,  
Doutora em Farmacologia.  
Universidade Federal de Santa Maria-  
UFSM  
Santa Maria, RS, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/2668411219019981>

### **Fernanda Barbisan**

Bióloga, Mestre em Farmacologia,  
Doutora em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria-  
UFSM  
Santa Maria, RS, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/1428674947616182>

### **Juliane Santiago Sasso**

Biomédica, Especialista em Análises  
Clínicas e Toxicológicas  
Universidade de Passo Fundo- UPF  
Passo Fundo, RS, Brasil.  
<http://lattes.cnpq.br/9085067269653365>

### **Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

Bióloga, Mestre e Doutora em Genética e  
Biologia Molecular  
Professora Associada, Universidade  
Federal de Santa Maria- UFSM  
Santa Maria, RS, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/3426369324110716>

### **Euler Esteves Ribeiro**

Médico, Doutor em Gerontologia  
Biomédica  
Diretor da Universidade Aberta da  
Terceira Idade, Universidade do Estado do  
Amazonas-FUNATI  
Manaus, AM, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/6760036358198639>

### **Fernanda dos Santos Trombini**

Enfermeira, Mestre em Enfermagem.  
Universidade Federal de Santa Maria-  
UFSM  
Santa Maria, RS, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/9145097192524730>

### **Marcos Francisco Simon**

Psicólogo, Faculdade de Ciências da  
Saúde- SOBRESP  
Santa Maria, RS, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/1249757172595752>

### **Cindyh Suely da Silva Medeiros**

Fisioterapeuta, Universidade Federal do  
Pampa-UNIPAMPA  
Santa Maria, RS, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/9669892888495289>

**RESUMO:** A exposição ao metilmercúrio (MeHg) tem sido associada a neurotoxicidade em diversas populações humanas, inclusive pela sua genotoxicidade (Danos ao DNA). Entretanto, populações amazônicas ribeirinhas que têm sido cronicamente expostas a níveis elevados de MeHg causados pelo garimpo do ouro e prata e pelo desmatamento não apresentam efeitos neurotóxicos, evidentes em outras populações expostas a concentrações elevadas de MeHg, como a população de Minamata (Japão) onde uma empresa de produção de PVC descartou na Baía de Minamata resíduos contendo mercúrio contaminando peixes e frutos do mar, principal fonte de alimento para a população local. A contaminação por mercúrio causou doenças neurológicas graves em muitos habitantes de Minamata. Uma hipótese para explicar estes resultados seria a dieta rica em antioxidantes encontrados nos frutos da Amazônia. Estudos prévios sugeriram que o guaraná tem efeito antioxidante, antiinflamatório e genoprotetor a exposição de diversos agentes poluentes ambientais. Assim, diante deste contexto, nosso objetivo foi avaliar se o guaraná teria efeito genoprotetor em células neurais SH-SY5Y expostas ao MeHg. Para conduzir este estudo as células foram obtidas comercialmente, cultivadas em condições estéreis e padronizadas. Primeiramente expostas a concentrações de 0,1-0,3-0,5-0,7- 1  $\mu\text{M}$  de MeHg e posteriormente a concentrações de 1- 5- 10-30-70-100  $\mu\text{g/mL}$  do extrato hidroalcoólico de guaraná. A taxa de proliferação celular em culturas de 72h foi avaliada, bem como o efeito no DNA foi analisado através de dois testes: o ensaio DNA Cometa e a quantificação dos níveis de 8-deoxiguanosina por teste imunoenzimático ELISA. Os resultados mostraram que o guaraná foi capaz de reverter parcialmente o dano de DNA causado pela exposição a 5 $\mu\text{M}$  de MeHg nos dois ensaios de genotoxicidade utilizados. O conjunto destes resultados sugere que o guaraná poderia contribuir para diminuir o efeito neurotóxico causado pela exposição crônica ao MeHg das populações ribeirinhas do Amazonas.

**PALAVRAS-CHAVE:** neurotoxicidade, mercúrio, genotoxicidade, frutos amazônicos

### THE *IN VITRO* GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*, MART) EFFECTS ON PROTECTION OF NEURAL SH-SY5Y METHYLMERCURY EXPOSED

**ABSTRACT:** Exposure to methylmercury (MeHg) has been associated with neurotoxicity in various human populations, including genotoxicity (DNA damage). However, Amazonian riverside populations that have been chronically exposed to high levels of MeHg caused by gold and silver mining and deforestation do not show neurotoxic effects, which are evident in other populations exposed to high concentrations of MeHg, such as the population of Minamata (Japan) where a PVC production company dumped mercury-containing waste into Minamata Bay, contaminating fish and seafood, the main source of food for the local population. The mercury contamination caused serious neurological illnesses in many of Minamata's inhabitants. One hypothesis to explain these results would be the diet rich in antioxidants found in Amazonian fruits. Previous studies have suggested that guarana has antioxidant, anti-inflammatory and genoprotective effects against exposure to various environmental pollutants. In this context, our aim was to assess whether guarana has a genoprotective effect on SH-SY5Y neural cells exposed to MeHg. To conduct this study, the cells were obtained commercially and cultured under sterile and standardized conditions. They were first exposed to concentrations of 0.1-0.3-0.5-0.7- 1  $\mu\text{M}$  of MeHg and then to concentrations of 1- 5- 10-30-70-100  $\mu\text{g/mL}$  of the hydroalcoholic extract of guarana. The rate of cell proliferation in

72-hour cultures was assessed, and the effect on DNA was analyzed using two tests: the DNA Comet assay and the quantification of 8-deoxyguanosine levels by ELISA. The results showed that guarana was able to partially reverse the DNA damage caused by exposure to 5 $\mu$ M of MeHg in the two genotoxicity tests used. These results together suggest that guarana could contribute to reducing the neurotoxic effect caused by chronic exposure to MeHg in the riverside populations of Amazonas.

**KEYWORDS:** neurotoxicity, genotoxicity, Mercury, Amazonian fruits

## INTRODUÇÃO

Muitos elementos químicos como o mercúrio (Hg) são encontrados naturalmente na Terra e também produzido industrialmente, presente em diversas matérias-primas, como carvão, petróleo, madeira e jazidas de minerais diversos. O mercúrio é um agente químico neurotóxico, que rompe o equilíbrio orgânico, atravessando as barreiras hematoencefálica e hemotoplacentária humanas, provocando severas alterações na homeostase do organismo. (BRITO et al., 2021)

É utilizado no processo de extração de ouro de outros minérios, em face de suas propriedades de se agregar ao ouro, com posterior separação do mercúrio e do ouro através de seu aquecimento, ocorrendo a vaporização do mercúrio ao ar livre, caracterizando uma agressão ao meio ambiente e à saúde do garimpeiro (RAMOS et al., 2020). A intoxicação por Hg ocorre quando os níveis estão acima de 10 $\mu$ g/L no sangue segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). A contaminação pode ocorrer via ar, dieta (principalmente peixes que vivem em rios com altos níveis de mercúrio) Quando isso ocorre, são observados sintomas neurológicos, distúrbios neuropsíquicos, vômitos e diarreias, ansiedade, perda da capacidade de concentração, depressão, irritabilidade, anorexia, perda de peso, insônia, aparecimento de tremores faciais que se estendem para os membros superiores e inferiores e transtornos renais (RAMOS et al., 2020; FERREIRA et al., 2023).

Além destes efeitos negativos, o Hg potencialmente causa danos graves e permanentes, incluindo no sistema nervoso central (SNC), levando a disfunções cognitivas e motoras, perda de visão, entre outras debilidades neurais. Estudos apontam que a exposição ao mercúrio em sua forma orgânica pode trazer complicações materno-fetais, pois o composto químico em questão é considerado teratogênico e sua presença pôde ser detectada no leite materno e placenta de gestantes contaminadas (FERREIRA et al., 2023).

Entretanto, apesar dos altos níveis de Hg, crianças e adultos que vivem na Amazônia e que são expostas a este metal não apresentam sintomas de intoxicação tão acentuados. Em algumas comunidades na região amazônica, a ingestão de mercúrio excede os valores recomendados de 5  $\mu$ g Hg/kg, como no caso de Rio Branco (AC), que a ingestão ultrapassou de 6,9 a 31,5 vezes a dose de referência (BASTA et al., 2023; NEVES 2019). Esta questão intriga os pesquisadores. Uma possível explicação é de que na Amazônia o padrão dietético que é rico em frutos, peixes e subprodutos da farinha de mandioca poderia

auxiliar na proteção contra os efeitos neurotóxicos e neurodegenerativos do Hg (GAMA et al., 2022). Em termos dietéticos, a alimentação da comunidade ribeirinha é rica em frutos que possuem moléculas bioativas com funções importantes na neuroproteção, incluindo ação antioxidante e anti-inflamatória (GAMA et al., 2022; INFANTE et al., 2016)

Estudos têm sido conduzidos em idosos ribeirinhos que vivem no Município de Maués no Estado do Amazonas que faz divisa com o Estado do Pará. Tais estudos sugeriram que estes idosos possuem bons indicadores de saúde apresentando baixa prevalência de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes mellitus do tipo 2 e doenças neurodegenerativas quando comparados a idosos que vivem na capital Manaus. Ao contrário de Maués, estes idosos têm acesso aos serviços de saúde e outras comodidades e tecnologias (MAIA-RIBEIRO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2008; SILVA et al., 2014; ANTONINI et al., 2016). Estes resultados foram considerados surpreendentes, uma vez que uma grande parte dos idosos, principalmente do gênero masculino, relatou ter tido contato com o Hg, via trabalho direto na mineração nas décadas de 70 e 80 ou por estarem vivendo em áreas do qual existe algum nível de contaminação dos rios por este metal.

Dentro da dieta ribeirinha de Maués, o consumo habitual (mais do que quatro vezes na semana) da semente moída e torrada do guaraná (*Paullinia cupana*, Mart.) é muito prevalente na população, como é mostrado na Figura 1. Um estudo conduzido por Krewer et al (2011) sugeriu que o consumo cotidiano do guaraná estava associado com menor prevalência de doenças cardiovasculares, obesidade e hipertensão nos idosos. O guaraná é classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo *Dietary Supplement Health and Education Act* (DSHEA) como um suplemento alimentar (ANVISA, 2017). Entretanto, o Guaraná, *Paullinia cupana* Kunth. (Sapindaceae), tem sido utilizada há séculos pelas tribos indígenas amazônicas como estimulante em festas e caça, afrodisíaco e para uso medicinal. É consumido na forma de pó obtido a partir de sementes torradas, ou pode ser ingerido simplesmente dissolvendo o pó em água, sozinho ou em combinação com outro fitoterápico. O guaraná é conhecido por sua elevada quantidade de cafeína (3,5%–6%). Mas também contém teobromina e teofilina, e polifenóis principalmente catequina, epicatequina, procianidina A1, procianidina B2, com um perfil de flavan-3-óis muito semelhante ao do cacau (MENDES et al., 2019; PAGLIARUSSI et al., 2002; MACHADO et al., 2021).

Evidências mostram que o guaraná apresenta fortes propriedades antioxidantes e eliminadoras de radicais (MALDANER et al., 2020; ROGGIA et al., 2020; SANTANA; MACEDO, 2018; YONEKURA et al., 2016 ), propriedades protetoras celulares e antiinflamatórias (MACHADO et al., 2021), efeito neuroprotetor (VELOSO et al., 2018) e propriedades antienvhecimento (ARANTES et al., 2018). Estudo epidemiológico relatou consumo habitual de guaraná por idosos ribeirinhos com menor prevalência de hipertensão, obesidade e síndrome metabólica (KREWER et al., 2011).

Com base neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do guaraná (*Paullinia cupana*) em linhagem de células neurais SH-SY5Y expostas ao metilmercúrio (MeHg).

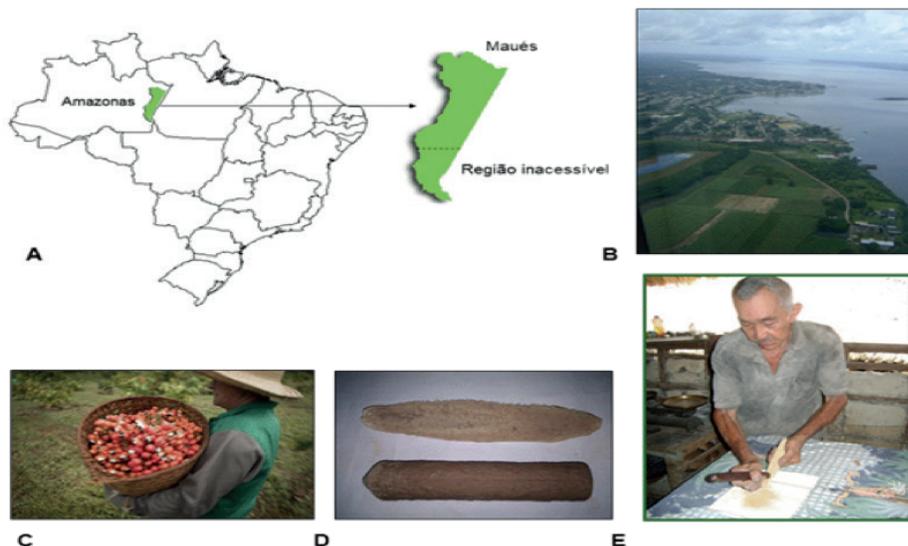


Figura 1 Aspectos relacionados a região produtora de guaraná. (A) Mapa indicando a localização geográfica de Maués; (B) Maués é um município com cerca de 50 mil habitantes dos quais 50% vivem na região urbana apresentada na foto. Os demais vivem em 175 pequenas comunidades ribeirinhas distribuídas nos 40 mil km<sup>2</sup> do município; (C) Colheita do guaraná; (D) Tradicionalmente a semente do guaraná é lavada, tostada e moída e é feito um bastão com este pó. (E) Posteriormente este bastão de guaraná é ralado na língua do pirarucu (que é óssea). O pó obtido é colocado em água e tomado com mel ou açúcar, pela manhã, em jejum (SCHIMPL et al., 2013). Fonte das Figuras: A, C e D – Google Imagens, B e E – banco de fotos do Projeto Idoso da Floresta que inclui este estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido um estudo de caráter experimental *in vitro* a partir da utilização da linhagem celular SH-SY5Y obtida a partir da *The American Type Culture Collection* (ATCC). O efeito do guaraná nestas células expostas ao MeHg foi analisado através do estudo da viabilidade e também da ocorrência de dano do DNA avaliada pelo ensaio DNA Cometa e pela determinação dos níveis do marcador 8-deoxiguanosina.

O pó de guaraná torrado e moído obtido através da EMBRAPA OCIDENTAL foi utilizado para a produção de um extrato hidroalcoólico, posteriormente liofilizado e quimicamente caracterizado via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ensaios espectrofotométricos conforme descrito em detalhes no estudo de Bittencourt et al (2013). A partir de 300 g de pó de guaraná foi obtido 92 mg de guaraná contendo 12,240 mg/g de cafeína, 6,733 mg/g de teobromina e 4,336 mg/g de catequinas totais. A concentração de taninos condensados foi de 16 mg/g.

No estudo, as células neuronais-like SH-SY5Y foram cultivadas em meio de cultivo celular DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina (100 U/mL)/ estreptomicina (100 mg/mL). As células foram mantidas em condições controladas em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de saturação e a temperatura de 37°C. Inicialmente nas células foram submetidas a diferentes concentrações. As células foram expostas ao Hg durante 72 h antes de serem analisadas quanto aos efeitos genotóxicos. Por outro lado, as concentrações de guaraná utilizadas no estudo foram similares às descritas em Bittencourt et al (2013).

O efeito genotóxico da exposição das células ao MeHg foi avaliado em culturas de 72 horas via análise da atividade mitocondrial que indica viabilidade e proliferação celular. Esta análise foi feita utilizando o ensaio do MTT. A exposição das células ao reagente 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetraoliumbromide (MTT) na concentração de 5 mg/ml diluído em tampão fosfato Ph 7,4, faz com que entre dentro das mitocôndrias da célula e forma compostos denominados cristais de formazan. Estes cristais têm uma cor violeta. Quanto mais forte for a cor violeta, maior é a atividade mitocondrial, o que indica maior viabilidade ou maior taxa de proliferação celular.

O dano genotóxico causado pela exposição ao MeHg e o potencial efeito protetor do guaraná foi avaliado através de duas metodologias. A primeira é o ensaio de DNA Cometa que foi primeiramente descrito por Singh et al (1988) com modificações metodológicas posteriormente feitas por Nadin et al (2001). Para fazer este teste, 20µL das células dos tratamentos foram usadas para confeccionar 2 lâminas para cada tratamento. Estas células foram colocadas em lâminas histológicas previamente gelatinizadas com Agar-agar e logo após foram tratadas com um tampão para causar lise celular liberando apenas os núcleos. Após este processo, as lâminas foram submetidas a eletroforese e, posteriormente, coradas com nitrato de prata. Após este procedimento, a análise dos núcleos foi feita em microscópio óptico em aumento de 400X, por dois analistas diferentes, onde cada leitor analisou 50 núcleos em cada lâmina, perfazendo um total de 100 núcleos. Tal leitura será classificada conforme o arraste do material genético ("cauda" do cometa), onde cada célula receberá a pontuação correspondente entre 0 (sem migração) a 4 (migração máxima) ou apoptose celular (morte celular programada). Na leitura o número de núcleos em cada nível de dano de DNA foi contabilizado. Em uma lâmina sem nenhum tipo de dano o valor da pontuação seria 0 e em uma célula com todos os núcleos em dano 3 a pontuação máxima seria 400. Para calcular o índice de dano, o número de células em cada nível foi multiplicado pelo valor e depois dividido por 400. Feito este cálculo, os resultados ainda foram apresentados como percentagem em relação ao grupo controle para facilitar a interpretação dos resultados.

Para complementar a avaliação da ação do MeHg e guaraná no DNA das células neurais foi feita uma análise adicional no qual foi medido os níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8 deoxiguanosina). Este é um produto da oxidação do DNA danificado

formado por radical hidroxila, oxigênio e ação fotodinâmica direta. A 8-deoxiguanosina pode ser detectada nos tecidos, células, meio de cultura, soro, urina e outros biomateriais. Uma das formas de detecção e quantificação da 8-deoxiguanosina é através do teste de imunoenensaio ELISA. Neste teste se utiliza anticorpo monoclonal que é altamente específico para danos no DNA utilizando metodologia similar ao descrito por Kasai et al (1986). Por ser um teste de alto custo, a análise foi feita utilizando 20 µL de meio de cultura das células tratadas ou não com guaraná e MeHg em triplicata. A análise utilizou kit de ELISA e foi conduzido no Laboratório de Análises Clínicas Labmed Ltda (Santa Maria). Este ensaio serviu para validar os resultados encontrados no Ensaio DNA Cometa.

Os resultados obtidos foram inicialmente tabelados em programa Microsoft Excel 2011 e submetidos à análise estatística através de teste de análise de variância (Anova) de uma via, seguido de test post hoc de Tukey, utilizando o programa de produção de gráficos e estatístico Graph Pad Prim 5.0. Os tratamentos foram expressos como percentagem do controle (%) e considerados resultados estatisticamente significativos quando p mostrou ser igual ou menor a 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi feita análise do efeito nas concentrações 0,1-0,3-0,5-0,7-1 µM de MeHg na atividade mitocondrial em culturas de 72 h das células neurais SH-SY5Y. Como pode ser observado na Figura 2A, apenas em concentrações  $\geq 3 \mu\text{M}$  a exposição ao MeHg causou diminuição significativa na atividade mitocondrial que avalia a viabilidade e proliferação celular. Como idosos ribeirinhos estariam expostos durante anos ao MeHg, e provavelmente apresentariam efeito de bioacumulação deste metal nos seus tecidos, o potencial efeito neuroprotetor do guaraná foi avaliado a partir da concentração de (6 µM).

A seguir, o efeito do guaraná em diversas concentrações sobre a atividade mitocondrial de culturas de células neurais de 72 h foi avaliado. Os resultados apresentados na Figura 2 mostraram que, todas as concentrações de guaraná aumentaram significativamente a atividade mitocondrial das células neurais indicando ação na viabilidade e indução de proliferação celular. Indução de proliferação celular pelo guaraná já foi previamente descrita em estudos feitos com a linhagem de fibroblastos dérmicos (HFF-1) (MALDANER et al., 2020) e em células de BV-2 da microglia (TEIXEIRA et al., 2021).

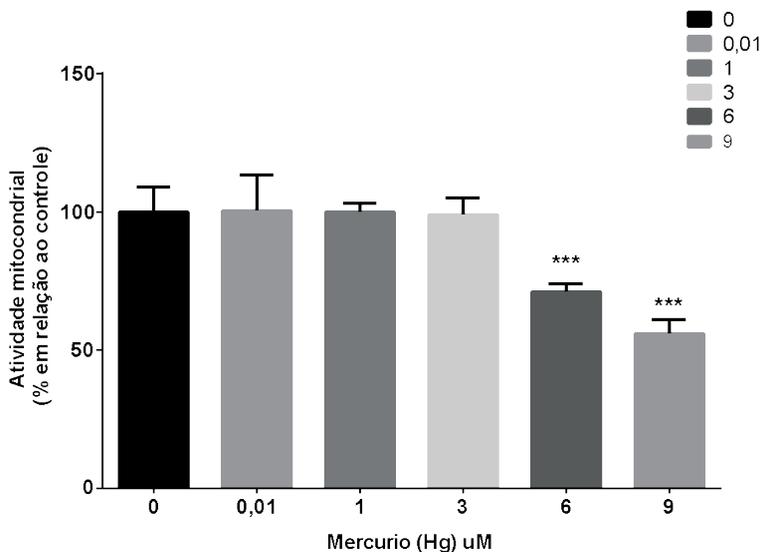


Figura 2 Atividade mitocondrial que indica viabilidade e proliferação celular medida pelo ensaio espectrofotométrico do MTT em células de neuroblastoma SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de metil-mercúrio (MeHg) durante 72 h. Os tratamentos foram estatisticamente comparados por Análise de variância de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey. \*\*\*  $p < 0.001$ .

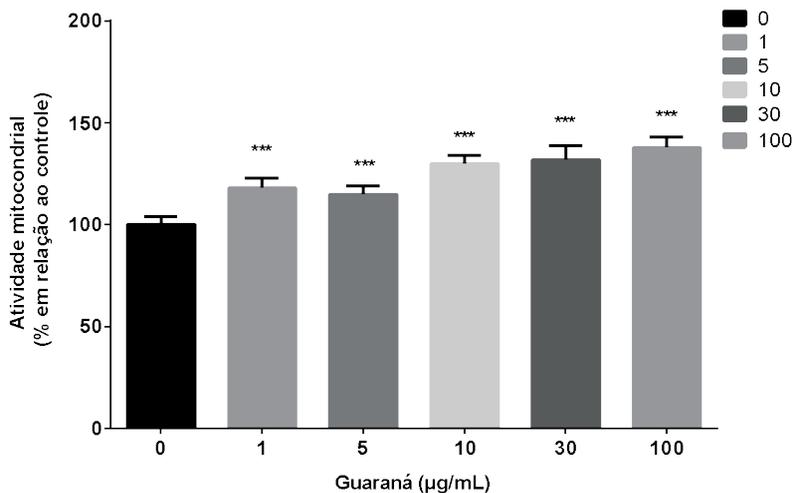


Figura 3 Atividade mitocondrial que indica efeito na viabilidade e proliferação celular medida pelo ensaio espectrofotométrico do MTT em células de neuroblastoma SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de guaraná em culturas de 72 h. Os tratamentos foram estatisticamente comparados por Análise de variância de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey. \*\*\*  $p < 0.001$ .

A partir destes resultados foi realizada análise do efeito genoprotetor do guaraná em células neurais expostas ao MeHg ( $5\mu\text{M}$ ). Esta análise foi conduzida apenas na concentração de  $100\mu\text{g/mL}$  de guaraná, uma vez que a citotoxicidade causada pela exposição ao MeHg era bem elevada. A Figura 4 apresenta microfotografias representativas de células tratadas com e sem guaraná e MeHg. Análise do dano de DNA por Ensaio Cometa em culturas de células de 72 h mostrou alta genotoxicidade causada pela exposição ao MeHg quando comparada com as células não tratadas e tratadas com guaraná. Esta genotoxicidade foi observada pela: (1) baixa concentração de núcleos, indicando diminuição na taxa de proliferação celular após 72 h de exposição; (2) alta concentração de corpos apoptóticos, indicando dano de DNA seguido de indução de eventos apoptóticos; (3) índice de dano de DNA elevado em comparação com o grupo controle.

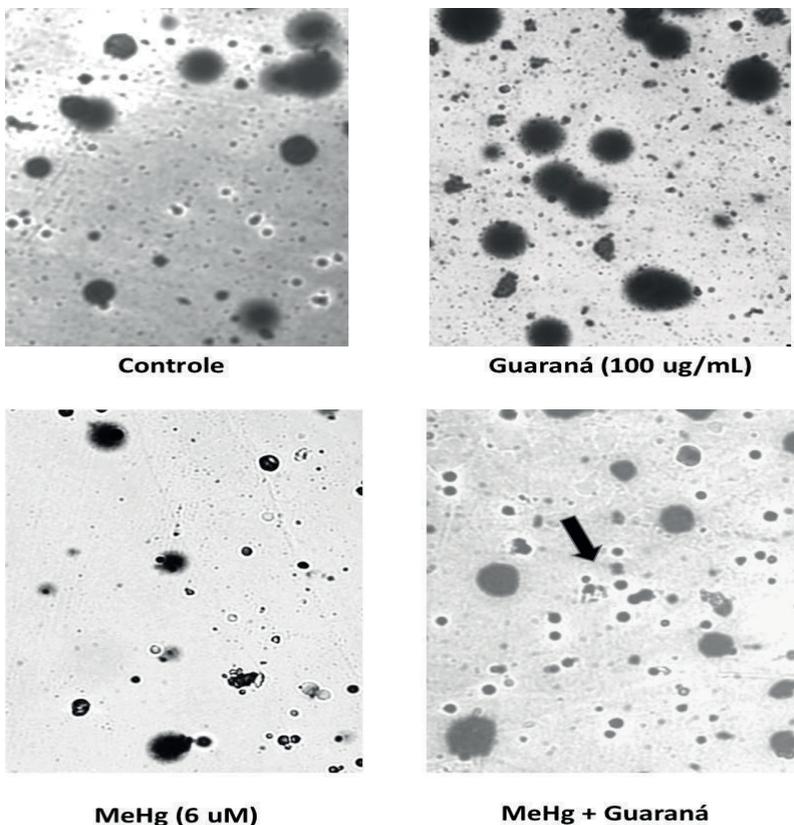


Figura 4 Fotomicrografia (x 400) de células neurais SH-SY5Y expostas ao metilmercúrio (MeHg,  $6\mu\text{M}$ ) com e sem suplementação por extrato hidroalcoólico de guaraná ( $100\mu\text{g/mL}$ ). A flecha indica grande quantidade de corpos apoptóticos observados principalmente em células tratadas apenas com MeHg ou MeHg e guaraná.

Conforme pode ser observado na Figura 5A o índice de dano de DNA calculado a partir do ensaio DNA Cometa foi fortemente alto em células neurais tratadas com MeHg. Entretanto, este dano diminuiu parcialmente quando as células foram concomitantemente tratadas com MeHg e Guaraná em comparação com as células controles e as células somente cultivadas em meio suplementado com guaraná. Uma análise adicional em que foi quantificado os níveis de 8-deoxiguanosina nas culturas de SH-SY5Y mostrou resultados similares, como indica a Figura 5B. Neste caso, o guaraná também conseguiu reverter parcialmente os níveis de dano de DNA determinados pela quantificação da 8-deoxiguanosina.

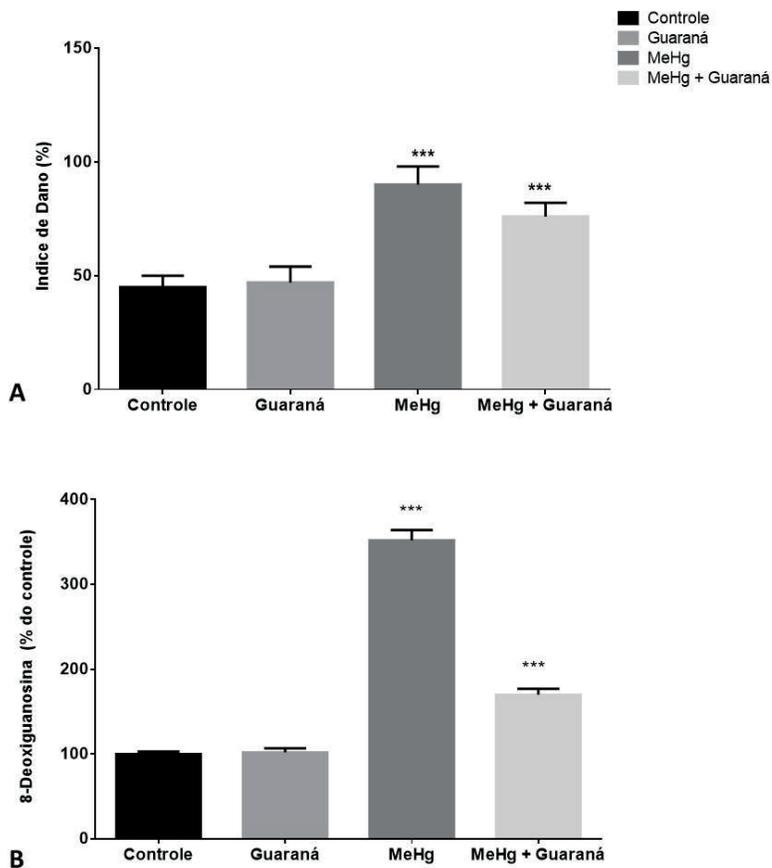


Figura 5 Efeito do guaraná na genotoxicidade causada pela exposição ao metilmercúrio (MeHg, 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em células neurais SH-SY5Y cultivadas durante 72 h. (A) índice de dano calculado a partir do ensaio do DNA Cometa com resultados apresentados como % do controle; (B) níveis de dano do DNA estimado pela concentração de 8-deoxiguanosina com resultados apresentados como % do controle. Os tratamentos foram estatisticamente comparados por Análise de variância de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Estudos prévios conduzidos por Fukumasu et al (2006) em modelos experimentais de roedores descreveram que o guaraná teria capacidade de apresentar efeito protetor contra dano de DNA provocado por outros agentes como o composto N-nitrosodietilamina, injetado nos camundongos, mostrando que o guaraná foi capaz de proteger os camundongos dos efeitos da nitrosodietilamina que causaram danos de DNA nas células do fígado destes animais. Este trabalho foi feito através da análise do DNA Cometa. Além deste, um extrato de guaraná mostrou genoproteção de células fibroblásticas NIH-3T3 expostas ao nitroprussiato de sódio, que gera citotoxicidade e dano ao DNA quando em níveis elevados (BITTENCOURT et al., 2013). Outro agente ambiental que causa genotoxicidade é o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) que no início do século XX era muito utilizado como solvente de limpeza a seco, como composto usado em refrigeradores, e até mesmo como pesticida. Entretanto, o CCl<sub>4</sub> causa diversos problemas de toxicidade no ser humano, podendo afetar o SNC causando neurodegeneração e também a função hepática e renal. Um estudo feito em ratos expostos ao CCl<sub>4</sub> e ao guaraná mostrou que o guaraná apresentou efeito hepatoprotetor e também diminuiu a fragmentação do DNA avaliada pelo ensaio DNA Cometa (KOBBER et al., 2016).

No presente trabalho foi observado que o guaraná foi capaz de diminuir parcialmente a genotoxicidade causada por uma dose de MeHg relativamente elevada para as células (6µM). O efeito genoprotetor do guaraná poderia estar associado à sua concentração de moléculas bioativas como os polifenóis. Estudos sobre o efeito genoprotetor de moléculas encontradas em outros frutos amazônicos em ratos e células expostos ao MeHg têm sido conduzidos. Este é o caso da investigação feita por Brasil et al (2016) que tratou ratos da raça Wistar com MeHg concomitante a suplementação com polpa do fruto açaí, que também é um fruto amazônico. Os resultados indicaram que o açaí foi capaz de diminuir os danos de DNA provocados pelo MeHg (BRASIL et al., 2016). Outro estudo feito por Kunjirama et al (2017) mostrou que ramos vazios de frutos de dendê, também apresentam efeito genoprotetor contra a exposição ao MeHg. Uma grande quantidade de frutos também é rica na molécula quercetina que tem ação antioxidante e antitumoral. Na presença de quercetina a exposição de ratos ao MeHg diminui os efeitos genotóxicos também avaliados pelo ensaio cometa (BARCELLOS et al., 2011). O mesmo resultado foi observado quando os ratos foram tratados com selênio, do qual alguns frutos amazônicos como a castanha-do-Brasil apresentam em grandes quantidades (LIU et al., 2019). A manga, que também é um fruto abundante na Amazônia, possui um composto bioativo chamado mangiferina. Uma investigação conduzida por Das et al. (2017) mostrou que a molécula era genoprotetora na linhagem de células HepG2 (hepatocarcinoma humano) expostas ao MeHg. A niacina também chamada de vitamina B3 é encontrada em alguns frutos, incluindo o fruto amazônico denominado cubiu (*Solanum sessiflorum*). Este fruto é considerado a “maçã da Amazônia”. Ratos intoxicados com MeHg apresentaram redução na genotoxicidade avaliada pelo ensaio DNA cometa quando foram concomitantemente tratados com niacina (DE PAULA et al., 2016).

Sabe-se que o MeHg possui forte ação neurodegenerativa e neuroteratogênica. Por este motivo, estudos sobre o efeito de frutos, como o guaraná na proteção de células neurais podem ser considerados relevantes. Assim, apesar das limitações relacionadas a estudos feitos somente em cultura de células, os resultados descritos aqui sugeriram que o guaraná poderia contribuir para diminuir os efeitos tóxicos que se espera encontrar em populações expostas ao MeHg como ocorre nas populações ribeirinhas do Amazonas.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Suplementos alimentares: documento de base para discussão regulatória**. Ministério da Saúde: 2017.

ANTONINI, T. C. **Impact of functional determinants on 5.5-year mortality in Amazon riparian elderly**. Rev Panam Salud Publica, v. 40, n. 1, 2016.

ARANTES, L. P. *et al.* **Mecanismos envolvidos nos efeitos antienvhecimento do guaraná (Paullinia cupana) em Caenorhabditis elegans**. Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica, v. 51, e7552, 2018.

BARCELOS, G. R. *et al.* **Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats**. Arch Toxicol, v. 85, n. 9, p. 1151-7, 2011.

BASTA, P. C. *et al.* **Análise regional dos níveis de mercúrio em peixes consumidos pela população da Amazônia Brasileira**. Nota Técnica, 2023.

BITTENCOURT, L. S. *et al.* **The protective effects of guaraná extract (Paullinia cupana) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside**. Food and Chemical Toxicology, v. 53, p. 119-125, 2013.

BRASIL, A. *et al.* **Diet enriched with the Amazon fruit açai (Euterpe oleracea) prevents electrophysiological deficits and oxidative stress induced by methyl-mercury in the rat retina**. Nutr Neurosci, v. 20, n. 5, p. 265-272, 2017.

BRITO, W. J. P. **Mercúrio no meio ambiente: uma revisão sobre seus efeitos toxicológicos e as principais fontes de emissão- São Paulo- Brasil**. Revista DAE, v. 69, n. 230, p. 127-139, 2021.

DAS, S. *et al.* **Harmonization of mangiferin on methylmercury engendered mitochondrial dysfunction**. Environ Toxicol, v. 32, n. 2, p. 630-644, 2017.

DE PAULA, E. S. *et al.* **Protective effects of niacin against methylmercury-induced genotoxicity and alterations in antioxidant status in rats**. Journal of toxicology and environmental health. 2016.

FERREIRA M. M. *et al.* **Fundamentos da assistência de enfermagem na atenção primária às gestantes ribeirinhas afetadas pelo despejo de mercúrio em corpos d'água**. Global Clinical Research Journal, [S. l.], v. 2, n. 2, p. e31, 2022.

FUKUMASU, H. *et al.* **Protective effects of guarana (Paullinia cupana Mart. Var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver**. Food and Chemical Toxicology, v. 44, n. 6, p. 862-867, 2006.

GAMA, A. S. M. *et al.* **Padrões de consumo alimentar nas comunidades ribeirinhas da região do médio rio Solimões-Amazonas-Brasil.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 27, p. 2609-2620, 2022.

INFANTE, J. *et al.* **Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits.** *PLoS ONE*, v. 11, n. 4, e0152974, 2016.

KASAI, H. *et al.* **Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agentes producing oxygen radicals and evidence for its repair.** *Carcinogenesis*, v. 7, n. 11, p. 1849-1851, 1986.

KOBER, H. *et al.* **Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. Var. *sorbilis*) on CCl4-induced liver damage in rats.** *Drug and Chemical Toxicology*, v. 39, n. 1, 2016.

KREWER, C. C. *et al.* **Efeito in vivo e in vitro do guaraná nos distúrbios metabólicos e nos biomarcadores inflamatórios associados à lipotoxicidade.** 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

KREWER, C. C. *et al.* **Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population.** *Phytother Res*, v. 25, n. 9, p. 1367-74, 2011.

KUNJIRAMA, M. *et al.* **Adsorption affinity and electivity of 3-ureidopropyltriethoxysilane grafted oil palm empty fruit bunches towards mercury ions.** *Environ Sci Pollut Res Int.*, v. 24, n.17, p. 15167-15181, 2017.

LIU, Y. *et al.* **Selenium modulated gut flora and promoted decomposition of methylmercury in methylmercury-poisoned rats.** *Ecotoxicol Environ Saf*, v.185, 2019.

MACHADO, K. N. *et al.* **Inibição do TNF- $\alpha$ , efeitos antioxidantes e análise química de extratos e frações do pó da semente de guaraná brasileiro.** *Química Alimentar*, v. 129563, 2021.

MAIA-RIBEIRO, E. A. *et al.* **Functional, balance and health determinants of falls in a free living community Amazon riparian elderly.** *Arch Gerontol Geriatr*, v. 56, n. 2, p. 350-7, 2012.

MALDANER, D. R. *et al.* **A interação entre a terapia a laser de baixa intensidade e o extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) induz efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e anti apoptóticos e promove a proliferação de fibroblastos dérmicos.** *Jornal de Dermatologia Cosmética*, v. 19, n. 3, p. 629–637, 2020.

MENDES, T. M. N. *et al.* **Catequinas e procianidinas do guaraná (*Paullinia cupana*): bioacessibilidade gastrointestinal/colônica, permeabilidade das células Caco-2 e impacto dos macronutrientes.** *Jornal de Alimentos Funcionais*, v. 55, p. 352–361, 2019.

NADIN, S. B. *et al.* **A silver staining method for single-cell gel assay.** *J Histochem Cytochem*, v. 49, n. 9, p. 1183-6, 2001.

NEVES, J. **Estudo aponta níveis elevados de mercúrio em crianças e mulheres indígenas.** Fundação Oswaldo Cruz: uma instituição a serviço da vida (FIOCRUZ). Rio de Janeiro, 2019.

PAGLIARUSSI, R. S. *et al.* **Método quantitativo para análise de alcalóides xantina em *Paullinia cupana* (guaraná) por cromatografia gasosa em coluna capilar.** *Journal of Separation Science*, v. 25, n. 5-6, p. 371-374, 2002.

RAMOS, A. R. A. *et al.* **Mercury-Based Mining in Yanomami Indigenous Lands and Accountabilities.** Ambiente & Sociedade, v. 23, p. e03262, 2020.

RIBEIRO, E. E. *et al.* "Elderly from the Forest" Project: Health Indicators of Elderly's Family Health Strategy in Manaus-AM's Health Districts, Brazil. Rev. bras. Geriatra. Gerontol., v. 11, n. 3, 2008.

ROGGIA, I., *et al.* **Guaraná: método RP-HPLC indicador de estabilidade e perfil de segurança usando células microgliais.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 94, e103629, 2020

SANTANA, A. L.; MACEDO, G. A. **Aspectos sanitários e tecnológicos das metilxantinas e polifenóis do guaraná: uma revisão.** Jornal de Alimentos Funcionais, v. 47, p. 457–468, 2018.

SILVA, T. O. *et al.* **Association between advanced oxidation protein products and 5-year mortality risk among amazona riparian elderly population.** Free Radic Res, v. 49, n. 2, 2015.

SINGH, N. P. *et al.* **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Exp Cells Res, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.

TEIXEIRA, C. F. *et al.* **Safety indicators of a novel multi supplement based of guaraná, selenium, and L-carnitine: Evidence from human and red earthworm immune cells.** Food Chem Toxicol, v. 150, 2021.

VELOSO, C. F. *et al.* **Efeitos neuroprotetores do guaraná (Paullinia cupana Mart.) contra a exposição in vitro à vincristina.** O Jornal de Prevenção da Doença de Alzheimer, v. 5, n. 1, p. 65–70, 2018.

YONEKURA, L. *et al.* **Biodisponibilidade de catequinas do guaraná (Paullinia cupana) e seu efeito sobre enzimas antioxidantes e outros marcadores de estresse oxidativo em seres humanos saudáveis.** Comida & função, v. 7, n. 7, pág. 2970-2978, 2016.