UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação das propriedades antigenotóxicas e antioxidantes do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbios do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio, *in vitro* e *in vivo*

Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos

**Ribeirão Preto
2010**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação das propriedades antigenotóxicas e antioxidantes do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbios do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio, *in vitro* e *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado(a): Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

**Ribeirão Preto
2010**

Barcelos, G. R. M.	Avaliação das propriedades antigenotóxicas e antioxidantes do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbios do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>		Doutorado FCFRPUSP 2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Barcelos, Gustavo Rafael Mazzaron

Avaliação das propriedades antígeno-tóxicas e antioxidantes do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbios do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio, *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2010.

118 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. Mercúrio. 2. Quercetina. 3. Bixina. 4. Norbixina. 5. Genotoxicidade. 6. Antioxidantes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos

Avaliação das propriedades antígeno-tóxicas e antioxidantes do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbios do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio, *in vitro* e *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa
Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha mãe... por tudo que hoje sou!

Não teria sido possível a realização deste trabalho somente por mim, portanto, agradeço

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, ao Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia por oferecer toda a infra-estrutura necessária à realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de doutorado.

Ao meu orientador Prof. Fernando Barbosa Júnior, pelo exemplo, dedicação e paciência ao longo desses quatro anos de pós-graduação.

Ao Prof. Siegfried Knasmüller, da Faculdade de Medicina de Viena, Áustria, pela orientação e apoio no período de meu doutorado sanduíche e também a todos do grupo pela ajuda no dia-a-dia, nos experimentos e na redação dos artigos científicos.

À Prof. Lusânia M. G. Antunes, pelo apoio e espaço cedido em seu laboratório para a realização de vários dos experimentos deste trabalho.

À todos os colegas do laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Bruno, Denise, Jairo, Juliana Valentini, Juliana Nunes, Kátia, Samuel e Vanessa pelos momentos de descontração, amizade, apoio e ajuda ao longo de todo este trabalho. Em especial, gostaria de agradecer à Denise pela ajuda nos tratamentos dos animais, condução dos experimentos e análise dos resultados in vivo e à Vanessa, pela ajuda na determinação das concentrações de mercúrio nos tecidos dos animais.

À Juliana Mara, do laboratório de Nutrigenômica da FCFRP e ao José Pedro do laboratório de Lesão de Biomoléculas do IQ-USP, pela amizade e pela grande ajuda nos experimentos e análise dos resultados. Agradeço também ao Alexandre do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP pela ajuda no processamento das amostras de fígado para a análise do cometa.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da FCFRP, Ana, Rosemary e Rosana, pela grande ajuda com toda a parte burocrática durante todos esses anos.

Ao Prof. Jairo Kenupp Bastos, da FCFRP, por fornecer a quercetina e à Corantec – Corantes Naturais Ltda, pelo fornecimento dos padrões bixina e norbixina utilizados neste estudo.

À todos que de alguma maneira me ajudaram para que este trabalho fosse concluído.

Muito obrigado!

“Não é o cérebro o que mais importa, mas sim o que o orienta: o caráter, o coração, a generosidade, as idéias”

Fiodor Dostoievski

RESUMO

BARCELOS, G. R. M. **Avaliação das propriedades antigenotóxicas e antioxidantes do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbios do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio, *in vitro* e *in vivo*.** 2010. Tese (Doutorado). 118f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O mercúrio (Hg) é um dos metais mais tóxicos presente no meio ambiente e o principal mecanismo relacionado à sua toxicidade é a indução do estresse oxidativo; sua forma orgânica, metilmercúrio (MeHg) é a que apresenta maior toxicidade. A exposição ao Hg ocorre principalmente através da inalação por trabalhadores ocupacionalmente expostos em diversas indústrias e/ou através do consumo de peixes e outros alimentos aquáticos contendo este metal, como por exemplo, populações amazônicas que estão expostas ao MeHg, via dieta, através do consumo de peixes contaminados. Por outro lado, é pressuposto que alimentos ricos em antioxidantes possam prevenir os efeitos adversos à saúde causados pela exposição ao Hg. O flavonóide quercetina (QC) é o principal polifenol da dieta humana, encontrado principalmente em cebola e frutas cítricas e os carotenóides bixina (BIX) e norbixina (NOR) estão presentes em grandes quantidades no urucum, o qual é amplamente utilizado como condimento no Brasil. Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos protetores do flavonóide QC e dos carotenóides BIX e NOR contra os diversos efeitos adversos causados pelo cloreto de mercúrio (HgCl_2) e MeHg, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Para tal, culturas de células de hepatoma humano (HepG2) e ratos machos Wistar foram expostos a diversas concentrações do metal, dos fitoquímicos bem como à suas associações. Determinações das concentrações de glutatona, malondialdeído, proteínas carboniladas, atividades das enzimas antioxidantes catalase e glutatona-peroxidase os quais refletem o estado redox das células e monitoramento do dano no material genético pelo uso do ensaio do cometa e determinações dos níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina foram realizados no presente estudo. Os resultados obtidos indicam que o Hg causa claros efeitos genotóxicos e leva a uma série de alterações de parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células, *in vitro* e *in vivo*. Além disso, foi evidenciado que fitoquímicos, os quais são comumente encontrados na dieta de seres humanos, denominados QC, BIX e NOR protegem contra a instabilidade genética causada pelo metal e restabelece os distúrbios do estado redox das células causados pela exposição ao Hg.

Palavras-chave: mercúrio; quercetina; bixina; norbixina; genotoxicidade; antioxidantes.

ABSTRACT

BARCELOS, G. R. M. **Evaluation of antigenotoxic and antioxidant properties of the flavonoid quercetin and of the carotenoids bixin and norbixin against DNA-damage and alterations of redox status induced by mercury chloride and methylmercury, *in vitro* and *in vivo*.** 2010. Thesis (Doctoral). 118f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Mercury (Hg) is one of the most hazardous metals in the environment and the major process responsible for its toxicity is oxidative damage; its organic form methylmercury (MeHg) presents the highest toxicity. The main way of exposition to Hg is through inhalation by workers occupationally exposed in several industries and/or through consumption of fishes and other aquatic food with the metal, as Amazonian populations which are exposed to MeHg, via diet, by consumption of contaminated fishes. On the other hand, it is conceivable that antioxidants may play a protective role in the prevention of adverse effects of Hg. The flavonoid quercetin (QC) is the most abundant polyphenol of the human diet, found mainly in onions and citric fruits and the carotenoids bixin (BIX) and norbixin (NOR) are present in high concentrations in annatto, which is widely used as flavoring in Brazil. Therefore, the present study aims to evaluate the possible protective effects of the flavonoid QC and of the carotenoids BIX and NOR against the adverse effects caused by mercury chloride (HgCl_2) and MeHg, in experimental models *in vitro* and *in vivo*. For this, human hepatoma cells (HepG2) cultures and male rats Wistar were exposed to several concentrations of the metal, of the phytochemicals as well as their associations. Determination of concentrations of glutathione, malondialdehyde, carbonyl proteins, activity of the antioxidant enzymes catalase and glutathione-peroxidase, which reflect the redox status of the cells and monitoring of DNA-damage by use of comet assay and measurements of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels were carried out in the present study. The results indicate that Hg cause clear genotoxic effects and lead to several alterations of biochemical parameters related to redox status of the cells, *in vitro* and *in vivo*. Moreover, it was observed that phytochemicals commonly found in the human diet, namely QC, BIX and NOR counteract the genetic instability induced by the metal and restore the disturbances of redox status of the cells caused by Hg exposition.

Keywords: mercury; quercetin; bixin; norbixin; genotoxicity; antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do mercúrio no meio ambiente.....	23
Figura 2. Formação de guaninas oxidadas (8-oxo-7-hidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) e seu tautômero 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) através da exposição a espécies reativas do oxigênio	26
Figura 3. Classificação dos fitoquímicos de ocorrência natural	31
Figura 4. Estrutura química do flavonóide quercetina	33
Figura 5. Sementes de <i>Bixa orellana</i> L., conhecido popularmente como urucum e estruturas químicas dos carotenóides bixina e norbixina	36
Figura 6. Classificação dos cometas de acordo com a análise visual	39
Figura 7. Exemplo de análise automatizada dos cometas	40
Figura 8. Viabilidade das células HepG2 após a exposição a diversas concentrações de cloreto de mercúrio e metilmercúrio	59
Figura 9. Impacto dos tratamentos do flavonóide quercetina sobre a viabilidade e estabilidade do material genético de células HepG2.....	63
Figura 10. Impacto dos tratamentos do carotenóide bixina sobre viabilidade e estabilidade do material genético de células HepG2.....	65
Figura 11. Impacto dos tratamentos do carotenóide norbixina sobre viabilidade e estabilidade do material genético de células HepG2.....	66
Figura 12. Viabilidade celular e indução de formação de cometas em células HepG2 após os tratamentos com o flavonóide quercetina e cloreto de mercúrio ou metilmercúrio.....	69
Figura 13. Impacto da exposição de células HepG2 ao cloreto de mercúrio, metilmercúrio e ao flavonóide quercetina sobre diversos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox celular: contrações de glutathiona, malondialdeído, proteínas carboniladas e espécies reativas do oxigênio intracelulares	71

Figura 14. Viabilidade celular e indução de formação de cometas em células HepG2 após os tratamentos com o carotenóide bixina e cloreto de mercúrio ou metilmercúrio.....	74
Figura 15. Viabilidade celular e indução de formação de cometas em células HepG2 após os tratamentos com o carotenóide norbixina e cloreto de mercúrio ou metilmercúrio.....	75
Figura 16. Impacto da exposição de células HepG2 ao cloreto de mercúrio, metilmercúrio e ao carotenóide bixina sobre diversos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox celular: contrações de glutatona, malondialdeído, proteínas carboniladas e espécies reativas do oxigênio intracelulares	77
Figura 17. Impacto da exposição de células HepG2 ao cloreto de mercúrio, metilmercúrio e ao carotenóide norbixina sobre diversos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox celular: contrações de glutatona, malondialdeído, proteínas carboniladas e espécies reativas do oxigênio intracelulares	78
Figura 18. Impacto do flavonóide quercetina, do metilmercúrio e de suas associações sobre a indução de formação de cometas em leucócitos do sangue periférico e hepatócitos de ratos Wistar	80
Figura 19. Impacto do carotenóide bixina, do metilmercúrio e de suas associações sobre a indução de formação de cometas em leucócitos do sangue periférico e hepatócitos de ratos Wistar	86
Figura 20. Impacto do carotenóide norbixina, do metilmercúrio e de suas associações sobre a indução de formação de cometas em leucócitos do sangue periférico e hepatócitos de ratos Wistar	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indução de migração no DNA e formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina em cultura de células HepG2 após a exposição ao cloreto de mercúrio e ao metilmercúrio.....	61
Tabela 2 - Determinação das concentrações de mercúrio total em fígado e sangue de ratos Wistar após a exposição ao flavonóide quercetina, metilmercúrio e suas associações.....	79
Tabela 3 - Atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase e concentrações do tripeptídeo glutathione sanguíneas de ratos Wistar após os tratamentos com o flavonóide quercetina, metilmercúrio e suas associações.....	83
Tabela 4 - Determinação das concentrações de mercúrio total em fígado e sangue de ratos Wistar após a exposição ao carotenóide bixina e norbixina, metilmercúrio e suas associações	85
Tabela 5 - Atividades das enzimas catalase e concentrações do tripeptídeo glutathione sanguíneas de ratos Wistar após os tratamentos com os carotenóides bixina e norbixina, metilmercúrio e suas associações.....	89

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

8-OHdG	8-hidroxi2'-deoxiguanosina
8-oxodG	8-oxo-7-hidro-2'-deoxiguanosina
A	adenina
AC	aberrações cromossômicas
Ala-D	ácido delta-aminolevulínico dehidratase
B(a)P	benzo(a)pireno
BHT	hidroxitolueno butilato
BIX	bixina
C	citosina
CAT	catalase
dG	deoxiguanosina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetil sulfoxido
DNTB	ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
DP	desvio padrão
DXR	doxorubicina
ERNs	espécies reativas do nitrogênio
EROs	espécies reativas do oxigênio
FQ	fitoquímico
G	guanina
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
H ₂ DCFDA	diacetato de 2'7'-dichlorofluoresceína
Hb	hemoglobina
ICP-MS	espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente
IHg	mercúrio inorgânico
IM	índice mitótico
MDA	malondialdeído
MeHg	metilmercúrio
min	minuto
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NOR	norbixina

OHg	mercúrio orgânico
PBS	salina tampão-fosfato
pc	peso corporal
PCO	proteínas carboniladas
QC	quercetina
rpm	rotações por minuto
SBF	soro bovino fetal
SOD	superóxido dismutase
T	timina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor que
±	mais ou menos
≤	menor ou igual a
®	marca registrada
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
¹ O ₂	oxigênio singlete
cm	centímetro
g	grama
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Hg	mercúrio
Hg ⁰	vapor de mercúrio
Hg ²⁺	mercúrio mercúrico
HgCl ₂	cloreto de mercúrio
kg	quilograma
L	litro
M	molar
mA	miliamper
mg	miligrama
ng	nanograma
nm	nanômetro
° C	graus Celsius
O ₂ ^{•-}	superóxido
OH [•]	radical hidroxil
-SH	sulfidrila
TM	<i>trademark</i>
V	volts

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Siglas	vi
Lista de Símbolos	viii
1 Introdução	20
1.1 Mercúrio: aspectos toxicológicos e seus impactos à saúde humana	21
1.1.1 Identificação e ciclo biogeoquímico	21
1.1.2 Mecanismos de toxicidade do mercúrio	23
1.1.3 Exposição ao mercúrio no Brasil	28
1.2 Quimioprevenção e o uso de fitoquímicos.....	30
1.2.1 Flavonóide quercetina	32
1.2.2 Carotenóides bixina e norbixina	34
1.3 Ensaio do cometa.....	38
2 Objetivos	42
3 Materiais e Métodos	44
3.1 Reagentes	45
3.2 Quercetina, bixina e norbixina	45
3.3 Estudos <i>in vitro</i>	46
3.3.1 Cultura celular	46
3.3.2 Tratamento das células	46
3.3.2.1 Teste de viabilidade celular	46
3.3.2.2 Avaliação da genotoxicidade dos compostos.....	47
3.3.2.3 Avaliação da antígenotoxicidade do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos genéticos induzidos pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio.....	47
3.3.2.4 Determinação dos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox celular.....	48
3.3.3 Ensaio do Cometa	49

3.3.4	Determinação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina	50
3.3.5	Determinação de tióis totais intracelulares	50
3.3.6	Quantificação de malondialdeído intracelular	51
3.3.7	Determinação de proteínas carboniladas intracelulares	51
3.3.8	Determinação de espécies reativas do oxigênio intracelulares	51
3.4	Estudos <i>in vivo</i>	52
3.4.1	Ratos da linhagem Wistar.....	52
3.4.1.1	Tratamento dos animais	52
3.4.2	Ensaio do cometa em leucócitos e hepatócitos de ratos	54
3.4.3	Determinação de tióis totais sanguíneos	54
3.4.4	Determinação da atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase	55
3.4.5	Determinação da atividade da enzima antioxidante catalase	55
3.4.6	Determinação das concentrações de mercúrio total em sangue e fígado dos ratos.....	55
3.5	Análise estatística dos dados	56
4	Resultados	57
4.1	Estudos <i>in vitro</i>	58
4.1.1	Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos compostos de mercúrio.....	58
4.1.2	Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina	62
4.1.2.1	Quercetina	62
4.1.2.2	Bixina e norbixina	63
4.1.3	Avaliação dos efeitos protetores do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos oxidativos causados pelos compostos de mercúrio	67
4.1.3.1	Avaliação dos efeitos antigenotóxicos e antioxidantes do flavonóide quercetina.....	67
4.1.3.1.1	Antigenotoxicidade	67
4.1.3.1.2	Impacto sobre os parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células após a exposição ao flavonóide, aos compostos de mercúrio e às suas associações.....	70
4.1.3.2	Avaliação dos efeitos antigenotóxicos e antioxidantes dos carotenóides bixina e norbixina	72
4.1.3.2.1	Antigenotoxicidade	72
4.1.3.2.2	Impacto sobre os parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células após a exposição aos carotenóides, aos compostos de mercúrio e às suas associações.....	76
4.2	Estudos <i>in vivo</i>	79

4.2.1	Flavonóide quercetina	79
4.2.1.1	Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, quercetina e suas associações sobre as concentrações de mercúrio total no fígado e sangue de ratos Wistar.....	79
4.2.1.2	Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, quercetina e suas associações sobre a estabilidade do material genético, avaliada por meio do ensaio do cometa.....	80
4.2.1.3	Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, quercetina e suas associações sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox dos animais.....	81
4.2.2	Carotenóides bixina e norbixina	84
4.2.2.1	Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, bixina, norbixina e suas associações sobre as concentrações de mercúrio total no fígado e sangue de ratos Wistar.....	84
4.2.2.2	Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, bixina, norbixina e suas associações sobre a estabilidade do material genético, avaliado por meio do ensaio do cometa.....	85
4.2.2.3	Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, bixina, norbixina e suas associações sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox dos animais	88
5	Discussão.....	91
6	Conclusões	102
7	Referências	104

1 Introdução

1.1 Mercúrio: aspectos toxicológicos e seus impactos à saúde humana

1.1.1 Identificação e ciclo biogeoquímico

O mercúrio (Hg) é um metal líquido à temperatura ambiente, conhecido desde a antiguidade. Seu nome homenageia o deus romano Mercúrio, o mensageiro dos deuses. Essa homenagem é devido à fluidez do metal. O símbolo Hg vem do latim "hydrargyrum" que significa prata líquida. O Hg é um elemento químico de número atômico 80 e massa atômica de 200,5, pertencente ao grupo 12 da tabela periódica e faz parte da classe dos metais de transição (AZEVEDO, 2003).

O Hg é encontrado naturalmente no ambiente nas formas de mercúrio metálico (Hg^0), mercúrio inorgânico (IHg) e mercúrio orgânico (OHg), sendo mais frequente a forma inorgânica (AZEVEDO, 2003). A emissão de Hg para a biosfera pode ocorrer tanto por meio de fontes naturais como antropogênicas. Dentre as fontes naturais, destaca-se a emissão em razão da mobilização do Hg da crosta terrestre, como por exemplo, por meio da atividade vulcânica. Já a liberação de Hg para o ambiente por fontes antropogênicas pode ocorrer de diversas maneiras, tais como queima de combustível fóssil, como o carvão mineral e a utilização do Hg na indústria, sejam em produtos ou em processos químicos (UNEP, 2002). O Hg emitido na natureza, tanto de maneira natural como antropogênica, está na forma inorgânica (HANSEN; DANSCHER, 1997).

O Hg presente no ambiente, na forma de IHg, não é capaz de causar danos graves à saúde pois é fracamente absorvido. No entanto, quando é liberado no ambiente aquático e atinge estes ecossistemas, como, por exemplo, por meio da erosão favorecida pelo desmatamento ou por meio dos efluentes industriais não tratados de forma adequada e ainda, na presença de certas bactérias denominadas metalogênicas, o IHg recebe um radical metil e é transformado na sua principal forma orgânica e de também maior toxicidade, o metilmercúrio (MeHg) (FADINI; JARDIM, 2001). Após este processo de transferência do radical metil ao Hg, o MeHg presente na água, torna-se altamente biodisponível e se acumula ao longo da cadeia trófica. Estes processos são denominados de bioacumulação e biomagnificação (BALSHAW *et al.*, 2007); ou seja, as algas e as plantas aquáticas apresentam

concentrações de MeHg muito próximas àsquelas encontradas nas águas. Já os peixes que se alimentam destas plantas apresentam concentrações algumas vezes maiores que estas algas e plantas. Peixes carnívoros, apresentam concentrações muito mais elevadas de MeHg que os peixes herbívoros. De maneira geral, peixes que estão no topo da cadeia alimentar apresentam concentrações de MeHg de até um milhão de vezes maiores àsquelas encontradas nas águas onde vivem (GUIMARAES *et al.*, 2000, BALSHAW *et al.*, 2007). Sendo assim, o peixe é a principal fonte de exposição MeHg para os seres humanos e é presumível que os tipos de peixes consumidos (herbívoros ou carnívoros) estão diretamente relacionados com as concentrações de MeHg as quais os indivíduos estarão expostos.

A Figura 1 ilustra o ciclo biogeoquímico deste metal. Sob a forma de Hg^0 , o metal é emitido por meio da desgaseificação da crosta terrestre e por meio de erupções vulcânicas, bem como por evaporação dos oceanos e solos. Fontes antropogênicas contribuem de maneira significativa na emissão de Hg para a atmosfera; estas incluem as emissões provenientes de mineração, desmatamento da mata ciliar, a combustão de carvão mineral, incineradores industriais e efluentes não tratados apropriadamente. O Hg^0 é um gás quimicamente estável e seu tempo de residência é de aproximadamente um ano e desta maneira, pode-se distribuir globalmente. Eventualmente, tanto na água quanto no ar, ele pode sofrer oxidação, tornando um elemento hidrossolúvel, o mercúrio mercúrico (Hg^{2+}) e por meio da chuva retorna ao solo e/ou à água. No ambiente aquático, o Hg^{2+} pode ser reduzido novamente a Hg^0 ou pode ser metilado por microrganismos presentes nos sedimentos dos rios, lagos e oceanos, formando MeHg. Desta maneira, o MeHg entra na cadeia alimentar aquática, iniciando-se pelos plânctons, em seguida pelos peixes herbívoros e carnívoros, respectivamente e finalmente, chega ao homem por meio da pesca (LIU; GOYER; WAALKES, 2008).

Figura 1. Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do mercúrio (Hg) no meio ambiente. Fonte: LIU; GOYER, WAALKES, 2008.

1.1.2 Mecanismos de toxicidade do mercúrio

Um dos casos mais conhecidos de intoxicação pelo Hg aconteceu em Minamata, no Japão, em 1956. Após a descarga de grande quantidade de Hg na baía de Yatsushiro por uma indústria de polímeros, os microrganismos presentes no local metilaram o Hg, que resultou em um acúmulo de MeHg na fauna da baía. Após alguns anos, vários efeitos adversos relacionados à exposição ao MeHg começaram a ser observados na população local, que se alimentava dos peixes desta região (EKINO *et al.*, 2007).

Os principais efeitos adversos à saúde relacionados à exposição ao Hg são: distúrbios gastrointestinais, músculo-esqueléticos, hepáticos, cardiovasculares e principalmente neurológicos e renais. Os principais sintomas consistem em distúrbios visuais, parestesia, perda da audição, dano nas funções do túbulo renal, tremor muscular, paralisia e até morte (CLARKSON; MAGOS, 2006). Recentemente,

tem sido dada maior relevância à exposição ao Hg na forma de MeHg, devido a sua maior biodisponibilidade e toxicidade. Vários mecanismos são responsáveis pelos efeitos tóxicos do Hg, dentre eles destacam-se a alta afinidade do Hg com grupos tiólicos, inativando desta maneira várias proteínas e enzimas, como por exemplo, a glutathione (GSH) e glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), respectivamente; danos no material genético, tais como mutações, diminuição ou até mesmo interrupção na síntese do DNA e desequilíbrios no estado redox intracelular (ATSDR, 1999, CLARKSON, 2002, CLARKSON; MAGOS, 2006).

Um dos mais importantes mecanismos para explicar o dano oxidativo induzido pelo Hg é a sua alta reatividade com os grupamentos sulfidrílicos (–SH) (SCHURZ; SABATER-VILAR; FINK-GREMMELS, 2000). A GSH - L-γ-glutamyl-L-cisteinyl-glicina - é o principal tiol não-protéico celular livre, e também é o principal antioxidante endógeno do organismo (CECONI *et al.*, 1988, SINGH, 2002). Acredita-se que a GSH sirva como uma primeira linha de defesa celular contra os compostos de Hg. Tanto o IHg quanto o OHg liga-se à GSH por meio dos resíduos de cisteína de forma covalente e desta maneira, seus efeitos deletérios são minimizados. Esta ação protetora mediada pela GSH, porém, faz com que as reservas deste antioxidante diminuam, e que o organismo fique suscetível ao dano oxidativo por meio da acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), normalmente neutralizadas por este tripeptídeo (OU *et al.*, 1999, SARAFIAN, 1999, HOUSTON, 2007).

O Hg pode diminuir, de maneira considerável, as concentrações da principal defesa antioxidante do organismo, a GSH, e desta maneira elevar as concentrações de EROs e radicais livres, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) e oxigênio singlete ($^1O_2$) (SARAFIAN, 1999, ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001, VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). Este desequilíbrio entre as defesas antioxidantes celulares e as espécies oxidantes gera um estado pró-oxidante, ou também conhecido como estresse oxidativo. As espécies reativas, então, podem atacar proteínas, DNA e principalmente lipídeos (HALLIWELL; CHIRICO, 1993, MARNETT, 1999, ZIECH *et al.*, 2010), processo denominado de peroxidação lipídica. Um dos principais produtos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), o qual é muito utilizado como indicador do dano da membrana celular (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991, LYKKESFELDT, 2007). Em um estudo realizado por Huang e colaboradores (1996), concentrações

elevadas de MDA foram encontrados em rins, fígado e pulmão de ratos tratados com cloreto de mercúrio (HgCl_2). Em outro estudo, porém *in vitro*, também foi evidenciado aumento da peroxidação lipídica, quantificado pelos reativos do ácido tiobarbitúrico em linfócitos de ratos Wistar (FARINA *et al.*, 2003).

Além de induzir a peroxidação lipídica, o Hg pode interferir na atividade de várias enzimas antioxidantes; por exemplo, as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) podem sofrer diminuições após a exposição ao Hg. Entretanto, na literatura, não há um consenso geral entre os dados, ou seja, alguns trabalhos relataram aumento da atividade de certas enzimas antioxidantes enquanto outros evidenciaram uma redução das atividades destas enzimas. Ariza *et al.* (1998) demonstraram que o HgCl_2 induz a formação de H_2O_2 , estimula a atividade da SOD e não afeta a atividade da CAT e da GPx. Já em trabalhadores ocupacionalmente expostos ao Hg^0 , as atividades da SOD e da GPx mostraram-se ambas diminuídas (BULAT *et al.*, 1998), enquanto que para Hussain e colaboradores (1999) houve um aumento na atividade da CAT e da GPx. De modo geral, exposições agudas ao Hg levam a diminuição das atividades enzimáticas; já organismos expostos a períodos prolongados não apresentam alterações nos padrões enzimáticos, provavelmente devido a uma resposta compensatória indireta das células ao aumento do estresse oxidativo, como forma de mecanismo de auto-proteção (CHEN *et al.*, 2005).

Propriedades citotóxicas do Hg também já foram descritas; efeitos deletérios às células podem ser induzidos tanto por necrose quanto por apoptose (MIURA; IMURA, 1987, KUNIMOTO, 1994, MIURA *et al.*, 1999, CHEN *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* sugerem que a concentração de Hg a qual as células são expostas é um fator crítico, determinando o modo de morte celular: altas concentrações de Hg (5 – 10 μM) causam rápido prejuízo da atividade mitocondrial e lise da membrana plasmática, resultando em extensiva necrose celular, enquanto que exposições a baixas concentrações de Hg (< 1 μM) desencadeiam mecanismos de apoptose (CASTOLDI *et al.*, 2000).

O Hg ainda é capaz de interagir de diversas maneiras com o material genético. Como apresentado, exposição ao metal leva a um desequilíbrio do estado redox intracelular, aumentando as concentrações de espécies reativas. Estes compostos podem interagir com praticamente todos os componentes do material genético, levando a alterações nas suas bases nitrogenadas e/ou em seu

citoesqueleto, causando diferentes tipos de lesões tais como ligações cruzadas entre DNA e proteínas, liberação de bases purínicas e pirimidínicas do DNA (produzindo sítios apurínicos e apirimidínicos), além de ter capacidade de retirar átomos de hidrogênio da desoxirribose levando à formação de radicais derivados do açúcar que, se não reparados, resultam na clivagem do esqueleto açúcar-fosfato do DNA (VALKO *et al.*, 2006, HALLIWELL, 2007, FERGUSON; PHILPOTT, 2008, RAO, 2009, KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010). Um ótimo exemplo dos possíveis danos causados pelo desequilíbrio do estado redox intracelular causado pelas espécies de Hg é a formação de bases oxidadas. Neste contexto, a Figura 2 exemplifica o impacto do radical $\text{OH}^\bullet$ sobre a base nitrogenada guanina:

Figura 2. Impacto do radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) sobre a base nitrogenada 2-deoxiguanosina levando à formação de radicais. O radical aducto-C8-OH pode então sofrer redução levando a formação 7-hidro-8-hidroxi-2'-deoxiguanosina ou oxidação, formando 8-oxo-7-hidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) e/ou seu tautômero 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) que pode ser quantificado pelo uso de várias metodologias. Modificado de Valavanidis et al., (2009).

Estes danos no material genético causados pelo desequilíbrio do estado redox celular tendem a ser reparados pelos diversos mecanismos de reparo presentes na célula, mas caso a célula que sofreu o dano se divida antes que o reparo do DNA ocorra, levará ao aparecimento de uma alteração permanente no DNA, que é dependente qualitativa e quantitativamente do elemento químico. Como demonstrado na figura anterior, guaninas oxidadas (8-oxodG e 8-OHdG) apresentam grande importância biológica, uma vez que pode causar emparelhamento errôneo com a adenina (A), e desta maneira, levar a uma transversão de guanina-citosina para timina-adenina (GC → TA) (LE PAGE *et al.*, 2000, 2005). Deste modo, estudos que visam avaliar as concentrações de bases oxidadas após exposição ao Hg apresentam grande relevância, uma vez que vários trabalhos têm demonstrado uma relação entre concentrações elevadas de guaninas oxidadas e a exposição ao metal em diversos modelos experimentais (OGURA; TAKEUCHI; MORIMOTO, 1996, CHEN *et al.*, 2005, JIN *et al.*, 2008).

Além do dano causado ao DNA pelo desequilíbrio do estado redox celular, outro mecanismo responsável pela genotoxicidade atribuída ao metal é o seu efeito sobre os diversos mecanismos de reparo do material genético que pode ser de maneira indireta, por meio da peroxidação protéica das enzimas de reparo, devido ao aumento do estresse oxidativo intracelular ou de maneira direta e em maior grau, por meio de ligações covalentes com os grupos -SH de cisteínas e/ou histidinas residuais das diversas moléculas presentes nas inúmeras fases dos processos de reparo do DNA. Em ambos os casos, estes danos nas enzimas envolvidas no processo, levam invariavelmente ou a uma diminuição de sua atividade ou a sua total perda de função (ASMUSS; MULLENDERS; HARTWIG, 2000, CEBULSKA-WASILEWSKA *et al.*, 2005, HALLIWELL, 2007). Além do mais, é também proposto que o Hg possa interagir com proteínas do citoesqueleto (provavelmente por meio de ligações com os grupamentos sulfidrilas), mais especificamente as formadoras do microtúbulo, principalmente tubulina (THIER *et al.*, 2003, BONACKER *et al.*, 2004, STOIBER *et al.*, 2004) e desta maneira, causar diversos efeitos deletérios à célula, como um aumento na formação de micronúcleos (MN), por exemplo, uma vez que proteínas do citoesqueleto estão envolvidas em vários processos celulares, tais como segregação cromossômica e divisão nuclear.

1.1.3 Exposição ao mercúrio no Brasil

O crescimento acentuado da produção brasileira de ouro nas últimas décadas tem colaborado para uma alteração marcante do padrão de morbidade da população. A participação da atividade garimpeira de ouro na economia da região amazônica teve início no rio das Tropas, afluente direito do rio Tapajós, no Pará, no final da década de 1950 quando foram descobertas as primeiras ocorrências deste metal. Desde então, o garimpo revelou-se como um assunto polêmico, em função de diversas questões sociais, políticas, econômicas e principalmente dos problemas ambientais gerados, com a elevada utilização do mercúrio no processo de extração; estima-se que para cada quilo de ouro extraído na região, a mesma quantidade de Hg é utilizada e posteriormente, descartada no ambiente (BRABO *et al.*, 1999, AZEVEDO, 2003).

Além dos problemas relacionados ao garimpo na região, recentemente, foi evidenciado que elevados teores de Hg em rios amazônicos não decorrem apenas do extrativismo mineral, ocorrendo também de forma natural. Em 2001, por exemplo, Fadini e colaboradores demonstraram que concentrações elevadas deste metal no rio Negro eram de origem natural e foram creditados à mobilização do metal acumulado durante milhares de anos nos solos argilosos, antigos e profundos que predominam na região, por meio de complexos orgânicos que são liberados pelo processo de podzolização. Uma vez o Hg na água, o Hg é metilado e se torna altamente biodisponível, acumulando-se nos diversos níveis tróficos da cadeia alimentar da região e por meio da pesca, chega ao homem (BALSHAW *et al.*, 2007).

A população da região amazônica pode ser dividida claramente em dois tipos: uma população que vive nos centros urbanos e outra população que vive às margens dos rios, as chamadas comunidades ribeirinhas. Tais comunidades se destacam pela peculiaridade no que se diz respeito ao estilo de vida, principalmente em relação à alimentação; por exemplo, a principal fonte de proteína é por meio da ingestão dos peixes (cerca de 90% de toda a proteína ingerida) e o consumo de vegetais em geral, tais como frutas e legumes, se restringem basicamente aos típicos da região. Passos *et al.* (2008) estimaram a ingestão diária de peixes em comunidades ribeirinhas situadas às margens do rio Tapajós, e o consumo médio de peixes é da ordem de 4 g/kg de peso corporal (pc) por dia. Além disso, os autores

também definiram a ingestão média de Hg na população, por meio do consumo dos peixes pelas diversas comunidades e foi, em média, de 0,92 µg/kg pc (variando entre 0 e 11,8 µg/kg pc), ou seja, um indivíduo adulto de 70 kg ingere cerca de 64 µg de Hg por dia; considerando a população em geral, não exposta, a ingestão diária de MeHg é de cerca de 0,03 µg/kg pc (2,1 µg de MeHg por dia para um adulto de 70 kg) (ATSDR, 1999). Desta maneira, a contaminação do sistema aquático nesta região apresenta um impacto direto na saúde destas comunidades que residem às margens dos rios amazônicos (PASSOS; MERGLER, 2008).

Neste contexto, é notável que várias pesquisas fossem conduzidas em comunidades ribeirinhas na região amazônica, no sentido de melhor compreender o ciclo biogeoquímico deste metal e consequentemente as implicações à saúde da população exposta de maneira crônica por meio do consumo de peixes contaminados. Por exemplo, Harada e colaboradores demonstraram que as concentrações de Hg no cabelo variaram em média de 14,1 a 20,8 µg/g com valores encontrados de até 62,9 µg/g. Em geral, em populações não expostas ao MeHg, as concentrações no cabelo deste metal são inferiores a 5 µg/g (CDC, 2003). Em um estudo recente, de Marco *et al.* (2010) encontraram valores médios de Hg no sangue, plasma e cabelo, em indivíduos expostos ao metal por meio do consumo de peixes, de aproximadamente 50,0 µg/L; 8,0 µg/L e 15,0 µg/g, respectivamente. Os autores ainda demonstraram que a exposição ao MeHg exerce uma influência negativa na produção de óxido nítrico. Está bem estabelecido que o óxido nítrico está diretamente envolvido na regulação da pressão arterial, por meio do controle do relaxamento endotelial (UMANS; LEVI, 1995, TODA; AYAJIKI; OKAMURA, 2009). Estes resultados corroboraram para uma melhor compreensão dos achados de Fillion e colaboradores (2006) que observaram um significativo efeito dose-resposta entre exposição a este metal e o aumento da pressão arterial. Já Grotto *et al.* (2010) demonstraram que a exposição a este metal leva a um aumento do estresse oxidativo nos indivíduos. Neste estudo, os autores correlacionaram a exposição ao MeHg e uma diminuição de vários marcadores bioquímicos relacionados ao estado redox do indivíduo, tais como as atividades das enzimas GPx, CAT, ácido delta-aminolevulínico dehidratase (Ala-D) e concentrações do tripeptídeo GSH.

Como já apresentado, é conhecido que desequilíbrios no estado redox da célula causados por exposição a metais tóxicos estejam associados aos processos que levam a diversos danos no material genético (VALKO *et al.*, 2006). Neste

sentido, Amorin *et al.* (2000) evidenciaram uma correlação entre as concentrações de Hg no cabelo (de 0,57 até 153,8 µg/g) e alterações citogenéticas em linfócitos do sangue periférico, tais como aumento do número de células poliplóides, trocas entre cromátides irmãs e diminuição do índice mitótico (IM) em indivíduos expostos ao MeHg via consumo de peixes e Crespo-Lopez *et al.* (2010) demonstraram um aumento no número de AC e uma diminuição do IM também em linfócitos do sangue periférico destes indivíduos, quando comparados com populações não expostas ao Hg.

Tendo em vista o que foi apresentado, várias populações amazônicas encontram-se ambientalmente expostas de maneira crônica a este metal, via dieta. Deste modo, estudos que pretendam desenvolver métodos para a prevenção e/ou redução dos efeitos adversos à saúde causados pelo Hg são de grande valia, uma vez que tais estudos apresentariam um grande impacto na melhora de vida destas e de outras populações que estão expostas a este metal.

1.2 Quimioprevenção e o uso de fitoquímicos

Com a descoberta de bactérias e outros organismos patogênicos, tanto a medicina preventiva como a curativa, foram eficientes na redução do número de mortes por doenças transmissíveis em países desenvolvidos. No entanto, as doenças degenerativas crônicas, tais como mal de Alzheimer, esclerose múltipla e o câncer estão entre as chamadas “doenças de origem multifatorial” e são, portanto, de prevenção e tratamento muito complexos (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Nas últimas duas décadas, um aumento nas evidências obtidas a partir de estudos epidemiológicos e em modelos laboratoriais, tem demonstrado que algumas plantas como um todo, ou por meio de seus compostos isolados, denominados de fitoquímicos (FQ), apresentam propriedades protetoras consideráveis na carcinogênese humana, doenças cardíacas e neurodegenerativas (SURH; FERGUSON, 2003). FQ são substâncias químicas definidas como compostos bioativos, não nutrientes, encontrados em frutas, vegetais, grãos e outras plantas comestíveis, que estão ligados a uma redução no risco da maioria das doenças crônicas (LIU, 2003). Estas moléculas são, principalmente, metabólitos secundários

das plantas e estão, geralmente, envolvidas na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (MANACH *et al.*, 2004).

De acordo com Liu (2003), os FQ podem ser classificados como carotenóides, compostos fenólicos, alcalóides, compostos contendo nitrogênio e compostos organossulfurados (Figura 3), sendo os fenólicos e os carotenóides os atualmente mais estudados, pois apresentam grande atividade antioxidante. Compostos fenólicos são moléculas que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila e, geralmente, são classificados como ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos. Dentre eles, o grupo dos flavonóides é o mais representativo e também o mais estudado, devido ao seu grande poder de neutralizar EROs (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009). Os carotenóides são pigmentos naturais (que variam do amarelo ao vermelho) e são divididos em duas grandes classes: carotenos, os quais são formados exclusivamente por hidrocarbonos e as xantofilas que possuem átomos de oxigênio em suas moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999, PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009).

Figura 3. Classificação dos fitoquímicos de ocorrência natural.

Neste contexto, é notável que vários trabalhos tenham sido realizados a fim de avaliar o potencial quimiopreventivo de diversos FQ, sendo observados resultados muito promissores em vários modelos laboratoriais (HUANG *et al.*, 1985, WISEMAN; BALENTINE; FREI, 1997, KAUR; GROVER; KUMAR, 2000, BARCELOS *et al.*, 2007, BARCELOS *et al.*, 2009). No entanto, apesar da grande divulgação dos efeitos benéficos destes FQ é necessário ressaltar que, apesar de naturais, eles podem

causar efeitos adversos à saúde; por exemplo, em um estudo o qual foi avaliado uma possível redução na incidência de câncer de pulmão em indivíduos fumantes tratados com β -caroteno mostrou-se uma incidência 18% maior no desenvolvimento da neoplasia nos indivíduos tratados em relação àqueles não tratados com o carotenóide (BOWEN *et al.*, 2003).

A quimioprevenção surge como um estágio pioneiro na prevenção de doenças, mas ainda não é amplamente aceita ou aplicada. Estudos *in vitro*, em modelos animais e dados epidemiológicos têm contribuído para identificar um grande número de agentes que podem, potencialmente, ser capazes de diminuir o risco de desenvolvimento de várias patologias multifatoriais, dentre elas, o câncer (DE FLORA; FERGUSON, 2005, FERGUSON, 2009).

1.2.1 Flavonóide quercetina

Dentre os grupos fenólicos, os flavonóides são os mais representativos e são subdivididos em seis grupos: flavanóis, flavonóis, flavonas, antocianinas, isoflavonóides e flavononas (AHERNE; O'BRIEN, 2002, MORAES; LUCIANE; COLLA, 2006). De todos os FQ os quais compõe a dieta humana, o flavonol quercetina (QC, $C_{15}H_{10}O_7$, Figura 4) é o mais abundante, encontrado principalmente na cebola, maçã verde e vermelha, vinho tinto, frutas cítricas em geral e vegetais verde escuros (tais como brócolis, couve) e sua ingestão diária pode variar de 25 a 50 mg por dia (FORMICA; REGELSON, 1995); entretanto, estes dados foram baseados no hábito alimentar da população dos EUA e um estudo mais recente, realizado de acordo com a dieta brasileira sugere que estas concentrações podem estar subestimadas e o real consumo de QC por dia pode ser muito maior (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004).

Figura 4. Estrutura química do flavonóide quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$). Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Quercetin.png>.

A QC, dentre todos os flavonóides existentes é o que apresenta maior propriedade antioxidante e essa característica está associada à presença de duas farmacoesferas, as quais oferecem uma ótima configuração para funcionar como sequestrador de radicais e/ou doador de hidrogênios (HEIJNEN *et al.*, 2002).

Por esta razão, é notável que vários estudos que visassem avaliar os seus reais efeitos, sejam eles benéficos ou tóxicos fossem conduzidos e apresentassem resultados discrepantes. Dentre eles, destacam-se os testes que visaram avaliar o potencial genotóxico/mutagênico deste flavonóide, principalmente em modelos *in vitro*. A atividade mutagênica da QC aparenta se restringir somente em linhagens de *Salmonella typhimurium* (na presença e ausência da fração microssomal S9) (HATCHER; BRYAN, 1985, SCHIMMER; HAFELE; KRUGER, 1988, MAKENA *et al.*, 2009), uma vez que estudos realizados com outro tipo celular (células de hepatoma humano, HepG2) ou em modelos animais não evidenciaram tal relação (DA SILVA *et al.*, 2002, TIEPPO *et al.*, 2007, DELGADO *et al.*, 2008, UTESCH *et al.*, 2008). Estas discordâncias nos resultados podem ser explicadas, ao menos em parte, pelo processo de indução do metabolismo da QC, uma vez que mesmo com a adição de sistemas exógenos de metabolização, tais como a fração S9, estes não refletem de maneira semelhante, o cenário enzimático encontrado em linhagens celulares tais como células HepG2 (apesar de serem células transformadas, elas possuem grande parte das enzimas responsáveis pelo biometabolismo de xenobióticos presente em seres humanos, sejam eles de fase I ou de fase II (KNASMULLER *et al.*, 2004,

MERSCH-SUNDERMANN *et al.*, 2004)) ou em animais, tais como ratos e camundongos (HARWOOD *et al.*, 2007).

Trabalhos a respeito de seu efeito antioxidante têm demonstrado que a QC apresenta atividades protetoras, *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, uma pronunciada redução dos danos no DNA causados pelo t-butil-hidroxiperoxido foi observada em experimentos conduzidos em culturas de células HepG2 por Ramos *et al.* (2008) e Muthukumaran *et al.* (2008) demonstraram uma significativa redução na formação de cometa e MN e ainda, diminuição das alterações do estado redox celular, induzidos pela exposição à nicotina em cultura de linfócitos de ratos. Já Gupta *et al.* (2010) observaram que o flavonóide foi capaz de reduzir a extensão do dano no DNA, avaliada pelo teste do cometa, em hepatócitos de ratos tratados com dietilnitrosanina; paralelamente a isso, as concentrações de GSH e MDA, as quais foram alterados pela exposição ao composto, foram revertidos aos níveis do controle negativo após a suplementação com o flavonóide.

Portanto, o flavonóide QC mostra-se um eficiente e promissor agente com propriedades protetoras para ser utilizado de maneira efetiva na prevenção e até mesmo tratamento de diversas patologias e estudos que visam avaliar o impacto deste flavonóide em concentrações relevantes àquelas em que seres humanos estão expostos, via dieta, são de grande importância, para que se possam estabelecer os principais mecanismos envolvidos na proteção exercida pela QC.

1.2.2 Carotenóides bixina e norbixina

Os carotenóides são responsáveis pela foto-proteção de tecidos vegetais devido à sua capacidade em sequestrar e inativar EROs formadas pela exposição à luz, à radiação e/ou ao ar atmosférico. Esta função foto-protetora é semelhante à atividade antioxidante que os carotenóides exercem nos seres humanos. Além disso, os carotenóides possuem a função de servirem como precursores da vitamina A (MANACH *et al.*, 2004).

Bixa orellana L. é um arbusto nativo da América do Sul, mais especificamente da região amazônica, podendo chegar a 6 metros de altura; suas sementes são ricas em pigmentos vermelhos conhecidos como urucum ou internacionalmente

como *annatto* (Figura 5a) (GALINDO-CUSPINERA; LUBRAN; RANKIN, 2002). As sementes do urucum são constituídas por vários carotenóides, responsáveis por sua coloração avermelhada, sendo os principais a bixina (BIX) e norbixina (NOR). A bixina (BIX, $C_{25}H_{30}O_4$, Figura 5b) corresponde a cerca de 80% de todos os carotenóides presentes nestas sementes e a NOR ($C_{24}H_{28}O_4$, Figura 5c) é encontrada em menores quantidades no urucum; ele é obtido por meio da remoção hidrolítica do grupamento metil-ester da BIX por saponificação (PRESTON; RICKARD, 1980). Outros carotenóides que estão presentes no urucum, mas em menores concentrações também têm sido identificados (MERCADANTE; STECK; PFANDER, 1997, 1999).

a)

b)

c)

Figura 5 (a-c). Sementes de *Bixa orellana* L., conhecido popularmente como urucum (a). A cor avermelhada destas sementes se deve a presença de vários carotenóides, tais como a bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) (b) e a norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) (c). Fonte: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Urucum_\(bixa_orellana\)_seeds.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Urucum_(bixa_orellana)_seeds.jpg); <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bixin.png>; http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Norbixin_structure.png.

Devido ao seu alto poder colorante, por ser tratar de um composto natural e de baixo custo de obtenção, o extrato do urucum é amplamente utilizado no processamento de alimentos pelas indústrias, tais como manteigas, queijos, margarinas, sorvetes dentre outros (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). Do total de sementes de urucum produzido no Brasil, cerca de 30% são aplicados na preparação de extratos lipo e hidrossolúveis para a utilização pela indústria e o

restante é empregado na fabricação do colorífico ou “colorau”, o qual é totalmente consumido no mercado interno, principalmente na região norte e nordeste do Brasil (GHIRALDINI, 1989). Segundo a Resolução de 1978, CNNPA 12/78, do Ministério da Saúde, colorífico é definido como um produto constituído pela mistura de fubá ou farinha de mandioca, com urucum em pó ou extrato oleoso de urucum adicionado ou não de sal e de óleos comestíveis. Este produto, quase que exclusivamente de uso doméstico, proporciona cor avermelhada ao arroz, risotos, bifes, frangos, peixes, farofas, molhos e queijos. A ingestão diária do urucum varia de 0-2,5 mg/kg pc por dia ou aproximadamente 0-0,065 mg/kg pc por dia de BIX e NOR (JECFA, 1982).

Segundo Di Mascio *et al.* (1991), o carotenóide BIX é o mais eficiente sequestrador de $^1\text{O}_2$, sendo, por esta razão um promissor agente para ser utilizado contra os efeitos adversos relacionados à exposição ao Hg.

Estudos têm demonstrado que tanto os carotenóides BIX quanto NOR apresentam atividade antioxidante. Por exemplo, em experimentos realizados com bactérias *Escherichia coli*, o carotenóide NOR apresentou proteção antioxidante contra uma série de agentes deletérios, tais como radiação ultravioleta C, H_2O_2 e menadiona, um gerador de $\text{O}_2^{\bullet-}$; além disso, os autores também demonstraram que a NOR não exerceu qualquer efeito mutagênico e ainda foi capaz de reduzir o número de mutações induzidas pelo H_2O_2 em linhagens de *S. typhimurium* (JUNIOR *et al.*, 2005). Em outro experimento, a administração oral de BIX em ratos resultou em uma inibição significativa da peroxidação lipídica e da depleção de GSH, ambas induzidas pela exposição à cisplatina. Já Barcelos *et al.* (2009), demonstraram que o extrato do urucum exerceu atividade protetora contra os danos causados pelos agentes mutagênicos doxorubicina (DXR) e benzo(a)pireno (B(a)P), em culturas de células HepG2, reforçando assim, as atividades antioxidantes destes carotenóides.

Dessa forma, estudos têm demonstrado que plantas ou seus compostos isolados apresentam efeitos protetores em processos patológicos multifatoriais, tais como doenças cardíacas, neurodegenerativas e câncer, evidenciando assim, que o potencial preventivo de FQ é de grande interesse e apresenta uma nova estratégia para a prevenção e tratamento de doenças.

1.3 Ensaio do cometa

O teste do cometa é proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Ele é utilizado para detectar lesões genômicas, que após serem processadas, podem ou não resultar em mutação. Uma vez que os danos no DNA são frequentemente célula e tecido-específico, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e consequentemente, em determinada sub-população celular, é de extrema relevância para a avaliação e descoberta de compostos genotóxicos (GONTIJO; TICE, 2003).

O teste do cometa também é conhecido como SCGE (*single cell gel electrophoresis*) e foi introduzido primeiramente por Östling e Johanson em 1984 como uma técnica micro-eletrorética para visualização direta de danos no DNA em células individuais. O princípio básico do teste do cometa é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroréticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (HARTMANN *et al.*, 2003). Deste modo, é presumível que quanto maior o dano no material genético, maior será a quantidade de fragmentos do DNA, representado pela cauda do cometa. Desde a sua introdução, o teste sofreu algumas modificações; dentre a mais notável, destaca-se a versão alcalina, a qual a corrida eletrorética é realizada em $\text{pH} > 13$; devido ao elevado pH, a dupla fita do DNA se desnatura e consequentemente, possibilita avaliar também quebras de fita simples além de sítios álcali-labeis que são suscetíveis a altos pHs, rompendo a ligação fosfodiéster do esqueleto do DNA, gerando quebras de fitas simples e/ou duplas (Merk & Speit, 1999). Contudo, essas lesões primárias são passíveis de reparo e podem ou não resultar em alterações genéticas (COLLINS *et al.*, 1997).

As células podem, portanto, serem classificadas visualmente ou por meio do uso de programas específicos. Visualmente, elas podem ser classificadas de acordo com a categoria de migração da cauda em quatro classes (0, 1, 2 e 3), sendo que a classe 0 representa nenhum ou mínimo dano e a classe 3 representa máximo dano. É classificado em classe 0 quando não há migração de fragmentos de material genético (cauda); em classe 1 quando o tamanho da cauda do cometa não excede o

diâmetro da cabeça; em classe 2 quando o tamanho da cauda é entre 1 a 2 vezes o tamanho da cabeça e em classe 3 quando o tamanho da cauda é maior que 2 vezes o tamanho da cabeça (COLLINS *et al.*, 1997) (Figura 6). Já a análise automatizada, depende do programa utilizado; de maneira geral, os programas calculam a intensidade de DNA presente na cabeça e na cauda, a migração da cauda (expressa em μm) e parâmetros denominados Tail Moment (TM) e Oliver Tail Moment (OTM) (Figura 7).

Figura 6 (a-d). Classificação dos cometas de acordo com a análise visual proposta por Collins *et al.* (1997): a) classe 0; b) classe 1; c) classe 3 e d) classe 4. Várias culturas celulares (HepG2) foram expostas ao MeHg, 1 μM , pelo período de 24 horas. Posteriormente, as células foram colhidas e então conduzido o ensaio do cometa como descrito na seção Materiais e Métodos.

Figura 7. Exemplo do uso de programas para a análise dos cometas. Neste caso, o programa utilizado é o *Comet Assay IV^{TM}* (Perceptive Instruments, Haverhill, Inglaterra). Após clicar na cabeça do cometa, o programa realiza todos os cálculos automaticamente, tais como tamanho da cabeça, tamanho da cauda, porcentagem de DNA na cauda, migração da cauda e Tail Moment. Fonte: <http://www.perceptive.co.uk/cometassay/>.

Durante a última década, o teste tem sido extensivamente utilizado para a avaliação e identificação de atividades genotóxicas ou protetoras de diversos compostos químicos. Além disso, o teste também é muito útil para avaliação de risco de populações ocupacional ou ambientalmente expostas a diversos xenobióticos (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995, CEMELI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009), ou seja, a versatilidade de aplicações do teste do cometa indica sua utilidade em uma ampla área da biologia, medicina, toxicologia, dentre outros (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995, CEMELI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009, HOELZL *et al.*, 2009).

O teste do cometa deve ser realizado em condições mínimas de toxicidade celular, visto que o processo citotóxico leva, inevitavelmente, à formação de quebras no DNA. Então, durante os experimentos, é necessária a condução de teste de

citotoxicidade em paralelo, com alíquotas da mesma amostra (TICE *et al.*, 2000, GONTIJO; TICE, 2003).

Enfim, o ensaio do cometa possui vantagens como simplicidade, rapidez e relativo baixo custo, além de diferir de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas. Além disso, o fato do ensaio possibilitar o acesso às quebras do DNA de uma única célula, poucos milhares de células (de 1 a 10.000 células) são suficientes para sua realização (GONTIJO; TICE, 2003).

2 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo verificar os possíveis efeitos genotóxicos do cloreto de mercúrio, do metilmercúrio, do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina, bem como os possíveis efeitos protetores da quercetina, bixina e norbixina contra os danos oxidativos induzidos pelo Hg, em sistema de cultura *in vitro* (células de hepatoma humano, HepG2) por meio do ensaio do cometa, da determinação das concentrações de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, glutathiona, malondialdeído, espécies reativas do oxigênio intracelulares e proteínas carboniladas e, *in vivo* (ratos machos Wistar), por meio do ensaio do cometa, da determinação das concentrações de glutathiona e das atividades das enzimas antioxidantes catalase e glutathiona peroxidase.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Cloreto de mercúrio (CAS 7487-94-7), metilmercúrio (CAS 115-09-3), peróxido de hidrogênio (CAS 772-84-1), glutathione reduzida (CAS 70-18-8), 2,4-dinitrofenilhidrazina (CAS 119-26-6), ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DNTB) (CAS 69-78-3) brometo de etídio (CAS 1239-45-8), penicilina (CAS 61-33-6), estreptomicina (CAS 57-92-1), diacetato de 2'-dichlorofluoresceína (H₂DCFDA) (CAS 127770-45-0), hidroxitolueno butilato (BHT, CAS 128-37-0), ácido tiobarbitúrico (CAS 504-17-6), fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) (CAS 42934-87-2) glutathione reductase (CAS 9001-48-3), azida de sódio (CAS 26628-22-8), hidróxido de tetrametilamônio (CAS 75-59-2), dimetil sulfoxido (DMSO, CAS 67-68-5), albumina de soro bovino (CAS 9048-46-8) e azul de tripan (CAS 72-57-1) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Quetamina e xilazina foram adquiridos pela Bayer (São Paulo, SP, Brasil). “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*” (DMEM) e soro bovino fetal (SBF) foram comprados da Gibco (Carlsbad, CA, EUA). Agarose de baixo e normal ponto de fusão foram adquiridos pela Invitrogen (California, CA, EUA). Todos os outros reagentes foram de padrão analítico da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2 Quercetina, bixina e norbixina

O flavonóide quercetina (CAS 74893-81-5) foi gentilmente fornecido pelo prof. Dr. Jairo Kennup Bastos (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto) e os carotenóides bixina (CAS 6983-78-5) e norbixina (CAS 542-40-5) foram gentilmente cedidos pela CORANTEC – Corantes Naturais LTDA (São Paulo, SP, Brasil); todos os compostos foram diluídos em DMSO a 1%.

3.3 Estudos *in vitro*

3.3.1 Cultura celular

Os estoques de culturas celulares de HepG2 (alíquotas de 1,0 mL com aproximadamente 10^6 células viáveis conservadas em meio DMEM suplementado com 15% SBF e 5% de DMSO, respectivamente) foram conservadas em nitrogênio líquido. Para os experimentos descritos no presente estudo, as células foram descongeladas e usadas entre a terceira e oitava passagem; em todos os experimentos, as células foram cultivadas por um ciclo completo em meio DMEM suplementado com 15% de SBF e 1% de penicilina e estreptomicina em estufa de CO₂ (5%) a 37°C e 96% de humidade relativa. Para o sub-cultivo das células ou suas colheitas para uso nos experimentos, estas foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4), centrifugadas (1000 rpm, 5 min), com posterior separação da suspensão celular por pressão em seringa (agulha 0,4×19, Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brasil) e finalmente encubadas em novo meio de cultivo completo (DMEM, 15% SBF, 1% penicilina e estreptomicina).

3.3.2 Tratamento das células

3.3.2.1 Teste de viabilidade celular

Nos experimentos de viabilidade celular, as células HepG2 foram tratadas com as seguintes concentrações de QC, BIX e NOR: 0,1; 1,0; 5,0; 10; 50,0; 100,0 e 200,0 µM e com as concentrações de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 µM de HgCl₂ e MeHg. As células foram cultivadas por 24 horas em meio completo, lavadas duas vezes com PBS e reincubadas em meio sem soro por mais 24 horas com as respectivas concentrações de QC, BIX, NOR, HgCl₂ ou MeHg. De acordo com os resultados obtidos no teste de viabilidade celular, as menores concentrações não citotóxicas,

tanto para os FQ como para compostos de Hg, foram escolhidas para a realização dos ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade.

3.3.2.2 Avaliação da genotoxicidade dos compostos

Nos experimentos que visaram determinar as propriedades genotóxicas dos compostos de Hg (HgCl_2 e MeHg) bem como dos FQ utilizados no presente estudo (QC, BIX e NOR), as células foram cultivadas em meio completo por 24 horas, lavadas duas vezes com PBS, reincubadas em meio sem soro e então expostas aos diferentes compostos químicos.

No caso do HgCl_2 e do MeHg, exposições com diversas concentrações dos metal (0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 μM) em diferentes tempos (1, 6, 24 e 48 horas) foram realizadas a fim de se estabelecer uma relação tempo e dose resposta. Para a avaliação da possível genotoxicidade da QC, BIX e NOR, foram utilizadas concentrações não citotóxicas dos FQ (0,1; 1,0 e 5,0 μM para QC e 0,1; 1,0 e 10,0 μM para BIX e NOR).

3.3.2.3 Avaliação da antigenotoxicidade do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos genéticos induzidos pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio

Com o intuito de estabelecer o provável mecanismo de proteção do flavonóide QC e dos carotenóides BIX e NOR foram realizados três esquemas de tratamentos: pré, simultâneo e pós tratamento em relação ao HgCl_2 e MeHg. O tempo de exposição e a concentração utilizada dos compostos de Hg para os ensaios de antigenotoxicidade foram escolhidos de acordo com os resultados obtidos no ensaio de genotoxicidade, ou seja, 24 horas de exposição ao HgCl_2 e MeHg (1,0 μM para ambos), pois onde foi evidenciado maiores danos no DNA. Desta maneira, os tratamentos foram esquematizados da seguinte forma:

- Pré-tratamento: As células foram cultivadas previamente em meio completo por 24 horas, lavadas duas vezes com PBS e reincubadas por mais 24 horas em meio sem soro juntamente com as diferentes concentrações de QC, BIX ou NOR. Após, as células foram lavadas novamente com PBS (duas vezes) e reincubadas em meio sem soro juntamente com o HgCl_2 ou com o MeHg por mais 24 horas.
- Tratamento simultâneo: As células foram cultivadas previamente em meio completo por 24 horas, lavadas duas vezes com PBS e reincubadas simultaneamente com HgCl_2 ou MeHg e as diferentes concentrações do flavonóide e dos carotenóides por mais 24 horas.
- Pós-tratamento: As células HepG2 foram cultivadas previamente em meio completo por 24 horas, lavadas duas vezes com PBS e reincubadas por 24 horas em meio sem soro juntamente com HgCl_2 ou MeHg. Após, as células foram lavadas novamente com PBS (duas vezes) e reincubadas em meio sem soro contendo as diferentes concentrações de QC, BIX ou NOR por mais 24 horas.

Imediatamente após os tratamentos acima descritos procedeu-se a colheita das células para a realização dos ensaios de antigenotoxicidade.

3.3.2.4 Determinação dos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox celular

Experimentos adicionais, os quais visaram determinar vários parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox da célula foram conduzidos e são eles: determinação das concentrações intracelulares de GSH, MDA, proteínas carboniladas (PCO) e EROs. Para tanto, foram escolhidas as concentrações antigenotóxicas mais eficazes do flavonóide e dos carotenóides (5,0 μM para QC e 10,0 μM para BIX e NOR). As células foram cultivadas em meio completo pelo período de 24 horas, lavadas duas vezes com PBS, reincubadas em meio sem soro e expostos aos compostos de Hg associados com o flavonóide ou com os carotenóides por mais 24 horas.

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos, após os tratamentos, foram obtidos lisados celulares por meio da adição de uma solução de dodecil sulfato de sódio a 0,1% (em PBS, pH 7,4) com subsequente homogeneização (30 rpm, homogeneizador Fanem, São Paulo, SP, Brasil). Após, as suspensões celulares foram incubadas a -4°C por 30 minutos, centrifugadas a 1500 rpm pelo período de 10 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para os respectivos ensaios.

Em todos os testes realizados no presente estudo, tratamentos dos respectivos controles (solventes) de todos os compostos foram conduzidos em paralelo.

3.3.3 Ensaio do Cometa

Os ensaios do cometa foram conduzidos de acordo com o protocolo proposto por Uhl, Helma e Knasmüller (1999). Após os diversos tratamentos celulares, aproximadamente 5×10^4 células foram transferidas em lâminas com agarose, as quais foram transferidas após a lise para uma cuba de eletroforese com tampão (300 mM NaOH and 1.0 mM EDTA, pH>13). A eletroforese foi conduzida sob condições padrões (25 V; 300 mA; 1,25 V/cm) pelo período de 20 minutos; subsequentemente, as lâminas foram neutralizadas, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio (0,2 mg/mL) e analisadas com microscópio de fluorescência (Nikon, Japan) com uma ampliação de 40x. Para cada tratamento, duas lâminas foram feitas e 50 nucleóides foram analisados por lâmina. Para a análise, foi utilizado o programa *Comet Assay IV^{TM}* (Perceptive Instruments, Haverhill, Inglaterra) e a porcentagem de DNA na cauda foi usada como parâmetro do dano do material genético. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os *guidelines* para o ensaio do cometa propostos por Tice *et al.* (2000).

3.3.4 Determinação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

DNA genômico foi extraído das células tratadas pelo kit PureGene de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O DNA extraído foi dissolvido em 300 µL de citrato de sódio (20mM) e depois incubado a 98° C por 5 minutos; após isso, foi imediatamente colocado em freezer a -20° C por 5 minutos para evitar sua renaturação. Depois, foi adicionado 6 µL de nuclease P1 (10 unidades) e 5 µL de fosfatase alcalina (0,5 unidade) e a solução foi incubada por 90 minutos a 37° C para digestão do DNA pelas enzimas. O DNA digerido foi armazenado em freezer -20° C para futuros ensaios. As concentrações de 8-OHdG em HepG2 foram calculadas por HPLC-ECD, como descrito por Helbock *et al.*, 1998. 100 mM de ácido acético e metanol a 5% foram usados como fase móvel com um fluxo de 0.8 mL/min. Além disso, as concentrações de deoxiguanosina (dG) foram determinadas por HPLC-UV (252 nm). O tempo de retenção para 8-OHdG foi de 18,5 min. com um sinal significativamente maior que o ruído. A quantidade de 8-OHdG foi determinado de acordo com a área do pico utilizando curva de regressão linear com soluções padrões de 8-OHdG de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 50 ng/mL. Os dados foram expressos em número de 8-OHdG/10⁶ dG.

3.3.5 Determinação de tióis totais intracelulares

Concentrações de tióis totais (adotados no presente estudo como GSH) foram determinadas por meio da adição de DTNB, como descrito por Ellman (1959). DTNB reage com tióis livres para formar dissulfitos e ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e este ultimo produto pode ser quantificado espectrofotometricamente (Shimadzu, Chelmsford, EUA) a 412 nm. Os resultados estão expressos em µmol de GSH/mg de proteína. O conteúdo de proteína nas células foi determinado usando o padrão de albumina de soro bovino, segundo método proposto por Bradford (1976).

3.3.6 Quantificação de malondialdeído intracelular

MDA foi quantificado no citosol de acordo com o protocolo proposto por Tatum, Changchit e Chow (1990). MDA reage com ácido tiobarbitúrico e a separação inicial do complexo TBA-MDA foi realizada por extração com isobutanol. Já a eliminação e separação dos interferentes foram realizadas com o uso de um HPLC (Shimadzu, Kioto, Japão), nas seguintes condições: fase móvel - solução 1:1 (v/v) de metanol e água com 0,05% (m/v) de tetrabutilamônio dihidrogênio fosfato, coluna c-18 de fase reversa (Shimadzu. Coluna ODS, 5µm, 4.6 x 250 mm), com fluxo de 1,0 mL/min e tempo de retenção de 4,9 minutos. MDA foi quantificado com um detector fluorescente acoplado ao HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) ajustado em 515 nm de excitação e 550 nm de emissão. Os resultados estão expressos em µmol de MDA/mg de proteína. O conteúdo de proteína nas células foi determinado usando o padrão de albumina de soro bovino, segundo método proposto por Bradford (1976).

3.3.7 Determinação de proteínas carboniladas intracelulares

Determinações das concentrações de PCO foram realizadas de acordo com o protocolo proposto por Levine *et al.* (1994). 2,4-dinitrofenilhidrazona reage com PCO para formar um complexo hidrozona-proteína. PCO foi determinada espectrofotometricamente a 360 nm (Shimadzu, Chelmsford, EUA) utilizando o coeficiente de absorção molar de $2,1 \times 10^4$ M/cm para hidrozonas. Proteínas foram quantificadas anteriormente à reação de acordo com Bradford (1976) e os resultados estão expressos como µg de PCO/mg de proteínas.

3.3.8 Determinação de espécies reativas do oxigênio intracelulares

Concentrações intracelulares de EROs foram estimadas utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (WANG; JOSEPH, 1999).

Este composto difunde-se através das membranas celulares e é enzimaticamente hidrolizado por esterases intracelulares e desta maneira é formado uma molécula não fluorescente, diclorohidrofluoresceína (H_2DCF), a qual é oxidada por EROs, tornando-a fluorescente, diclorofluoresceína (DCF). A intensidade fluorimétrica da DFC é proporcional à produção intracelular de EROs e foi monitorada com o uso de um fluorímetro (Tecan, Männedorf, Suíça; excitação 485 nm, emissão 538 nm). Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (intensidade de fluorescência).

3.4 Estudos *in vivo*

3.4.1 Ratos da linhagem Wistar

Os experimentos foram conduzidos em ratos machos Wistar, pesando em média 200 ± 20 g de peso de massa corpórea, provenientes do Biotério Central da Coordenadoria do Campus Administrativo de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em grupos de dois animais em caixas de polietileno com tampa grade sob ciclos de 12 horas claro/escuro em sala climatizada ($22 - 25^\circ C$) e tiveram livre acesso a água e comida (ração padrão para ratos, Guabi, Campinas, SP, Brasil). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Protocolo nº 09.1.457.53.1).

3.4.1.1 Tratamento dos animais

O delineamento do trabalho seguiu as metodologias otimizadas e usualmente utilizadas por nosso grupo (GROTTO *et al.*, 2009a, GROTTO *et al.*, 2009b). Os animais foram distribuídos em grupos de seis para cada tratamento e receberam o MeHg, o flavonóide QC, os carotenóides BIX e NOR, bem como suas associações, MeHg + QC, MeHg + BIX e MeHg + NOR, via gavagem, uma vez ao dia pelo

período de 45 dias.

A dose de MeHg (30,0 µg/kg pc) a qual os animais foram expostos foi escolhida com base no trabalho de Passos *et al.* (2007), no qual foi estimada a exposição diária de populações ribeirinhas ambientalmente expostas ao metal na região amazônica, via consumo de peixes contaminados. As concentrações do flavonóide QC (0,5; 5,0 e 50,0 mg/kg pc) e dos carotenóides BIX (0,1; 1,0 e 10,0 mg/kg pc) e NOR (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg/pc) foram escolhidos de acordo com dados presentes na literatura e por meio das estimativas da ingestão diária de estudos populacionais e dados de experimentos prévios (JECFA, 1982, FORMICA; REGELSON, 1995, LAMSON; BRIGNALL, 2000, AGNER *et al.*, 2004, AGNER *et al.*, 2005, TIEPPO *et al.*, 2007).

Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos adversos e/ou protetores após as exposições ao flavonóide, aos carotenóides e ao Hg, seja por si só ou por meio de suas associações, os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo I: Controle negativo;
- Grupo II: MeHg (30 µg/kg pc);
- Grupo III: QC I (0,5 mg/kg pc), BIX I (0,1 mg/kg pc) ou NOR I (0,01 mg/kg pc);
- Grupo IV: QC II (5,0 mg/kg pc), BIX II (1,0 mg/kg pc) ou NOR II (0,1 mg/kg pc);
- Grupo V: QC III (50,0 mg/kg pc), BIX III (10,0 mg/kg pc) ou NOR III (1,0 mg/kg pc);
- Grupo VI: QC I, BIX ou NOR I + MeHg;
- Grupo VII: QC II, BIX II ou NOR III + MeHg;
- Grupo VIII: QC III, BIX III ou NOR III + MeHg;

Após os 45 dias de tratamentos, os animais foram sacrificados por overdose dos anestésicos quetamina e xilazina (300,0 e 30,0 mg/kg pc, respectivamente). Subsequentemente, foi coletado o sangue por decapitação, o qual foi utilizado para o ensaio do cometa, quantificação de parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox do animal e quantificação das concentrações de Hg total. Além do sangue, também foi coletado parte do fígado dos animais para a realização do ensaio do cometa e determinação das concentrações de Hg neste tecido.

3.4.2 Ensaio do cometa em leucócitos e hepatócitos de ratos

O sangue total dos animais foi utilizado para a avaliação de dano no material genético em leucócitos como proposto por da Silva e colaboradores (2000). Para o ensaio do cometa no tecido hepático, os núcleos dos hepatócitos foram isolados por homogeneização com um Potter-Elvehjem (Krackeler Scientific Inc., Albany, EUA) e posterior centrifugação (SEKIHASHI *et al.*, 2002).

Os ensaios do cometa foram conduzidos de acordo com o protocolo proposto por Singh *et al.* (1988). Após o processamento das amostras dos diversos tratamentos dos animais, 20 µL de sangue total ou da suspensão dos núcleos dos hepatócitos foram transferidos em lâminas com agarose, as quais foram transferidas após a lise para uma cuba de eletroforese com tampão (300 mM NaOH and 1.0 mM EDTA, pH>13). A eletroforese foi conduzida sob condições padrões (25 V; 300 mA; 1.25 V/cm) pelo período de 20 minutos, subsequentemente, as lâminas foram neutralizadas, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio (0,2 mg/mL) e analisadas com microscópio de fluorescência (Nikon, Japan) com uma ampliação de 40x. Para cada tratamento, duas lâminas foram feitas e 50 nucleóides foram analisados por lâmina. Para a análise, foi utilizado o programa *Comet Assay IV^{TM}* (Perceptive Instruments, Haverhill, Inglaterra) e a porcentagem de DNA na cauda foi usada como parâmetro do dano do DNA. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os *guidelines* para o ensaio do cometa proposto por Hartmann *et al.* (2003).

3.4.3 Determinação de tióis totais sanguíneos

Concentrações de tióis totais (adotados no presente estudo como GSH) foram determinadas por meio da adição de DTNB, como descrito por Ellman (1959). DTNB reage com tióis livres para formar dissulfitos e ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e este ultimo produto pode ser quantificado espectrofotometricamente (Shimadzu, Chelmsford, EUA) a 412 nm. Os resultados estão expressos em µmol de GSH/mL

de sangue. O conteúdo de proteína nas células foi determinado usando o padrão de albumina de soro bovino, segundo método proposto por Bradford (1976).

3.4.4 Determinação da atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase

A atividade da enzima GPx foi avaliada por espectrofotometria de UV/VIS como proposto por Paglia e Valentini (1967). O método se baseia na oxidação do NADPH a 25°C na presença de GSH reduzida, GSH redutase, azida sódica, H₂O₂ e sangue diluído, indicando o decaimento da atividade da enzima, monitorado a 340 nm. Por meio da medida do decaimento da absorbância do NADPH é possível determinar a atividade enzimática, já que esta é proporcional ao consumo de NADPH. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min/mL sangue.

3.4.5 Determinação da atividade da enzima antioxidante catalase

A atividade da enzima CAT foi avaliada por espectrofotometria de UV/VIS utilizando método de Aebi (1984). O método baseia-se na decomposição do H₂O₂ pela catalase ao longo do tempo, monitorado a 240 nm. Para tanto, uma alíquota de 20 µL de sangue total foi misturada com tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7, e 70 µL de H₂O₂ foi adicionado, dando início à reação. As mudanças na absorbância foram monitoradas por 5 min. Uma constante de variação^(κ), (relacionada com a hemoglobina (Hb)), serviu para expressar os valores da atividade no sangue (κ/gHb).

3.4.6 Determinação das concentrações de mercúrio total em sangue e fígado dos ratos

As determinações de Hg total em sangue e fígado dos animais foram conduzidas de acordo com Palmer *et al.* (2006) e Batista *et al.* (2009),

respectivamente, com o uso de um espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS; DRC II, Shelton, IL, EUA). Os resultados estão expressos em µg/L e µg/g.

3.5 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism*® 5 (La Jolla, CA, EUA). Os resultados obtidos estão expressos como média ± desvio padrão (DP) a partir de três experimentos independentes para os ensaios *in vitro* e a partir de seis animais por grupo para os ensaios *in vivo*. Os testes de ANOVA seguido pelo teste de Dunnett foram usados para a comparação das médias entre si ($p \leq 0,05$).

4 Resultados

4.1 Estudos *in vitro*

4.1.1 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos compostos de mercúrio

As Figuras 8a e 8b demonstram o impacto dos tratamentos com HgCl_2 e MeHg sobre a viabilidade das células HepG2, respectivamente. Pode ser observado que para ambos os compostos, concentrações de até $5,0 \mu\text{M}$ não exerceram nenhum efeito citotóxico; já na maior concentração testada ($10,0 \mu\text{M}$), a viabilidade celular foi reduzida para 56 e 48%, para os tratamentos com HgCl_2 e MeHg, respectivamente.

Figura 8 (a-b). Impacto dos tratamentos dos dois compostos de mercúrio (cloreto de mercúrio (a) e metilmercúrio (b)) sobre a viabilidade das células HepG2 determinadas pelo método de exclusão pelo azul de tripan, como descrito na seção Materiais e Métodos. Asteriscos indicam diferença estatística quando comparado com os respectivos grupos controles ($p \leq 0,05$, ANOVA e teste de Dunnett).

Com base nos dados obtidos após a realização dos ensaios de citotoxicidade, foram estabelecidas as concentrações utilizadas nos ensaios do cometa e determinações das concentrações de 8-OHdG (0,1; 1,0 e 5,0 μM para ambos os compostos).

As propriedades genotóxicas dos dois compostos de Hg foram determinadas após diferentes períodos de exposição, com o objetivo de definir as condições ideais para os experimentos que visavam avaliar os efeitos protetores dos FQ contra os danos no DNA causados pelo HgCl_2 e MeHg. Estes dados estão descritos na Tabela

1. Pode ser observado que ambos os compostos de Hg induziram a migração do DNA de forma dose-dependente. Os efeitos genotóxicos mais pronunciados foram obtidos após 24 horas de exposição aos compostos de mercúrio, por exemplo, as concentrações de 5,0 μM de HgCl_2 e MeHg aumentaram em cerca de seis e cinco vezes, respectivamente, a porcentagem de DNA na cauda avaliada por meio do ensaio do cometa. Além disso, é notável que a extensão do dano ao DNA fosse menos pronunciada após 48 horas de exposição quando comparada com 24 horas, para ambos os compostos. Entretanto, a diferença encontrada em ambos os casos não alcançou significância e deste modo, nenhuma conclusão definitiva pode ser proposta. A tabela também apresenta os resultados referentes às concentrações de 8-OHdG após a exposição aos compostos de Hg e, uma grande similaridade (dose-dependência) foi encontrada neste parâmetro, quando comparados aos ensaios do cometa. Deste modo, é possível afirmar que danos oxidativos às bases nitrogenadas do DNA são, pelo menos em parte, responsáveis pela indução na formação de cometas pelo metal.

Tabela 1 - Indução de migração no DNA e formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) em cultura de células HepG2 após a exposição ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) e ao metilmercúrio (MeHg).

Condições experimentais (doses em µM)	%DNA na cauda ^a (média ± DP)		8-OHdG ^b (média ± DP)	
	HgCl ₂	MeHg	HgCl ₂	MeHg
1 hora				
0,0	2,65 ± 0,65	2,65 ± 0,65	2,33 ± 0,58	2,33 ± 0,58
0,1	3,78 ± 2,0	4,33 ± 2,43	3,67 ± 1,53	3,0 ± 1,0
1,0	6,33 ± 1,5	7,67 ± 2,62	5,91 ± 2,65	5,67 ± 0,58*
5,0	9,45 ± 2,71*	12,33 ± 4,51*	8,33 ± 2,52*	9,67 ± 1,15*
6 horas				
0,0	2,06 ± 1,08	2,06 ± 1,08	3,41 ± 1,53	3,41 ± 1,53
0,1	4,0 ± 0,98	5,30 ± 1,55	6,67 ± 1,15	7,0 ± 1,0
1,0	8,0 ± 2,24*	8,33 ± 2,51*	8,02 ± 0,58*	8,67 ± 1,53*
5,0	8,97 ± 1,40*	12,0 ± 3,05*	10,33 ± 2,52*	11,87 ± 2,67*
24 horas				
0,0	3,01 ± 1,52	3,01 ± 1,52	2,67 ± 1,15	2,67 ± 1,15
0,1	7,63 ± 2,04	6,67 ± 1,50	5,0 ± 1,0	4,67 ± 1,53
1,0	14,67 ± 3,62*	16,44 ± 4,31*	9,67 ± 1,53*	10,33 ± 1,53*
5,0	15,06 ± 2,92*	17,01 ± 3,66*	12,67 ± 1,53*	11,0 ± 1,43*
48 horas				
0,0	2,33 ± 1,53	2,33 ± 1,53	4,0 ± 1,0	4,0 ± 1,0
0,1	5,07 ± 1,74	6,0 ± 2,54	7,67 ± 0,58*	6,33 ± 0,58
1,0	9,06 ± 3,37*	7,33 ± 2,33	9,33 ± 1,53*	11,0 ± 1,0*
5,0	9,77 ± 2,51*	10,67 ± 3,67*	10,31 ± 1,15*	9,67 ± 2,03*

Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos comparados com os respectivos controles ($p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Dunnett).

^aValores obtidos a partir da realização de três culturas por experimento. Por experimento, duas lâminas foram feitas e 50 nucleóides foram analisados por lâmina.

^bOs resultados indicam as concentrações de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina/10⁶ deoxiguanosinas. As determinações foram realizadas com três culturas em paralelo por experimento.

4.1.2 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina

4.1.2.1 Quercetina

A Figura 9a demonstra o impacto dos tratamentos com diversas concentrações de QC (0 – 200 μM) sobre a viabilidade de culturas de células HepG2. Pode ser observado que concentrações de até 5,0 μM não exerceram efeito citotóxico; entretanto, nas maiores concentrações testadas, 100,0 e 200,0 μM , o número de células viáveis foi reduzido para 45 e 31%, respectivamente. Deste modo, as três concentrações não citotóxicas encontradas para este flavonóide (0,1; 1,0 e 5,0 μM) foram escolhidas para a realização dos testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade.

A Figura 9b ilustra o impacto da QC sobre a estabilidade do DNA. Pode ser visto que, sob as mesmas condições que foram realizadas os testes de genotoxicidade com HgCl_2 e MeHg, nenhuma das concentrações testadas exerceu efeito deletério sobre o DNA, ou seja, não foi observada qualquer diferença estatística entre os grupos.

Figura 9 (a-b). Impacto dos tratamentos com o flavonóide quercetina (a) sobre a viabilidade celular e sobre a estabilidade do material genético (b) das células HepG2. Barras indicam média $\pm$ DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. A viabilidade celular e o dano ao DNA foram determinados por meio do método de exclusão pelo azul de tripan e ensaio do cometa, respectivamente, como descrito na seção Materiais e Métodos. Asteriscos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo controle ($p \leq 0,05$, ANOVA e teste de Dunnett).

4.1.2.2 Bixina e norbixina

As Figura 10a e 11a demonstram o impacto dos tratamentos com diversas concentrações dos carotenóides BIX e NOR (0–100 μ M) sobre a viabilidade celular das culturas de HepG2. Pode ser observado que concentrações de até 10,0 μ M não

exerceram nenhum efeito citotóxico tanto para o carotenóide BIX quanto para NOR; entretanto, na maior concentração testada (100 μM), o número de células viáveis foi reduzido para 32% após a exposição à BIX e 41% após o tratamento com NOR. Também foram realizadas avaliações da citotoxicidade com os carotenóides na concentração de 200 μM , porém esta concentração foi suficiente para causar um efeito tóxico total. Deste modo, três concentrações não citotóxicas encontradas de BIX e NOR (0,1; 1,0 e 10,0 μM) foram escolhidas para os testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade.

As Figuras 10b e 11b ilustram o impacto sobre a estabilidade do DNA destas concentrações de BIX e NOR, respectivamente. Ficou evidenciado que, sob as mesmas condições experimentais, nenhuma das concentrações testadas exerceu efeito deletério sobre o DNA, ou seja, não houve diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles.

Figura 10 (a-b). Impacto dos tratamentos do carotenóide bixina sobre a viabilidade celular (a) e sobre a estabilidade do material genético (b) de culturas de células HepG2. Barras indicam média $\pm$ DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. A viabilidade celular e o dano ao DNA foram determinados por meio do método de exclusão pelo azul de tripan e ensaio do cometa, respectivamente, como descrito na seção Materiais e Métodos. Asteriscos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo controle ($p \leq 0,05$, ANOVA e teste de Dunnett).

Figura 11 (a-b). Impacto dos tratamentos do carotenóide norbixina sobre a viabilidade celular (a) e sobre a estabilidade do material genético (b) de culturas de células HepG2. Barras indicam média $\pm$ DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. A viabilidade celular e o dano ao DNA foram determinados por meio do método de exclusão pelo azul de tripan e ensaio do cometa, respectivamente, como descrito na seção Materiais e Métodos. Asteriscos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo controle ($p \leq 0,05$, ANOVA e teste de Dunnett).

4.1.3 Avaliação dos efeitos protetores do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos oxidativos causados pelos compostos de mercúrio

4.1.3.1 Avaliação dos efeitos antigenotóxicos e antioxidantes do flavonóide quercetina

4.1.3.1.1 Antigenotoxicidade

Os resultados dos experimentos que visaram avaliar os efeitos protetores da QC sobre a indução de dano no material genético causado pelos dois compostos de Hg estão representados nas Figuras 12c e 12d. Pode ser observado que o maior efeito protetor do flavonóide contra os danos no DNA causados tanto pelo HgCl_2 como pelo MeHg foram evidenciados após pré e tratamento simultâneo, ou seja, quando o flavonóide foi exposto antes ou ao mesmo tempo em que os compostos de Hg. Por exemplo, a extensão do dano causada após a exposição ao Hg orgânico foi reduzida pelo flavonóide, na maior concentração testada, em cerca de 50% em pré-tratamento e em aproximadamente 70% após tratamento simultâneo. Por outro lado, não foi evidenciada proteção significativa quando o flavonóide foi adicionado nas culturas após o tratamento com o metal.

Os resultados ainda demonstram que após a associação do HgCl_2 com o flavonóide, a proteção exercida pela QC foi muito similar à encontrada nos experimentos com MeHg, ou seja, ficou evidenciado que a QC exerceu proteção significativa somente nos protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo. Entretanto, é notável que as reduções na formação dos cometas foram, neste caso, menos pronunciadas.

A fim de excluir quaisquer associações entre possíveis efeitos citotóxicos exercidos pelos compostos nos diversos tratamentos e protocolos experimentais empregados no ensaio do cometa e os resultados aqui observados, uma vez que a morte celular pode levar a fragmentação do material genético, foram realizados, em paralelo e sob as mesmas condições experimentais, avaliações do impacto da

exposição das células ao flavonóide, aos compostos de mercúrio e suas associações sobre a viabilidade celular e não foi observado nenhum efeito adverso às células, como demonstrado nas Figuras 12a e 12b.

Figura 12 (a-d). Viabilidade celular (a, b) e indução de formação de cometa (c, d) em células HepG2 após os tratamentos com o flavonóide quercetina (QC) e cloreto de mercúrio (HgCl₂) ou metilmercúrio (MeHg). As células foram expostas aos compostos de mercúrio pelo período de 24 horas. QC foi adicionada por 24 horas antes, durante ou após os tratamentos com os compostos de mercúrio. Símbolos: □ - controle; ■ - HgCl₂ (1,0 µM); ▨ - MeHg (1,0 µM); ▩ - HgCl₂ + QC 1 (0,1 µM); ▪ - HgCl₂ + QC 2 (1,0 µM); ▤ - MeHg + QC 1 (0,1 µM); ▥ - MeHg + QC 2 (1,0 µM). Barras indicam média ± DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. A viabilidade celular e o dano ao DNA foram determinados por meio do método de exclusão pelo azul de tripan e ensaio do cometa, respectivamente, como descrito na seção Materiais e Métodos. Asteriscos indicam diferença estatística entre as culturas celulares tratadas com o metal e as culturas celulares tratadas com o metal em adição do flavonóide (p ≤ 0.05. ANOVA e teste de Dunnett).

4.1.3.1.2 Impacto sobre os parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células após a exposição ao flavonóide, aos compostos de mercúrio e às suas associações

A Figura 13 (a-d) ilustra os resultados de experimentos adicionais, nos quais vários parâmetros relacionados ao estado redox das células, denominados GSH, MDA, PCO e EROs intracelulares, foram monitorados após o tratamento das células com os compostos de Hg na presença e na ausência da QC.

Pode ser observado na Figura 13a que ambos os compostos de Hg causaram uma significativa redução das concentrações de GSH, enquanto que nenhum efeito significativo foi visto após a exposição das células ao flavonóide. Após a exposição simultânea das células ao Hg e a QC, as concentrações de GSH foram revertidas completamente, ou seja, o flavonóide foi capaz de minimizar os efeitos deletérios causados pelos dois compostos de Hg, restabelecendo as concentrações de GSH àquelas encontradas no respectivo controle negativo.

O impacto do HgCl_2 e do MeHg sobre as concentrações de MDA está apresentado na Figura 13b. A exposição das células ao HgCl_2 e ao MeHg resultou em um aumento significativo na formação de MDA, o qual foi atenuado após a suplementação das células com o flavonóide.

Do mesmo modo, como observado com as concentrações de MDA, ambos os compostos de Hg levaram a aumentos significativos nas concentrações de PCO e EROs intracelulares (Figuras 13c e 13d). Entretanto, suas concentrações foram revertidos àqueles encontrados aos seus respectivos controles negativos após o tratamento com o flavonóide. Além disso, assim como observado na Figura 13a, os tratamentos com QC por si, não foram capazes de causar quaisquer tipos de alterações bioquímicas, ou seja, as concentrações de MDA, PCO e EROs encontradas nestes tratamentos não diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles negativos.

Figura 13 (a-d). Impacto da exposição de células HepG2 ao cloreto de mercúrio (HgCl_2), metilmercúrio (MeHg) e ao flavonóide quercetina (QC). As culturas foram expostas aos compostos de mercúrio ($1,0 \mu\text{M}$) na presença ou na ausência do flavonóide ($5,0 \mu\text{M}$) pelo período de 24 horas. Subsequentemente, diversos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células foram monitorados: glutathiona (GSH) (a), malondialdeído (MDA) (b), proteínas carboniladas (PCO) (c) e espécies reativas do oxigênio (EROs) intracelulares (d), como descrito na seção Material e Métodos. Barras representam médias $\pm$ DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos tratados com os diversos compostos e seus respectivos controles negativos ($p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Dunnett).

4.1.3.2 Avaliação dos efeitos antigenotóxicos e antioxidantes dos carotenóides bixina e norbixina

4.1.3.2.1 Antigenotoxicidade

Os resultados dos experimentos que visaram avaliar os efeitos protetores dos carotenóides BIX e NOR sobre a indução de dano no material genético induzida pelos dois compostos de Hg estão representados nas Figuras 14 e 15 (c e d). Como observado para o flavonóide QC, aqui também ficou evidenciado que o maior efeito protetor dos carotenóides contra os danos no DNA causados tanto pelo HgCl_2 como pelo MeHg foi observado após pré e tratamento simultâneo, ou seja, quando os carotenóides foram adicionados antes ou simultaneamente ao HgCl_2 ou ao MeHg. BIX, nas concentrações intermediária e alta (1,0 e 10,0 μM , respectivamente) foi capaz de reduzir os danos induzidos pelo HgCl_2 no material genético, nos protocolos de pré e tratamento simultâneo. Quando o indutor de danos no DNA foi o MeHg, somente a concentração intermediária do carotenóide BIX foi capaz de reduzir a extensão de dano no material genético em pré-tratamento, enquanto as duas concentrações mais elevadas (1,0 e 10,0 μM) foram capazes de exercer efeito protetor no esquema de tratamento simultâneo.

Nenhuma das concentrações avaliadas do carotenóide BIX foi capaz de exercer efeito protetor significativo no esquema de pós-tratamento, uma vez que os resultados foram estatisticamente semelhantes àqueles observados nas células tratadas somente com HgCl_2 ou com MeHg.

Os resultados obtidos por meio do ensaio do cometa, após a associação do HgCl_2 ou MeHg com carotenóide NOR, foram muito similares aos encontrados com BIX. Entretanto, a principal diferença nestes experimentos foi que todas as concentrações avaliadas de NOR foram capazes de reduzir de maneira significativa a migração do DNA nas células, quando associada ao MeHg no esquema de pré-tratamento. Somente a maior concentração de NOR exerceu efeito protetor quando o carotenóide foi adicionado simultaneamente ao MeHg e nenhum efeito significativo foi observado nos esquemas de pós-tratamento.

Como realizado nos experimentos que visaram avaliar os efeitos protetores do flavonóide QC sobre a instabilidade genética induzida pelos compostos de Hg, a fim de excluir quaisquer associações entre possíveis efeitos citotóxicos decorrentes dos diversos protocolos de tratamento empregados e os resultados observados nos ensaios de antigenotoxicidade, foram realizados, em paralelo e sob as mesmas condições experimentais, avaliações dos possíveis efeitos deletérios destes compostos sobre a viabilidade celular e como era esperado, nenhuma das concentrações empregadas em todas as condições experimentais exerceu efeito citotóxico, como demonstrado nas Figuras 14 e 15 (a e b).

Figura 14 (a-d). Viabilidade celular (a, b) e indução de formação de cometa (c, d) em células HepG2 após os tratamentos com o carotenóide bixina (BIX) e cloreto de mercúrio (HgCl₂) ou metilmercúrio (MeHg). As células foram expostas aos compostos de mercúrio pelo período de 24 horas. BIX foi adicionada por 24 horas antes, durante ou após os tratamentos com os compostos de mercúrio. Símbolos: □ - controle; ■ - HgCl₂ (1,0 μM); ▨ - MeHg (1,0 μM); ▤ - HgCl₂ + BIX 1 (0,1 μM); ▥ - HgCl₂ + BIX 2 (1,0 μM); ▦ - HgCl₂ + BIX 3 (10,0 μM); ▧ - MeHg + BIX 1; ▨ - MeHg + BIX 2 e ▩ - MeHg + BIX 3. Barras indicam média ± DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. A viabilidade celular e o dano ao DNA foram determinados por meio do método de exclusão pelo azul de tripan e ensaio do cometa, respectivamente, como descrito na seção Materiais e Métodos. Asteriscos indicam diferença estatística entre as culturas celulares tratadas com o metal e as culturas celulares tratadas com o metal em adição do carotenóide (p ≤ 0,05, ANOVA e teste de Dunnett).

Figura 15 (a-d). Viabilidade celular (a, b) e indução de formação de cometa (c, d) em células HepG2 após os tratamentos com o carotenóide norbixina (NOR) e cloreto de mercúrio (HgCl₂) ou metilmercúrio (MeHg). As células foram expostas aos compostos de mercúrio pelo período de 24 horas. NOR foi adicionada por 24 horas antes, durante ou após os tratamentos com os compostos de mercúrio. Símbolos: □ - controle; ■ - HgCl₂ (1,0 µM); ▨ - MeHg (1,0 µM); ▩ - HgCl₂ + NOR 1 (0,1 µM); ▪ - HgCl₂ + NOR 2 (1,0 µM); ▫ - HgCl₂ + NOR 3 (10,0 µM); ▬ - MeHg + NOR 1; ▭ - MeHg + NOR 2 e ▮ - MeHg + NOR 3. Barras indicam média ± DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. A viabilidade celular e o dano ao DNA foram determinados por meio do método de exclusão pelo azul de tripan e ensaio do cometa, respectivamente, como descrito na seção Materiais e Métodos. Asteriscos indicam diferença estatística entre as culturas celulares tratadas com o metal e as culturas celulares tratadas com o metal em adição do carotenóide (p ≤ 0,05, ANOVA e teste de Dunnett).

4.1.3.2.2 Impacto sobre os parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células após a exposição aos carotenóides, aos compostos de mercúrio e às suas associações

A Figura 16 e 17 (a-d) apresenta os resultados de experimentos adicionais, nos quais vários parâmetros relacionados ao estado redox da célula (GSH, MDA, PCO e EROs intracelulares) foram monitorados após o tratamento das células com os compostos de Hg na presença e na ausência dos carotenóides BIX ou NOR.

Pode ser observado nas Figuras 16a e 17a que ambos os compostos de Hg causaram uma significativa redução das concentrações celulares de GSH, enquanto que nenhum efeito significativo foi visto após a exposição das células aos carotenóides. Já após o tratamento simultâneo das células com o HgCl_2 ou com o MeHg e com BIX ou NOR, as concentrações de GSH foram revertidas completamente, ou seja, os carotenóides foram capazes de restabelecer as concentrações de GSH àquelas expressas no controle negativo.

O impacto do metal e dos carotenóides sobre as concentrações de MDA em células HepG2 está apresentado nas Figuras 16b e 17b. A exposição das células aos compostos de Hg resultou em um significativo aumento na formação de MDA, o qual foi atenuado após a suplementação das culturas com os carotenóides. Assim como observado nos ensaios que visavam avaliar o impacto dos compostos de Hg e dos carotenóides sobre a peroxidação lipídica das células, tanto o HgCl_2 quanto o MeHg elevaram, de maneira significativa, as concentrações de PCO (Figuras 16c e 17c) e EROs intracelulares (Figuras 16d e 17d), as quais foram revertidas completamente após a exposição aos carotenóides. Além disso, assim como observado nas Figuras 16a e 17a, tratamentos com BIX ou NOR, por si, não foram capazes de causar quaisquer tipos de alterações bioquímicas, ou seja, as concentrações de MDA, PCO e EROs intracelulares encontradas nestes tratamentos não diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles negativos.

Figura 16 (a-d). Impacto da exposição de células HepG2 ao cloreto de mercúrio (HgCl_2), metilmercúrio (MeHg) e ao carotenóide bixina (BIX). As culturas foram expostas aos compostos de mercúrio ($1,0 \mu\text{M}$) na presença ou na ausência do flavonóide ($5,0 \mu\text{M}$) pelo período de 24 horas. Subsequentemente, diversos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células foram monitorados: glutathiona (GSH) (a), malondialdeído (MDA) (b), proteínas carboniladas (PCO) (c) e espécies reativas do oxigênio (EROs) intracelulares (d), como descrito na seção Material e Métodos. Barras representam médias $\pm$ DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos tratados com os diversos compostos e seus respectivos controles negativos ($p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Dunnett).

Figura 17 (a-d). Impacto da exposição de células HepG2 ao cloreto de mercúrio (HgCl_2), metilmercúrio (MeHg) e ao carotenóide norbixina (NOR). As culturas foram expostas aos compostos de mercúrio (1,0 μM) na presença ou na ausência do flavonóide (5,0 μM) pelo período de 24 horas. Subsequentemente, diversos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células foram monitorados: glutathiona (GSH) (a), malondialdeído (MDA) (b), proteínas carboniladas (PCO) (c) e espécies reativas do oxigênio (EROs) intracelulares (d), como descrito na seção Material e Métodos. Barras representam medias $\pm$ DP dos resultados de três culturas realizadas em paralelo. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos tratados com os diversos compostos e seus respectivos controles negativos ($p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Dunnett).

4.2 Estudos *in vivo*

4.2.1 Flavonóide quercetina

4.2.1.1 Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, quercetina e suas associações sobre as concentrações de mercúrio total no fígado e sangue de ratos Wistar

O tratamento dos animais com MeHg resultou em um claro aumento das concentrações de Hg total no sangue e no fígado dos animais. Pode ser visto, na Tabela 2, que as concentrações de Hg no sangue foram maiores que àquelas encontradas no fígado; além disso, é notável que o co-tratamento dos animais com o flavonóide não exerceu impacto sobre as concentrações do metal, ou seja, QC não alterou a absorção e distribuição deste metal.

Tabela 2 - Determinação das concentrações de mercúrio total (Hg) em sangue e fígado de ratos Wistar. Seis animais por grupo foram tratados diariamente por gavagem com os diferentes compostos pelo período de 45 dias.

Grupos ¹	Hg em sangue (µg/L) (Média ± DP)	Hg em fígado (µg/g) (Média ± DP)
Controle (DMSO 1%)	0,00 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
MeHg (30,0 µg/kg pc)	11,21 ± 2,67 ^b	0,48 ± 0,08 ^b
QC 1 (0,5 mg/kg pc)	0,00 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
QC 2 (5,0 mg/kg pc)	0,00 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
QC 3 (50,0 mg/kg pc)	0,00 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
MeHg + QC 1	12,01 ± 3,76 ^b	0,51 ± 0,11 ^b
MeHg + QC 2	12,57 ± 3,21 ^b	0,50 ± 0,15 ^b
MeHg + QC 3	10,51 ± 2,67 ^b	0,49 ± 0,13 ^b

¹Quantidades entre parênteses indicam as doses diárias. QC foi dissolvida em DMSO a 1% e MeHg foi dissolvido em água destilada.

Letras iguais não se diferem estatisticamente entre si (ANOVA e teste de Dunnett; $p \leq 0,05$).

4.2.1.2 Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, quercetina e suas associações sobre a estabilidade do material genético, avaliada por meio do ensaio do cometa

Os resultados dos experimentos que visaram a avaliação dos efeitos do MeHg, do flavonóide QC, bem como de suas associações sobre a estabilidade do DNA estão apresentados nas Figuras 18a e 18b.

Figura 18 (a-b). Impacto da quercetina (QC), do metilmercúrio (MeHg) e de suas associações sobre a indução de formação de cometas em leucócitos do sangue periférico (a) e hepatócitos (b) de ratos Wistar. Os animais (seis por grupo) foram tratados por gavagem com MeHg (30 $\mu\text{g/kg pc}$), com diferentes concentrações do flavonóide (QC 1: 0,5; QC 2: 5,0 e QC 3: 50,0 mg/kg pc) e com combinações do MeHg com a QC por um período de 45 dias. Barras representam médias $\pm$ DP. Asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo tratado com MeHg e os grupos tratados com o metal em presença do flavonóide QC; não existe diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados somente com as diferentes concentrações de QC ($p > 0,05$; ANOVA e teste de Dunnett).

O tratamento dos animais com MeHg aumentou em cerca de seis vezes o padrão de migração no DNA, em leucócitos do sangue periférico e em hepatócitos dos animais, quando comparados aos seus respectivos controles. QC, por si só, entre as doses de 0,5 e 50,0 mg/kg pc, não apresentou qualquer efeito genotóxico nos biomarcadores utilizados no presente estudo.

Quando o flavonóide foi administrado aos ratos juntamente com o metal, a formação dos cometas foi reduzida em uma maneira dose-dependente; por exemplo, a porcentagem de redução foi de cerca de 65 e 54% na maior (50,0 mg/kg pc) e intermediária (5,0 mg/kg pc) dose testada, respectivamente. Na menor dose testada (0,5 mg/kg pc), apesar de ter sido encontrada uma porcentagem de redução, esta não foi suficiente para alcançar significância estatística. Do mesmo modo, em leucócitos do sangue periférico, resultados semelhantes foram observados, ou seja, as maiores concentrações do flavonóide testadas (5,0 e 50,0 mg/kg pc) foram capazes de reduzir de maneira significativa os danos no material genético causados pela exposição ao MeHg.

4.2.1.3 Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, quercetina e suas associações sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox dos animais

A Tabela 3 sumariza os resultados de experimentos adicionais, nos quais parâmetros bioquímicos associados com o estado redox dos animais (concentrações de GSH e atividades das enzimas GPx e CAT em sangue total) foram monitorados após o tratamento dos animais com as diferentes concentrações de QC (0,5; 5,0 e 50,0 mg/kg pc), MeHg (30 µg/kg pc) e suas associações.

Pode ser observado que os tratamentos com o flavonóide não exerceram quaisquer influências sobre a atividade da enzima CAT, enquanto que efeitos positivos foram encontrados em relação à GSH e GPx após o tratamento dos animais com QC, ou seja, as concentrações de GSH foram aumentadas em cerca de 15% e a atividade da enzima GPx sofreu um aumento de 34% na maior dose testada, quando comparada ao controle negativo. Por outro lado, a exposição dos animais ao metal levou a claros efeitos adversos, isto é, as concentrações de GSH e a atividade da enzima GPx foram reduzidas em 17% e 12%, respectivamente. Além

disso, redução na atividade da enzima CAT foi também observada, entretanto, esta não foi capaz de alcançar significado estatístico.

Tabela 3 - Atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) e concentrações de glutathiona (GSH) após os tratamentos com metilmercúrio (MeHg), quercetina (QC) e suas associações. Os animais (ratos Wistar; seis animais/grupo) foram tratados diariamente por meio de gavagem pelo período de 45 dias.

Grupos ¹	Atividade da CAT ²		Atividade da GPx ³		Concentrações de GSH ⁴	
	(média ± DP)	Δ (%)	(média ± DP)	Δ (%)	(média ± DP)	Δ (%)
Controle (DMSO 1%)	274,7 ± 98,1	100,0	33,2 ± 2,4	100,0	0,81 ± 0,05	100,0
MeHg (30 µg/kg pc)	201,9 ± 36,9	73,5	29,2 ± 5,0*	87,9	0,67 ± 0,07*	82,7
QC 1 (0,5 mg/kg pc)	290,1 ± 91,7	105,6	39,7 ± 3,2 [#]	119,5	0,74 ± 0,04	91,3
QC 2 (5,0 mg/kg pc)	277,1 ± 46,3	100,8	45,0 ± 3,4 [#]	135,5	0,98 ± 0,10 [#]	120,9
QC 3 (50,0 mg/kg pc)	283,9 ± 47,8	103,3	44,8 ± 5,4 [#]	134,9	0,94 ± 0,08 [#]	116,0
MeHg + QC 1	224,2 ± 52,6	81,6	35,3 ± 5,5 [#]	106,3	0,63 ± 0,09*	77,8
MeHg + QC 2	260,2 ± 37,3	94,7	37,4 ± 5,0 [#]	112,6	0,73 ± 0,05	90,1
MeHg + QC 3	248,2 ± 38,2	90,3	36,8 ± 6,9 [#]	110,8	0,76 ± 0,10 [#]	93,8

¹Quantidades entre parênteses indicam as doses diárias; ²k/gHb; ³mmol NADPH/gHb/min; ⁴µmol/mL eritrócitos. QC foi dissolvida em DMSO a 1% e MeHg foi dissolvido em água destilada.

*estatisticamente diferente do grupo controle; [#] estatisticamente diferente do grupo MeHg (p ≤ 0,05; ANOVA e teste de Dunnett).

4.2.2 Carotenóides bixina e norbixina

4.2.2.1 Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, bixina, norbixina e suas associações sobre as concentrações de mercúrio total no fígado e sangue de ratos Wistar

De maneira similar aos resultados apresentados anteriormente (tratamentos QC e MeHg), o tratamento dos animais com mercúrio causou um claro aumento das concentrações de Hg total no sangue e no fígado dos animais. Como podem ser observadas, na Tabela 4, as concentrações de Hg no sangue foram maiores que às encontradas no fígado; além disso, é notável que o co-tratamento dos animais com os carotenóides não exerceu impacto sobre as concentrações do metal, ou seja, os carotenóides BIX e NOR não alteram a absorção e distribuição do MeHg.

Tabela 4 - Determinação das concentrações de mercúrio total (Hg) em sangue e fígado de ratos Wistar. Seis animais por grupo foram tratados diariamente por gavagem com os diferentes compostos pelo período de 45 dias.

Grupos ¹	Hg em sangue (µg/L) (Média ± DP)	Hg em fígado (µg/g) (Média ± DP)
Control (water)	3,6 ± 1,7 ^a	0,00
MeHg (30 µg/kg pc)	1069,0 ± 220,3 ^b	0,07 ± 0,01 ^a
BIX 1 (0,1 µg/kg pc)	2,4 ± 1,7 ^a	0,00
BIX 2 (1,0 µg/kg pc)	6,8 ± 1,6 ^a	0,00
BIX 3 (10,0 µg/kg pc)	3,6 ± 0,6 ^a	0,00
NOR 1 (0,01 µg/kg pc)	2,2 ± 0,3 ^a	0,00
NOR 2 (0,1 µg/kg pc)	1,5 ± 0,3 ^a	0,00
NOR 3 (1,0 µg/kg pc)	1,0 ± 0,2 ^a	0,00
MeHg + BIX 1	1111,6 ± 298,4 ^b	0,06 ± 0,02 ^a
MeHg + BIX 2	1008,1 ± 112,8 ^b	0,05 ± 0,02 ^a
MeHg + BIX 3	918,2 ± 230,4 ^b	0,05 ± 0,02 ^a
MeHg + NOR 1	857,1 ± 139,3 ^b	0,06 ± 0,02 ^a
MeHg + NOR 2	859,5 ± 280,1 ^b	0,06 ± 0,02 ^a
MeHg + NOR 3	933,1 ± 147,9 ^b	0,05 ± 0,03 ^a

¹Quantidades entre parênteses indicam as doses diárias. BIX e NOR foram dissolvidas em DMSO a 1% e MeHg foi dissolvido em água destilada. Letras iguais não se diferem estatisticamente entre si (ANOVA e teste de Dunnett; $p \leq 0,05$).

4.2.2.2 Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, bixina, norbixina e suas associações sobre a estabilidade do material genético, avaliado por meio do ensaio do cometa

Os resultados dos experimentos que visaram a avaliação dos efeitos do MeHg, da BIX, NOR, bem como de suas associações sobre a estabilidade do DNA estão apresentados na Figuras 19 e 20 (a e b).

Figura 19 (a-b). Impacto da bixina (BIX), do metilmercúrio (MeHg) e de suas associações sobre a indução de dano no DNA em leucócitos do sangue periférico (a) e hepatócitos (b) de ratos Wistar. Os animais (seis por grupo) foram tratados por gavagem com MeHg (30 μ g/kg pc), diferentes concentrações do carotenóide (BIX 1:0,1; BIX 2: 1,0 e BIX 3: 10,0 mg/kg pc) e com combinações do MeHg com a BIX por um período de 45 dias. Barras representam médias $\pm$ DP. Asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo tratado com MeHg e os grupos tratados com o metal em presença do carotenóide; não existe diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados somente com as diferentes concentrações de BIX ($p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Dunnett).

Figura 20 (a-b). Impacto da norbixina (NOR), do metilmercúrio (MeHg) e de suas associações sobre a indução de dano no DNA em leucócitos do sangue periférico (a) e hepatócitos (b) de ratos Wistar. Os animais (seis por grupo) foram tratados por gavagem com MeHg (30 µg/kg pc), diferentes concentrações do carotenóide (NOR 1: 0,01; NOR 2: 0,1 e NOR 3: 1,0 mg/kg pc) e com combinações do MeHg com a NOR por um período de 45 dias. Barras representam médias ± DP. Asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo tratado com MeHg e os grupos tratados com o metal em presença do carotenóide ($p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Dunnett); não existe diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados somente com as diferentes concentrações de NOR.

A exposição dos animais ao MeHg causou um claro efeito genotóxico, ou seja, a extensão da migração do DNA em hepatócitos foi aumentada em cerca de quatro vezes quando comparada com o grupo controle (Figura 19b). Em leucócitos, esse efeito foi ainda mais pronunciado, pois este aumento na migração do DNA foi de aproximadamente oito vezes (Figura 19a). Por outro lado, nenhuma das concentrações dos carotenóides avaliada apresentou efeito genotóxico em hepatócitos ou em leucócitos do sangue periférico dos animais.

Quando os animais foram expostos simultaneamente ao MeHg e aos carotenóides, a formação dos cometas foi reduzida, de uma maneira dose-

dependente. Em hepatócitos, a porcentagem de redução foi de 44% quando os animais foram tratados com a maior concentração de BIX (10,0 mg/kg); já a dose intermediária deste mesmo carotenóide (1,0 mg/kg) reduziu os danos em aproximadamente 40%. Apesar da menor dose de BIX exercer ação antigenotóxica, o resultado desse tratamento não foi significativo (Figura 19a e 19b). Além do mais, quando os animais foram tratados com o MeHg associado à NOR, somente a maior concentração testada (1,0 mg/kg) foi capaz de reduzir de maneira significativa a formação de cometas induzida pela exposição ao MeHg (49% de redução) em hepatócitos (Figura 20b). Já quando avaliado o efeito protetor do carotenóide NOR sobre a estabilidade do material genético em leucócitos do sangue periférico, as maiores concentrações (0,1 e 1,0 mg/kg pc) foram eficazes em reduzir significativamente a formação de cometas induzida pelo metal (36 e 40%, aproximadamente).

4.2.2.3 Impacto dos tratamentos com metilmercúrio, bixina, norbixina e suas associações sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox dos animais

A Tabela 5 sumariza os resultados de experimentos adicionais, nos quais parâmetros bioquímicos associados com o estado redox dos animais (concentrações GSH e atividade da enzima antioxidante CAT sanguíneas) foram monitorados após o tratamento dos animais com as diferentes concentrações de BIX e NOR (0,1; 1,0 e 10,0 mg/kg pc e 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg pc, respectivamente), MeHg (30 µg/kg pc), bem como suas associações.

Tabela 5 - Atividades das enzimas catalase (CAT) e concentrações de glutathiona (GSH) após os tratamentos com metilmercúrio (MeHg), bixina (BIX), norbixina (NOR) e suas associações. Os animais (ratos Wistar; seis animais/grupo) foram tratados diariamente por meio de gavagem pelo período de 45 dias.

Grupos ¹	Atividade da CAT ²	Concentrações de GSH ³		
	(média ± DP)	Δ (%)	(média ± DP)	Δ (%)
Controle (water)	284,2 ± 61,5	100,0	0,98 ± 0,11	100,0
MeHg (30 µg/kg pc)	237,6 ± 44,7	83,6	0,64 ± 0,10*	65,2
BIX 1 (0,1 µg/kg pc)	266,1 ± 40,3	93,6	0,83 ± 0,14 [#]	85,3
BIX 2 (1,0 µg/kg pc)	269,8 ± 74,8	94,9	0,87 ± 0,05 [#]	89,1
BIX 3 (10,0 µg/kg pc)	241,6 ± 33,5	85,0	0,81 ± 0,10 [#]	83,3
NOR 1 (0,01 µg/kg pc)	247,8 ± 83,5	87,2	1,00 ± 0,13 [#]	102,4
NOR 2 (0,1 µg/kg pc)	292,6 ± 44,8	102,9	0,87 ± 0,06 [#]	89,6
NOR 3 (1,0 µg/kg pc)	245,3 ± 64,2	86,3	0,82 ± 0,06 [#]	84,4
MeHg + BIX 1	279,2 ± 62,0	98,2	0,82 ± 0,14 [#]	84,3
MeHg + BIX 2	306,3 ± 67,2	107,8	0,77 ± 0,03*	78,9
MeHg + BIX 3	276,1 ± 86,0	97,1	0,83 ± 0,09 [#]	85,3
MeHg + NOR 1	261,0 ± 78,0	91,8	0,82 ± 0,04 ^{*#}	84,3
MeHg + NOR 2	323,7 ± 74,2	113,9	0,87 ± 0,09 [#]	89,1
MeHg + NOR 3	315,2 ± 67,7	111,0	0,88 ± 0,05 [#]	90,2

¹Quantidades entre parênteses indicam as doses diárias; ¹k/gHb; ²mmol NADPH/gHb/min.

*estatisticamente diferente do grupo controle; [#]estatisticamente diferente do grupo MeHg (p ≤ 0,05; ANOVA e teste de Dunnett).

Pode ser observado que os tratamentos com os carotenóides não exerceram quaisquer influências sobre as atividades da enzima antioxidante CAT e sobre as concentrações sanguíneas de GSH e que uma diminuição significativa das concentrações deste tripeptídeo foi observada após a exposição com MeHg.

Quando os animais foram expostos simultaneamente ao MeHg e à BIX, a menor e a maior dose foram capazes de restabelecer as concentrações de GSH, ou seja, as alterações causadas pelo tratamento com o composto de Hg foram revertidas às concentrações do respectivo controle negativo. Pode ser observado também, ainda na Tabela 5, o impacto sobre a atividade da mesma enzima antioxidante, CAT, e sobre as concentrações sanguíneas de GSH após o co-tratamento dos animais com MeHg e diferentes concentrações do carotenóide NOR. Em todas as concentrações testadas, NOR foi capaz de reverter os efeitos negativos

causados pelo metal sobre as concentrações sanguíneas de GSH, revertendo-as às concentrações do seu respectivo controle negativo. Por fim, nenhum dos diversos tratamentos dos animais exerceu impacto sobre a atividade da enzima CAT.

5 Discussão

O Hg é um dos maiores contaminantes ambientais com seus efeitos tóxicos bem estabelecidos e o seu principal mecanismo de toxicidade, como discutido anteriormente, é o aumento do estresse oxidativo (CLARKSON; MAGOS, 2006). Populações ribeirinhas da região amazônica estão expostas cronicamente a este metal, por meio do consumo de peixes contaminados e apresentam vários efeitos adversos à saúde relacionados à exposição ao Hg.

A quimioprevenção por meio da dieta tem emergido como uma ferramenta de excelente custo-benefício para a prevenção e tratamento de diversas doenças crônicas, incluindo o câncer. Dados epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de frutas e vegetais diminuem efetivamente o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e até mesmo o câncer, por meio do aumento da capacidade antioxidante do indivíduo. Além disso, estes estudos também sugerem que cerca de 2/3 dos cânceres poderiam ser prevenidos pela modificação do estilo de vida das pessoas (FERGUSON, 2001, FERGUSON; PHILPOTT, 2008, FERGUSON, 2009).

Existem poucas evidências de que alguns nutri ou micronutrientes possam minimizar os efeitos tóxicos causados pelo Hg nestas populações e estudos em relação à associação de FQ comumente encontrados na dieta com a exposição ao metal são escassos. Por exemplo, Passos *et al.* (2007) encontraram uma relação entre o consumo de frutas e as concentrações de Hg sanguíneos em comunidades da região amazônica expostas ambientalmente ao metal, ou seja, quanto maior o consumo de frutas, menor as concentrações de Hg na corrente sanguínea; entretanto, os autores não avaliaram se os FQ presentes nestes frutos exerciam alguma atividade protetora sobre os efeitos adversos causados pelo metal. Deste modo, o presente trabalho, visou avaliar os possíveis efeitos protetores de FQ (flavonóide QC e carotenóides BIX e NOR) que fazem parte da dieta da população ribeirinha da Amazônia contra os efeitos deletérios causados pelo Hg. O estudo apresenta grande relevância para estas populações, uma vez que as doses utilizadas nos experimentos refletem a exposição dos indivíduos ao metal e aos FQ em questão. Nestas comunidades, o peixe é a principal fonte de proteína e é consumido diariamente, várias vezes ao dia. Um dos modos de preparo deste alimento é o chamado cozido, o qual é temperado com cebola (umas das mais importantes fontes de QC), sal e colorau (fonte de BIX e NOR).

Primeiramente, foi demonstrada, por meio do teste de citotoxicidade *in vitro*, uma curva dose-resposta tanto para o HgCl_2 e MeHg como para os FQ (QC, BIX e NOR). Posteriormente, foi realizado, a partir dos dados de citotoxicidade dos compostos de mercúrio, exposições às células HepG2 a diversos tempos (1, 6, 24 e 48 horas) e concentrações (0,1; 1,0 e 5,0 μM) a fim de se estabelecer as condições ideais de experimentação. Por meio do ensaio do cometa e determinações das concentrações de 8-OHdG, os resultados demonstraram que o tempo de 24 horas de exposição e a concentração de 1 μM apresentaram maior quantidade de dano no material genético. Deste modo, ficou estabelecido o tempo de exposição e a concentração dos compostos de mercúrio utilizados para as avaliações dos possíveis efeitos protetores do flavonóide QC e dos carotenóides BIX e NOR contra a formação de cometa induzida pela exposição ao HgCl_2 e ao MeHg.

Vários mecanismos foram propostos para explicar as propriedades citotóxicas do Hg e seus compostos, tais como aumento das EROs, desbalanço das concentrações de Ca^{2+} intracelulares e indução dos mecanismos de apoptose (CECCATELLI; DARE; MOORS, 2010). Neste sentido, é notável que vários trabalhos tenham demonstrado os efeitos tóxicos do Hg em diversos modelos experimentais. Por exemplo, Marty e Atchison (1998) relacionaram o aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelulares, em culturas de granulócitos cerebelares de ratos expostas ao MeHg, com a diminuição da viabilidade celular e Toimela e Tähti (2004) demonstraram que exposições a altas concentrações de HgCl_2 e MeHg (acima de 5 μM) em diversas culturas de células neuronais aumentam a atividade da caspase 3, levando a processos de apoptose celular. Estes dados corroboram os achados de Chen *et al.* (2010) que demonstraram que exposições à concentrações elevadas de HgCl_2 em células pancreáticas de camundongos levam a um aumento do número de células apoptóticas e necróticas; além disso estes resultados foram paralelos ao aumento de EROs intracelular, demonstrando que o aumento do estresse oxidativo conta, pelo menos em parte, para os efeitos citotóxicos atribuídos ao metal. Já em relação aos efeitos citotóxicos verificados nos ensaios com os FQ, está bem documentado em diversas condições laboratoriais que o efeito antioxidante ou pró-oxidante de flavonóides e carotenóides é dose-dependente, ou seja, baixas doses destes compostos exercem atividade antioxidante, enquanto altas doses desencadeiam, quase que invariavelmente, reações de peroxidação em

diversas macromoléculas, promovendo assim, efeitos citotóxicos (COTELLE, 2001, EL-AGAMEY *et al.*, 2004a, EL-AGAMEY *et al.*, 2004b).

A observação dos efeitos genotóxicos encontrados no presente trabalho, em células HepG2 e em leucócitos periféricos e hepatócitos de ratos Wistar, após a exposição aos compostos de Hg era esperada, uma vez que resultados positivos já haviam sido observados por meio do ensaio do cometa em modelos animais (GROTTO *et al.*, 2009a); concentrações aumentadas de 8-OHdG foram observados em indivíduos ocupacionalmente expostos ao Hg (CHEN *et al.*, 2005) e também em células cerebrais de camundongos tratados com o metal (FRANCO *et al.*, 2007). Além do mais, vários estudos têm sido publicados a respeito dos danos ao material genético causados pelos compostos de Hg e resultados positivos também foram em culturas celulares de hepatócitos humanos (OGURA; TAKEUCHI; MORIMOTO, 1996, SCHMID *et al.*, 2007, GUILLAMET *et al.*, 2008). Na maioria destes estudos, a forma orgânica do metal (MeHg) foi estudada, pois é a forma que apresenta maior relevância e toxicidade aos seres humanos (PASSOS; MERGLER, 2008). No presente trabalho, foi também incluído uma forma inorgânica do metal, HgCl_2 , uma vez que estudos já demonstraram que este composto também causa diversos efeitos tóxicos (OGURA; TAKEUCHI; MORIMOTO, 1996, AGARWALA *et al.*, 2010).

No presente estudo, foi demonstrado que ambos os compostos de Hg causam efeitos genotóxicos similares em células HepG2, enquanto que Guillamet *et al.* (2010) reportaram uma indução muito maior na formação de cometas em cultura de células linfoblásticas humanas expostas ao HgCl_2 . Uma das razões para esta discrepância pode ser porque as células HepG2 possuem uma variedade de enzimas relacionadas à metabolização de xenobióticos, incluindo aquelas envolvidas na detoxificação de EROs e desta maneira, reflete muito melhor que outras linhagens celulares a situação encontrada em humanos (KNASMULLER *et al.*, 2004, MERSCH-SUNDERMANN *et al.*, 2004). É notável ainda que tanto a exposição ao HgCl_2 quanto ao MeHg, levam a um aumento na formação de 8-OHdG, com respostas similares às aquelas encontradas nos ensaios do cometa nas mesmas condições experimentais. Estas observações estão de acordo com Jin *et al.* (2008) que evidenciaram que roedores tratados com diferentes doses de MeHg apresentam um aumento significativo das concentrações de 8-OHdG, em uma maneira dose-resposta. Isto é um indicador de que a formação de guaninas oxidadas esta

relacionada, pelo menos em parte, com a indução da formação dos cometas aqui observados.

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos do Hg e o presente trabalho demonstrou que este metal leva a diversos desequilíbrios no estado redox da célula. Trabalhos anteriores já demonstraram que o metal afeta a atividade de enzimas antioxidantes e as concentrações de GSH em modelos animais. Por exemplo, Grotto et al. (2009a) demonstraram uma relação entre o aumento da formação de cometas e uma diminuição da atividade da enzima antioxidante GPx em leucócitos periféricos e em eritrócitos, respectivamente, de ratos tratados pelo período de 100 dias com baixas doses de MeHg. Em outro estudo, Grotto et al. (2009b) também demonstraram que o MeHg em dose e tempo de exposição similares ao trabalho anterior foi capaz de alterar significativamente as concentrações sanguíneas de GSH e MDA e ainda diminuir a atividade da enzima CAT. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram estes dados, uma vez que ficou evidenciado uma diminuição das concentrações de GSH sanguínea nos animais expostos ao MeHg, bem como redução da atividade da enzima GPx. Entretanto, no presente estudo, apesar de uma clara redução na atividade da CAT em animais expostos ao metal, este resultado não foi capaz de alcançar significado estatístico.

Estudos *in vitro*, conduzidos com diferentes linhagens celulares de mamíferos, também evidenciaram alterações no estado redox intracelular (SHANKER; ASCHNER, 2003, SHANKER *et al.*, 2005, AGARWALA *et al.*, 2010). Nestes casos, diminuições das concentrações de GSH e atividade diminuída da enzima GPx foram evidenciadas. Neste contexto, é notável que estudos conduzidos com seres humanos expostos ao metal, de forma ocupacional ou ambiental, encontrassem alterações de parâmetros bioquímicos relacionados com o estado redox do indivíduo. Bulat e colaboradores (1998) observaram um significativo aumento na peroxidação lipídica avaliada pelo MDA e diminuição das atividades das enzimas SOD e GPx em eritrócitos de trabalhadores de uma fábrica de cloro, expostos ocupacionalmente ao Hg⁰ e Grotto *et al.* (2010) demonstraram uma relação entre a concentração de Hg no sangue e no cabelo, em comunidades ribeirinhas da região amazônica expostas ao MeHg por meio do consumo de peixe, e as atividades diminuídas das enzimas GPx, CAT e Ala-D além de concentrações reduzidas do tripeptídeo GSH.

Como descrito anteriormente, não foi evidenciado um aumento significativo no padrão de migração do DNA em células HepG2, após a exposição à diferentes concentrações de QC (0,1 – 5,0 μ M). Trabalhos anteriores, *in vitro*, já demonstraram a ausência de propriedades genotóxicas do flavonóide em doses semelhantes às utilizadas no presente estudo (RAMOS *et al.*, 2008, GUPTA *et al.*, 2010) enquanto que altas concentrações de QC afetaram a estabilidade do DNA em cultura de células neuronais PC12 (SASAKI *et al.*, 2007). Entretanto, tais efeitos genotóxicos foram observados somente sob condições experimentais, as quais não refletem a real situação em que seres humanos estão expostos; concentrações séricas encontradas em indivíduos após o consumo de alimentos ricos em QC variam entre 0,09 e 1,29 μ M (EGERT *et al.*, 2008). Além de resultados negativos encontrados *in vitro*, vários trabalhos os quais utilizaram modelos animais a fim de se avaliar os possíveis efeitos adversos do flavonóide também foram realizados. Caria e colaboradores (1995) demonstraram que camundongos expostos de maneira aguda ao flavonóide em concentrações elevadas (até 0,5 g/kg pc) não apresentaram aumento na frequência de MN em medula óssea e Utesch *et al.* (2008) não observaram aumento significativo na formação de MN após exposições agudas de QC (0,2 – 2,0 g/kg/pc) em ratos.

Como observado na seção dos resultados deste estudo, foi evidenciado, de maneira semelhante, efeitos protetores sobre o DNA de células HepG2 quando as células foram tratadas com QC antes ou simultaneamente com os compostos de Hg, enquanto que nenhuma proteção foi observada com o protocolo de pós-tratamento. Esta observação indica que a redução na formação de cometas é devido tanto a inativação direta de EROs quanto aos efeitos protetores intracelulares, os quais podem estar associados à inativação de radicais bem como a indução de enzimas que minimizam o desbalanço do estado redox causado pelo metal (ALIA *et al.*, 2006). O fato de não terem sido encontradas evidências de efeitos protetores quando o flavonóide foi adicionado após o tratamento com o metal pode ser um indicador de que a QC não exerce influência sobre os processos de reparo do DNA (DE FLORA, 1998, DE FLORA; FERGUSON, 2005). Efeitos protetores da QC contra a instabilidade genética causada pelo Hg também foram evidenciados nos tratamentos *in vivo*. Em ambos os biomarcadores avaliados, leucócitos periféricos e hepatócitos, uma pronunciada redução de dano no DNA foi evidenciada após a exposição dos animais ao MeHg associado a diferentes concentrações de QC (0,5;

5,0 e 50,0 mg/kg pc) pelo período de 45 dias; entretanto, apesar da menor concentração testada apresentar uma diminuição na formação de cometas, esta não foi capaz de alcançar significância.

A ausência de toxicidade aguda e de outros efeitos adversos à saúde e sua abundância em grande número de alimentos sugerem que a QC pode ser utilizada como um quimiopreventivo realmente eficaz o qual possa proteger seres humanos contra os danos celulares gerados por alterações no estado redox do indivíduo (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008). De fato, vários trabalhos já demonstraram que a QC é um eficiente protetor do material genético contra os danos induzidos por diversos mutágenos. Por exemplo, uma pronunciada redução dos danos no DNA após a exposição ao t-butil-hidroperóxido foi observada em experimentos conduzidos com células HepG2 (RAMOS *et al.*, 2008) e um grupo indiano (MUTHUKUMARAN *et al.*, 2008) reportou uma eficiente proteção contra a indução de cometa e formação de MN e também uma diminuição das alterações do estado redox celular em cultura de linfócitos de ratos, após a exposição a nicotina. Além disso, efeitos protetores *in vivo* também foram observados, por exemplo, uma significativa diminuição na formação de cometas foi observada em hepatócitos de ratos após o tratamento com dietilnitrosamina paralela a restauração das concentrações de GSH e MDA (GUPTA *et al.*, 2010). Já está bem estabelecido que os efeitos genotóxicos de nitrosaminas envolvam, além de metilação, danos oxidativos no DNA mediados por EROs (TEUFELHOFER *et al.*, 2005).

Várias propriedades antioxidantes atribuídas à QC têm sido extensivamente investigadas e evidências demonstram que elas envolvem inativação direta de radicais (KIM; JANG, 2009) bem como ativação indireta de fatores transcricionais (por exemplo, Nrf2) que regulam a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes (ARREDONDO *et al.*, 2010). Estes dados estão de acordo com observações descritas por Ália *et al.* (2006) que evidenciaram um significativo aumento na atividade das enzimas CAT, SOD e glutathiona-s-transferases (GSTs) em culturas de HepG2 após a exposição ao flavonóide. Entretanto, alguns estudos falharam ao tentar estabelecer esta relação, por exemplo, nenhuma alteração nas atividades de SOD, CAT e GPx foram observados por Muthukumaran e colaboradores (2008) após a exposição ao flavonóide em culturas de linfócitos de ratos; estas discrepâncias podem ser explicadas por diferenças no processo de indução de enzimas antioxidantes em diferentes linhagens celulares. Estudos *in vivo*

também demonstraram os efeitos protetores desse flavonóide, tais como os achados de Yousef *et al.* (2010) que demonstraram que o flavonóide foi capaz de restabelecer as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes CAT, GPx, SOD e também nas concentrações de MDA e GSH em plasma, cérebro, fígado, rins e pulmões de ratos expostos ao paracetamol e Renugadevi e Prabu (2010) também evidenciaram os efeitos antioxidantes da QC sobre a nefrotoxicidade induzida pela exposição ao cádmio, em ratos, nos mesmos parâmetros bioquímicos citados acima.

Resultados similares àqueles encontrados com o flavonóide QC foram observados nos experimentos conduzidos com os carotenóides BIX e NOR, ou seja, nenhuma das concentrações testadas alterou, de maneira significativa, o padrão de migração do DNA evidenciado por meio do ensaio do cometa, seja *in vitro* (0,1 – 10,0 μ M) ou *in vivo* (0,1; 1,0 e 10,0 mg/kg pc e 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg pc para BIX e NOR, respectivamente). Além disso, vários efeitos protetores foram demonstrados após a exposição das células ou dos animais ao Hg associado com os carotenóides: diminuição da formação de cometas e restabelecimento de diversos parâmetros bioquímicos associados ao estado redox das células.

A ausência de efeitos adversos destes carotenóides já foi descrita em estudos com modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, Barcelos *et al.* (2009) demonstraram que células HepG2 expostas a diferentes concentrações do extrato de urucum, não apresentaram alterações nas frequências de MN e células binucleadas; dados estes que corroboram os achados de Silva, Antunes e Bianchi. (2001), que não observaram diferenças significativas no número de AC, em células da medula óssea de ratos, entre os grupos controles e aqueles expostos às concentrações, semelhantes às utilizadas neste trabalho, do carotenóide BIX (2,5 e 5,0 mg/kg pc). Além disso, Agner e colaboradores (2004 e 2005) reforçaram a segurança do uso do urucum, ao demonstrar a ausência de propriedades carcinogênicas, em doses muito acima daquelas em que seres humanos encontram-se expostos, em fígado e cólon de ratos.

O principal efeito protetor atribuído aos carotenóides em geral, é a sua grande capacidade antioxidante, em especial de capturar e inativar o $^1\text{O}_2$ (PAIVA; RUSSELL, 1999, RICCONI, 2009). Além do mais, alguns estudos demonstraram que estes compostos são capazes de induzir a expressão de enzimas relacionadas à comunicação celular bem como ao processo de detoxificação de xenobióticos, tanto de fase I como de fase II (BERTRAM, 1999, JEWELL; O'BRIEN, 1999). Sendo

assim, os diversos efeitos protetores da BIX e NOR evidenciados neste estudo, *in vitro* e *in vivo*, eram esperados.

Como já descrito anteriormente (resultados), os carotenóides BIX e NOR exerceram proteção contra os danos no material genético causados pelo HgCl_2 e pelo MeHg de células HepG2 somente nos protocolos de pré e tratamento simultâneo, ou seja, do mesmo modo que o flavonóide QC, estes carotenóides parecem não influenciar nos diversos processos de reparo do DNA das células, uma vez que não foi evidenciado proteção significativa quando estes carotenóides foram adicionados após a exposição das células aos compostos de Hg. Claros efeitos protetores também foram observados, tanto em leucócitos do sangue periférico quanto em hepatócitos de ratos, após a exposição dos animais ao MeHg associado à diferentes concentrações de BIX e NOR; no entanto, a BIX parece exercer maior efeito protetor sobre a formação de cometas induzidos por este metal, uma vez que seus efeitos foram mais pronunciados tanto em leucócitos quanto em hepatócitos destes animais.

Diferentemente do flavonóide QC, que foi extensivamente estudado acerca de suas propriedades protetoras, até o momento, poucos trabalhos foram conduzidos com o objeto de avaliar os possíveis efeitos benéficos destes carotenóides. Barcelos e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato do urucum foi capaz de reduzir a frequência de MN em cultura de células HepG2 após a exposição ao quimioterápico DXR e ao hidrocarboneto aromático policíclico B(a)P em esquemas de tratamentos semelhantes ao empregado no presente estudo, ou seja, o extrato foi eficaz em reduzir o número de MN quando foi adicionado antes ou juntamente com os mutágenos (pré e tratamento simultâneo) e nenhum sinal de proteção foi observado nos protocolos de pós-tratamento. Estes resultados prévios corroboram os dados do presente trabalho e reforçam a idéia que estes carotenóides apresentam propriedades antioxidantes, uma vez que reduziram eficazmente a frequência de MN induzidos pela DXR e também exercem efeito modulatório sobre as enzimas do biometabolismo, já que a frequência de MN induzida pelo B(a)P foi significativamente reduzida quando as células foram expostas ao urucum.

Outros trabalhos também já relataram as atividades antioxidantes da BIX e NOR. Thresiamma, George e Kuttan (1998) demonstraram que o carotenóide BIX reduziu de maneira eficaz a frequência de MN em eritrócitos do sangue periférico de camundongos após a exposição à radiação ionizante (radiação-r), Já Júnior et al.

(2005) demonstraram o efeito antioxidante da NOR em linhagens de *S. typhimurium* e de *Escherichia coli*: o carotenóide foi capaz de reduzir de maneira significativa o número de mutações causadas pelo H_2O_2 e aumentar a sobrevivência celular em cerca de 10 vezes após a exposição aos raios ultravioletas do tipo C, respectivamente.

Este trabalho, no entanto, é um dos únicos que avaliou o impacto da exposição desses carotenóides, associados ao Hg, sobre diversos parâmetros bioquímicos relacionados ao estado redox das células, *in vitro* e *in vivo*. Além deste, somente Silva et al. (2001) demonstraram que a BIX é capaz de restabelecer aos níveis do controle negativo, as concentrações de GSH e MDA em rins de ratos expostos ao quimioterápico cisplatina. Por outro lado, trabalhos que visaram avaliar os possíveis efeitos de outros carotenóides contra os danos causados pelo Hg já foram conduzidos. Augusti et al. (2007), demonstraram que o licopeno, um carotenóide de estrutura semelhante a BIX e a NOR, foi capaz de reverter os distúrbios do estado redox das células renais de ratos expostos a alta dose de $HgCl_2$ (0,5 mg/kg pc); neste caso, a peroxidação lipídica, as atividades das enzimas GPx e CAT foram restabelecidas aos níveis do controle negativo. Além disso, o mesmo grupo (AUGUSTI et al., 2008), demonstrou, nas mesmas condições experimentais anteriormente descritas, que o carotenóide astaxantina foi capaz de restaurar as concentrações de PCO e atividades das enzimas GPx e CAT, as quais foram alteradas pela exposição ao Hg. Como já foi apresentado, a exposição das células HepG2 ou dos animais ao Hg levam a claros efeitos adversos, aumentando o estresse oxidativo, evidenciado aqui pelos parâmetros GSH, MDA, PCO, EROs intracelular e atividades das enzimas CAT e GPx e co-administração dos carotenóides BIX e NOR foi capaz de restabelecer o equilíbrio do estado redox intracelular. Estes resultados reforçam ainda mais que as propriedades protetoras desses carotenóides são principalmente devido às suas atividades antioxidantes.

Os presentes achados são diretamente relevantes para seres humanos, por exemplo, trabalhadores de indústrias de cloro (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005) e lâmpadas (ZAVARIZ; GLINA, 1993) estão ocupacionalmente expostos ao IHg e principalmente, populações expostas a forma orgânica do Hg, por meio do consumo de alimentos contaminados, tais como peixes e frutos do mar, em especial, comunidades ribeirinhas da região amazônica (PASSOS et al., 2008, PASSOS; MERGLER, 2008, GROTTTO et al., 2010). Em suma, os resultados do presente

trabalho indicam que o Hg causa claros efeitos genotóxicos e leva a uma série de alterações de parâmetros bioquímicos que refletem o estado redox das células, em (HepG2) e em ratos Wistar. Além disso, foi demonstrado aqui que FQ, os quais são comumente encontrados na dieta de seres humanos, denominados QC, BIX e NOR protegem contra a instabilidade genética induzida pelo Hg e restabelece os distúrbios do estado redox das células causados pelo Hg.

6 Conclusões

Pode-se concluir que, sob as condições experimentais do presente trabalho:

- o HgCl_2 e o MeHg causam claros efeitos citotóxicos, genotóxicos e alterações no estado redox em culturas de células HepG2, evidenciados por meio do método de exclusão pelo tripan blue, ensaio do cometa e determinação de 8-OHdG e determinação das concentrações intracelulares GSH, MDA, PCO e EROs;
- a suplementação dessas culturas com o flavonóide QC e com os carotenóides BIX e NOR foi capaz de reverter de maneira significativa a formação de cometas induzida pelos compostos de Hg e restabelecer o equilíbrio do estado redox das células ;
- em ratos Wistar expostos diariamente ao MeHg pelo período de 45 dias, pode ser observado claros efeitos genotóxicos e alterações do estado redox dos animais, demonstrados pelo ensaio do cometa em leucócitos do sangue periférico e por meio das determinações das concentrações de GSH e das atividades das enzimas CAT e GPx;
- do mesmo que observado nos experimentos *in vitro*, o co-tratamento dos animais com os FQ diminuiu significativamente os danos no material genético e as alterações do estado redox dos animais induzidas pelo Hg, nos mesmos biomarcadores descritos no tópico acima.

7 Referências

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGARWALA, S. *et al.* Mangiferin, a dietary xanthone protects against mercury-induced toxicity in HepG2 cells. **Environmental Toxicology**, New York, July 2010. In press.

AGNER, A. R. *et al.* Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 10, p. 1687-1693, October 2004.

AGNER, A. R. *et al.* DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 582, n. 1-2, p. 146-154, April 2005.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, Burbank, v. 18, n. 1, p. 75-81, January 2002.

ALIA, M. *et al.* Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 212, n. 2, p. 110-118, April 2006.

AMORIM, M. I. *et al.* Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 4, p. 497-507, December 2000.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1124-1131, March 2004.

ARIZA, M. E.; BIJUR, G. N.; WILLIAMS, M. V. Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 31, n. 4, p. 352-361, 1998.

ARREDONDO, F. *et al.* After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. **Free Radicals Biology & Medicine**, New York, v. 49, n. 5, p. 738-747, September 2010.

ASMUSS, M.; MULLENDERS, L. H.; HARTWIG, A. Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 112-113, p. 227-231, March 2000.

ATSDR, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*. Toxicological profile for mercury. **Center for Disease Control**, Atlanta, 1999. 676 p.

AUGUSTI, P. R. *et al.* Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 100, n. 6, p. 398-402, June 2007.

AUGUSTI, P. R. *et al.* Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 212-219, January 2008.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio**. São Paulo: Rima Editora. 2003. 272 p.

BALSHAW, S. *et al.* Mercury in seafood: mechanisms of accumulation and consequences for consumer health. **Reviews on Environmental Health**, Jerusalem, v. 22, n. 2, p. 91-113, Apr/Jun. 2007.

BARCELOS, G. R. *et al.* Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 114, n. 2, p. 268-273, November 2007.

BARCELOS, G. R. M. *et al.* Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 50, n. 9, p. 808-814, December 2009.

BATISTA, B. L. *et al.* Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 646, n. 1-2, p. 23-29, July 2009.

BERTRAM, J. S. Carotenoids and gene regulation. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 57, n. 6 p. 182-191, June 1999.

BIXINA. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bixin.png>. Acesso: 12 Dez. 2010.

BONACKER, D. *et al.* Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 78, n. 10, p. 575-583, October 2004.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 585, n. 2-3, p. 325-337, May 2008.

BOWEN, D. J. *et al.* Stopping the active intervention: CARET. **Controlled Clinical Trials**, New York, v. 24, n. 1, p. 39-50, February 2003.

BRABO, E. D. *et al.* Mercury levels in fish consumed by the Sai Cinza indigenous community, Munduruku Reservation, Jacareacanga County, State of Para, Brazil. **Cadernos de Saude Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 325-331, Apr/Jun 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução CNNPA 12/78 de 1978. Fixa os padrões de identidade e qualidade do colorífero. p. 75, jun. 1978.

BULAT, P. *et al.* Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 71, p. S37-S39, September 1998. Supplement.

CARIA, H. *et al.* Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, n. 2-3, p. 85-94, June 1995.

CASTOLDI, A. F. *et al.* Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **Journal of Neuroscience Research**, New York, v. 59, n. 6, p. 775-787, March 2000.

CDC, Center for Disease Control. **Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals**. Pub. No. 02-0716. 2003.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. *et al.* Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 586, n. 2, p. 102-114, October 2005.

CECCATELLI, S.; DARE, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 188, n. 2, p. 301-308, November 2010.

CECONI, C. *et al.* The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl cysteine. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 20, n. 1, p. 5-13, January 1988.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the Comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, n. 1, p. 51-67, Jan/Feb. 2009.

CHEN, C. *et al.* Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 51, n. 4, p. 759-767, April 2005.

CHEN, Y. W. *et al.* Inorganic mercury causes pancreatic beta-cell death via the oxidative stress-induced apoptotic and necrotic pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 243, n. 3, p. 323-331, March 2010.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 110, p. 11-23, February 2002. Supplement 1.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 36, n. 8 p. 609-662, September 2006.

COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, Amsterdam v. 375, n. 2, p. 183-193, April 1997.

COMET ASSAY IV™. Disponível em: <http://www.perceptive.co.uk/cometassay/>. Acesso: 12 Dez.2010.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 1, n. 6, p. 569-590, December 2001.

CRESPO-LOPEZ, M. E. *et al.* Genotoxicity of mercury: Contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environmental International**, Amsterdam, v. 37, n.1, p. 136-141, September 2010.

DA SILVA, J. *et al.* Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 4, p. 270-278, 2000.

DA SILVA, J. *et al.* Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 941-947, July 2002.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402, n. 1-2, p. 151-158, June 1998.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 591, n. 1-2, p. 8-15, December 2005.

DE MARCO, K. C. *et al.* Environmental exposure to methylmercury is associated with a decrease in nitric oxide production. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 106, n. 5, p. 411-415, May 2010.

DELGADO, M. E. *et al.* Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 47, n. 8, p. 479-490, December 2008.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M. E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 53, n. 1, p. S194-S200, January 1991. Supplement.

EGERT, S. *et al.* Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. **The Journal Nutrition**, v. 138, n. 9, Sep, p. 1615-1621. 2008.

EKINO, S. *et al.* Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 262, n. 1-2, p. 131-144, November 2007.

EL-AGAMEY, A. *et al.* Are dietary carotenoids beneficial? Reactions of carotenoids with oxy-radicals and singlet oxygen. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 3, n. 8, p. 802-811, August 2004a.

EL-AGAMEY, A. *et al.* Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 430, n. 1, p. 37-48, October 2004b.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 82, n. 1, p. 70-77, May 1959.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 529-539, December 2001.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **The Science of Total Environment**, Amsterdam, v. 275, n. 1-3, p. 71-82, July 2001.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 37-59, February 1995.

FARINA, M. *et al.* *In vitro* effects of selenite and mercuric chloride on liver thiobarbituric acid-reactive substances and non-protein thiols from rats: influences of dietary cholesterol and polyunsaturated and saturated fatty acids. **Nutrition**, Burbank, v. 19, n. 6, p. 531-535, June 2003.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 475, n. 1-2, p. 89-111, April 2001.

FERGUSON, L. R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 109, n. 3, p. 452-458, March 2009.

FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M. Nutrition and mutagenesis. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 28, p. 313-329. 2008.

FILLION, M. *et al.* A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. **Environmental Health**, London, v. 5, p. 29. 2006.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, December 1995.

FRANCO, J. L. *et al.* Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 20, n. 12, p. 1919-1926, December 2007.

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A. Comparison of volatile compounds in water- and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2010-2015, March 2002.

GHIRALDINI, J. E. Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos**, Campinas, p. 20-25. 1989.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K., **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, v., 2003. 355p.

GROTTO, D. *et al.* Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. *Archives of Toxicology*, Berlin, v. 83, n. 3, p.249-254, March 2009a. Errata em: **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 297, March 2009.

GROTTO, D. *et al.* Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. **Archives of Toxicology**, Berlin v. 83, n. 7, p. 653-662, July 2009b.

GROTTO, D. *et al.* Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 4, p. 806-811, January 2010.

GUILLAMET, E. *et al.* DNA-damage induction by eight metal compounds in TK6 human lymphoblastoid cells: results obtained with the alkaline Comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 654, n. 1, p. 22-28, June 2008.

GUIMARAES, J. R. D. *et al.* Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajos river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 261, n. 1-3, p. 91-98, October 2000.

GUPTA, C. *et al.* Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. **Phytotherapy Research**, London, v. 24, n. 1, p. 119-128, January 2010.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **The Biochemical Journal**, London, v. 401, n. 1, p. 1-11, January 2007.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 5, p. S715-S724, May, 1993. Discussion S724-S725, May 1993. Supplement.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. London: Oxford University Press, 1999. 936 p.

HANSEN, J. C.; DANSCHER, G. Organic mercury: an environmental threat to the health of dietary-exposed societies? **Reviews of Environmental Health**, Jerusalem, v. 12, n. 2, p. 107-116, Apr/Jun. 1997.

HARADA, M. *et al.* Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. **Environmental International**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 285-290, October 2001.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 45-51, January 2003.

HARWOOD, M. *et al.* A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2179-2205, November 2007.

HATCHER, J. F.; BRYAN, G. T. Factors affecting the mutagenic activity of quercetin for *Salmonella typhimurium* TA98: metal ions, antioxidants and pH. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 148, n. 1-2, p. 13-23, Jan/Feb. 1985.

HEIJNEN, C. G. *et al.* Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**, London, v. 36, n. 5, p. 575-581, May 2002.

HELBOCK, H. J. *et al.* DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 1, p. 288-293, January 1998.

HOELZL, C. *et al.* Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, n. 1, p. 68-79, Jan/Feb. 2009.

HOUSTON, M. C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 13, n. 2, p. S128-S133, Mar/Apr. 2007. Supplement.

HUANG, M. T. *et al.* Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 237-242, February 1985.

HUANG, Y. L.; CHENG, S. L.; LIN, T. H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercuric chloride. **Biological Trace Element Research**, v. 52, n. 2, May, p. 193-206. 1996.

HUSSAIN, S. *et al.* Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **Journal of Environmental Science and Health. Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, London, v. 34, n. 4, p. 645-660, July 1999.

JECFA. **Evaluation of certain food additives and contaminants. Twenty-six Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Foods Additives**. 1982.

JEWELL, C.; O'BRIEN, N. M. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, n. 3, p. 235-242, March 1999.

JIN, X. *et al.* Dietary fats modulate methylmercury-mediated systemic oxidative stress and oxidative DNA damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 1706-1720, May 2008.

JUNIOR, A. C. *et al.* Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. **Genetics and Molecular Research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 4, n. 1, p. 94-99. 2005.

KAUR, S. J.; GROVER, I. S.; KUMAR, S. Modulatory effects of a tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 1113-1119, December 2000.

KIM, G. N.; JANG, H. D. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Annual of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1171, p. 530-537, August 2009.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicology Pathology**, Newark, v. 38, n. 1, p.96-109. 2010.

KNASMULLER, S. *et al.* Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. **Toxicology**, Amsterdam, v. 198, n. 1-3, p. 315-328, May 2004.

KUNIMOTO, M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 204, n. 1, p. 310-317, October 1994.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinic Therapeutical**, v. 5, n. 3, p. 196-208, June 2000.

LE PAGE, F. *et al.* Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. **Cell**, v. 101, n. 2, Apr 14, p. 159-171. 2000.

LE PAGE, F. *et al.* Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. **Cell**, Cambridge, v. 123, n. 4, p. 711, November 2005.

LEVINE, R. L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, New York, v. 233, n., p. 346-357, 1994.

LIU, J.; GOYER, R. A.; WAALKES, M. P. Toxic effects of metals. In: KLASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. United States: McGraw-Hill, 2008. 1309p.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 78, n. 3, p. S517-S520, September 2003. Supplement.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 380, n. 1-2, p. 50-58, May 2007.

MAKENA, P. S. *et al.* Comparative mutagenic effects of structurally similar flavonoids quercetin and taxifolin on tester strains *Salmonella typhimurium* TA102 and *Escherichia coli* WP-2 uvrA. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 50, n. 6, p. 451-459, July 2009.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, March 1999.

MARTY, M. S.; ATCHISON, W. D. Elevations of intracellular Ca^{2+} as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 150, n. 1, p. 98-105, May 1998.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, H.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 46, p. 1379-1383, 1997.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, H.; PFANDER, H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 52, p. 135-139, 1999.

MERSCH-SUNDERMANN, V. *et al.* Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, Amsterdam, v. 198, n. 1-3, p. 329-340, May 2004.

MIURA, K.; IMURA, N. Mechanism of methylmercury cytotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 18, n. 3, p. 161-188, 1987.

MIURA, K. *et al.* The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 160, n. 3, p. 279-288, November 1999.

MORAES, F.; LUCIANE, M.; COLLA, L. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n., p. 109-122, 2006. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/2082/2024>. Acesso: 15 Out. 2009.

MUTHUKUMARAN, S. *et al.* Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats. **Toxicology**, Amsterdam, v. 243, n. 1-2, p. 207-215, January 2008.

NORBIXINA. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bixin.png>. Acesso: 12 Deze. 2010.

OGURA, H.; TAKEUCHI, T.; MORIMOTO, K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 340, n. 2-3, p. 175-182, June 1996.

OU, Y. C. *et al.* The role of intracellular glutathione in methylmercury-induced toxicity in embryonic neuronal cells. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 793-804, October 1999.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 70, n. 1, p. 158-169, July 1967.

PAIVA, S. A. R.; RUSSELL, R. M. beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 18, n. 5, p. 426-433, October 1999.

PALMER, C. D. *et al.* Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 61, n. 8, p. 980-990, August 2006.

PASSOS, C. J. *et al.* Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 18, n. 1, p. 76-87, January 2008.

PASSOS, C. J.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Cadernos de Saude Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. S503-S520, 2008. Supplement 4.

PASSOS, C. J. S. *et al.* Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, New York, v. 105, n. 2, p. 183-193, October 2007.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 34, p. 231-247, 2009.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and Chemistry of Annatto. **Food Chemistry**, Barking, v. 5, n. 1, p. 47-56, 1980.

QUERCETINA. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Quercetin.png>. Acesso em 13 Dez. 2010.

RAMOS, A. A. *et al.* Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 66-73, February 2008.

RAO, K. S. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, v. 46, n. 1, p. 9-15, February 2009.

RENUGADEVI, J.; PRABU, S. M. Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats. **Experimental and Toxicology Pathology**, Jena, v. 62, n. 5, p. 471-481, September 2010.

RICCIONI, G. Carotenoids and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, Philadelphia, v. 11, n. 6, p. 434-439, November 2009.

SARAFIAN, T. A. Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. **Metals Ions in Biological Systems**, New York, v. 36, p. 415-444, 1999.

SASAKI, M. *et al.* Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 30, n. 4, p. 682-686, April 2007.

SCHIMMER, O.; HAFELE, F.; KRUGER, A. The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. **Mutation Research**, amsterdam, v. 206, n. 2, p. 201-208, October 1988.

SCHMID, K. *et al.* Mercuric dichloride induces DNA damage in human salivary gland tissue cells and lymphocytes. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 81, n. 11, p. 759-767, November 2007.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 525-530, November 2000.

SEKIHASHI, K. *et al.* Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 517, n. 1-2, p. 53-75, May 2002.

SEMENTES DE *Bixa orellana* L. Disponível em: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Urucum_\(bixa_orellana\)_seeds.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Urucum_(bixa_orellana)_seeds.jpg). Acesso: 12 Dez. 2010.

SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. **Brain Research. Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 85-91, January 2003.

SHANKER, G. *et al.* Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. **Brain Research. Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 11-22, June 2005.

SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacology Research**, London, v. 43, n. 6, p. 561-566, June 2001.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 175, n. 1, p. 184-191, March 1988.

SINGH, R. J. Glutathione: a marker and antioxidant for aging. **The Journal of Laboratory and Clinic Medicine**, St. Louis, v. 140, n. 6, p. 380-381, December 2002.

STOIBER, T. *et al.* Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). **Mutation Research**, Amsterdam, v. 563, n. 2, p. 97-106, October 2004.

SURH, Y. J.; FERGUSON, L. R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential--highlights of a symposium. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 523-524, p. 1-8, Feb/Mar. 2003.

TATUM, V. L.; CHANGCHIT, C.; CHOW, C. K. Measurement of Malondialdehyde by High-Performance Liquid-Chromatography with Fluorescence Detection. **Lipids**, Berlin, v. 25, n. 4, p. 226-229, April 1990.

TEUFELHOFER, O. *et al.* Superoxide generation from Kupffer cells contributes to hepatocarcinogenesis: studies on NADPH oxidase knockout mice. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 319-329, February 2005.

THIER, R. *et al.* Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 140-141, p. 75-81, April 2003.

THRESIAMMA, K. C.; GEORGE, J.; KUTTAN, R. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 17, n. 4, p. 431-434, December 1998.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 206-221. 2000.

TIEPPO, J. *et al.* Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 1140-1146, July 2007.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.3, p. 310-313, Set/Dez. 2001.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. **Journal of Hypertension**, London, v. 27, n. 10, p. 1929-1940, October 2009.

TOIMELA, T.; TAHTI, H. Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 78, n. 10, p. 565-574, October 2004.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMULLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 441, n. 2, p. 215-224, May 1999.

UMANS, J. G.; LEVI, R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 57, p. 771-790, 1995.

UNEP. United Nations Environment Programme. **Global mercury assessment**. In: Impact of mercury on the environment:, 2002. 270p.

UTESCH, D. *et al.* Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 654, n. 1, p. 38-44, June 2008.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health. Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews**, London, v. 27, n. 2, p. 120-139, April 2009.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 160, n. 1, p. 1-40, March 2006.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 27, n. 5-6, p. 612-616, September 1999.

WISEMAN, S. A.; BALENTINE, D. A.; FREI, B. Antioxidants in tea. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 37, n. 8, p. 705-718, December 1997.

YOUSEF, M. I. *et al.* Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 11, p. 3246-3261, November 2010.

ZAVARIZ, C.; GLINA, D. M. R. Effects of occupational exposure to mercury in workers at a light bulb factory in Santo Amaro, São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 117-129, 1993.

ZIECH, D. *et al.* The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 188, n. 2, p. 334-339, November 2010.