

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO  
GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) EM MODELO  
DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR  
TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Helena Kober**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO GUARANÁ**  
**(*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) EM MODELO DE**  
**HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR TETRACLORETO**  
**DE CARBONO EM RATOS**

**Helena Kober**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Kober, Helena

Avaliação da atividade protetora do Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em ratos / Helena Kober.-2013.

64 p. ; 30cm

Orientador: Rafael Noal Moresco

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Guaraná 2. *Paullinia cupana* 3. Hepatoproteção 4. Genoproteção 5. Tetracloreto de carbono I. Noal Moresco, Rafael II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO GUARANÁ (*Paullinia  
cupana* var. *sorbilis*) EM MODELO DE HEPATOTOXICIDADE  
INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS**

elaborada por  
**Helena Kober**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)**

---

**Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)**

Santa Maria, 12 de julho de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Professor Dr. Rafael Noal Moresco, orientador desta pesquisa, pela oportunidade, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelo tempo despendido.*

*Ao Professor Ricardo Brandão pelas essenciais contribuições e pela ajuda constante.*

*Aos meus amigos de laboratório, Bruna, Carine, Chicota, Etiane, Guilherme, Lara, Manuela, Naiara, Rafael, Renata, Sílvia, Taís, Vanessa e Zé por todo tipo de ajuda que recebi. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. O companheirismo, o respeito, a dedicação mútua, a amizade e a simples companhia de vocês fizeram o tempo passar muito rapidamente e tudo valer a pena. Vocês são especiais, nunca esqueçam.*

*Aos alunos do Laboratório de Toxicologia, principalmente Laísa, Maiara e Andréia, pela ajuda na manipulação e tratamento dos animais.*

*À professora Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz e aos alunos do Laboratório de Biogenômica, em especial Fernanda, Maria Fernanda, Luís Felipe e Alencar, pela colaboração e suporte técnico.*

*Aos meus colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela amizade, incentivo e palavras de motivação.*

*À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia pela excelência e por todas as oportunidades a mim oferecidas.*

*À minha família, amigos e namorado, pelo entusiasmo com as conquistas e pela paciência nos dias de mau humor. Vocês são simplesmente a minha razão de viver.*

*À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

*"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos."*

(Paulo Freire)

*"Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la."*

(Cícero)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) EM MODELO DE HEPATOXICIDADE INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS**

AUTOR: HELENA KOBER  
ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 12 de julho de 2013.

As doenças hepáticas representam um grave problema de saúde, uma vez que acometem um órgão de grande importância na manutenção da homeostase. A busca por fitoterápicos com capacidade hepatoprotetora vem aumentando, principalmente pelo fato dos produtos sintéticos utilizados para esse fim apresentarem efeitos adversos. O guaraná, obtido das sementes torradas da planta amazônica *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Sapindaceae), é um produto com ampla reputação como estimulante e como suplemento nutricional em condições de estresse físico e mental. Além disso, apresenta outras diversas propriedades biológicas, entre estas destacam-se os efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos e anti-obesogênicos. Entretanto, poucos estudos enfocam o possível potencial hepatoprotetor desta planta. Neste trabalho, os efeitos protetivos do guaraná sobre o dano hepático foram avaliados em ratos expostos ao tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). Ratos Wistar machos foram pré-tratados (gavagem) com pó de guaraná (100, 300 e 600 mg/Kg) ou com silimarina 100 mg/Kg durante o período de 14 dias. No 14<sup>a</sup> dia, para a indução de hepatotoxicidade, os animais receberam dose única, via intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> (1 mL/Kg; 50%, diluído em azeite de oliva). Após 24 h, amostras de sangue foram coletadas via retro-orbital para avaliação de parâmetros bioquímicos, os animais sacrificados e o tecido hepático removido para a realização do ensaio cometa. O tratamento com CCl<sub>4</sub> provocou dano hepático, demonstrado pela elevação significativa da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) no soro. Além disso promoveu um aumento significativo no índice de dano ao DNA. O pré-tratamento com guaraná, em todas as concentrações, foi significativamente efetivo em evitar a elevação da atividade de AST e ALT quando comparados ao grupo controle CCl<sub>4</sub>. O pré-tratamento com guaraná 300 mg/Kg promoveu uma diminuição no índice de dano ao DNA. O índice de dano no DNA mostrou significativa correlação positiva com as atividades de AST e ALT. Estes resultados indicam que o guaraná tem atividade hepatoprotetora e previne a quebra da fita do DNA em dano induzido por CCl<sub>4</sub> em ratos.

**Palavras-chave:** *Paullinia cupana*. Guaraná. Hepatotoxicidade. Efeito genoprotetor. Silimarina. Fígado.

## ABSTRACT

Master Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### ASSESSMENT OF HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA* VAR. *SORBILIS*) IN CCL<sub>4</sub>- INDUCED TOXICITY IN RATS

AUTHOR: HELENA KOBER  
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Place and Date: Santa Maria, July 12, 2013.

The liver diseases represent a relevant health problem, affecting once an organ of great importance in homeostasis maintaining. The search for herbal hepatoprotective capacity has been increasing, mainly because of the synthetic products used for this purpose may present adverse effects. Guaraná, obtained from the roasted seeds of the Amazonian plant *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Sapindaceae), is a product with a wide reputation as stimulant and a nutritional supplement in terms of physical and mental stress. It also presents several other biological properties, among them the antioxidant, antimicrobial, anticancer and anti-obesogenic. However, few studies focus on the potential hepatoprotective this plant. In this study, the protective effects of *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis* (guaraná) on liver damage were evaluated in rats exposed to carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Male Wistar rats were intra gastric pretreated with guaraná powder (100, 300 and 600 mg/Kg) or silymarin 100 mg/Kg daily for 14 days before treatment with a single dose of CCl<sub>4</sub> (50% CCl<sub>4</sub>, 1 mL/Kg, intraperitoneally). Rats were sacrificed 24 h later, and blood samples were collected for assaying serum biochemical parameters. The hepatic tissue was removed to perform the comet assay. CCl<sub>4</sub> induced liver damage and significantly increased the activities of Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST) in serum. In addition, CCl<sub>4</sub> increased the DNA damage index in hepatocytes. Pretreatment with guaraná in all concentrations was significantly effective in decreasing the ALT and AST activities when compared with CCl<sub>4</sub> treated group. Furthermore, the treatment with guaraná 300 mg/Kg decreased DNA damage index. In addition, the DNA damage index showed a significant positive correlation with AST and ALT. These results indicate that guaraná has hepatoprotective activity and prevents the DNA strand breakage in CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats.

**Keywords:** *Paullinia cupana*. Hepatotoxicity. DNA strand breakage. Genoprotective effect. Silymarin. Liver.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – O guaranazeiro .....	15
Figura 2 – O fruto do guaranazeiro .....	16
Figura 3 – Geração de espécies reativas e o dano hepático produzido pela ação do CCl <sub>4</sub> .....	24
Figura 4 – Classificação do dano ao DNA através da realização do ensaio cometa .....	30

## ARTIGO

Figura 1 – Effect of pretreatment with silymarin 100mg/Kg (Silymarin), guaraná 100 mg/Kg (G100), guaraná 300 mg/Kg (G300) and guaraná 600 mg/Kg (G600) on CCl <sub>4</sub> -induced DNA strand breakage. Values are expressed as mean and S.E.M of 5-8 rats.....	49
Figura 2 – Significant positive correlations between (A) DNA damage index and AST and (B) DNA damage index and ALT.....	50

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO**

Tabela 1 – Effects of guaraná pretreatment on serum biochemical parameters in CCl <sub>4</sub> intoxicated rats .....	48
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: alanina aminotransferase  
AST: aspartato aminotransferase  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOPP: produtos proteicos de oxidação avançada  
CAT: catalase  
CCl<sub>3</sub><sup>•</sup>: radical triclorometil  
CCl<sub>4</sub>: tetracloreto de carbono  
DEN: dietilnitrosamina  
EAC: carcinoma ascítico de Ehrlich  
ERNs: espécies reativas de nitrogênio  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
FAL: fosfatase alcalina  
FDA: *Food and Drug Administration*  
GGT:  $\gamma$ -glutamilttransferase  
GPx: glutationa peroxidase  
GR: glutationa redutase  
GSH: glutationa reduzida  
GST: glutationa-S-transferase  
HDL: *High Density Lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)  
HNO<sub>2</sub>: ácido nitroso  
HO<sup>•</sup>: radical hidroxila  
LDH: lactato desidrogenase  
LDL: *Low Density Lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)  
MDA: malondialdeído  
NO: óxido nítrico  
NO<sup>•</sup>: radical óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: ânion nitrato  
N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: óxido nitroso  
O<sub>2</sub><sup>-•</sup>: radical ânion superóxido  
OH<sup>-</sup>: ânion hidroxila  
ONOO<sup>-</sup>: ânion peroxinitrito  
OOCCL<sub>3</sub><sup>•</sup>: radical triclorometil peroxil  
PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular  
RO<sup>•</sup>: radical alcoxila  
ROO<sup>•</sup>: radical peroxila  
SIDA: Síndrome da imunodeficiência adquirida  
SOD: superóxido dismutase

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSM.....</b>	<b>62</b>
<b>Anexo B – Comprovantes de submissão do artigo científico .....</b>	<b>63</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 O guaraná</b> .....	15
1.1.1 Propriedades biológicas.....	17
1.1.2 Fitoquímica do guaraná .....	21
<b>1.2 Distúrbios hepáticos e modelos de hepatotoxicidade</b> .....	22
<b>1.3 Compostos vegetais e hepatoproteção</b> .....	24
<b>1.4 Principais marcadores bioquímicos de hepatotoxicidade</b> .....	25
<b>1.5 Estresse oxidativo e sua relação com a hepatotoxicidade</b> .....	28
<b>1.6 Hepatotoxicidade e dano ao DNA</b> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	33
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>ANEXOS</b> .....	62

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação de mestrado estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO e CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do manuscrito estão mencionadas no próprio.

# 1 INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão de suma importância, uma vez que desempenha um papel essencial na manutenção do equilíbrio biológico de vertebrados. As doenças hepáticas representam um grande problema de saúde devido às suas complicações e possibilidades de tratamento limitadas (MUKAZAYIRE et al., 2011). No mundo, somente os infectados com o vírus da hepatite C somam 185 milhões de indivíduos e no Brasil a estimativa de prevalência é de 2,3 milhões de infectados (HANAFIAH et al., 2013). Além disso, os fármacos convencionais utilizados no seu tratamento são por vezes inadequados e podem ter efeitos adversos. Assim, há uma tendência mundial para a pesquisa das plantas medicinais tradicionais, sendo que muitos produtos naturais de origem vegetal estão em uso para a prevenção e o tratamento de doenças do fígado (DHULEY e NAIK, 1997; VENKATESWARAN et al., 1997; LATHA et al., 1999; MITRA et al., 2000). As pesquisas de fitoterápicos para o tratamento de distúrbios hepáticos geralmente utilizam modelos animais de indução de hepatotoxicidade, sendo que o dano hepático promovido pela administração de tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) é um dos mais aceitos e difundidos (WEBER et al., 2003).

O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) tem sido largamente utilizado na indústria de medicamentos e cosméticos devido às suas versáteis atividades biológicas, as quais são atribuídas à presença de compostos bioativos em sua constituição (KLEIN et al., 2012). Um dos produtos típicos da biota amazônica mais conhecidos no Brasil e no exterior, o guaraná, ainda é um produto exclusivamente brasileiro e muito apreciado por suas qualidades energéticas e gastronômicas. O guaraná tem sido popular e amplamente usado como energético e estimulante do sistema nervoso central (HENMAN, 1982) e vários efeitos biológicos já foram evidenciados, com destaque especial para a atividade antioxidante (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005), efeito antimicrobiano (PINHEIRO et al., 1987; DA FONSECA et al., 1994; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), propriedades anticarcinogênicas e antitumorais (FUKUMASU et al., 2006; LEITE et al., 2011), efeitos anti-obesogênicos (BOOZER et al., 2001; BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005; OPALA et al., 2006) e potencial protetor contra doenças metabólicas, como hipertensão, obesidade e síndrome metabólica em idosos (COSTA KREWER et al., 2011)

Apesar de existirem estudos com o guaraná associando seus efeitos à saúde, são poucas as informações relatando suas propriedades hepatoprotetoras. Considerando o

consumo crescente de produtos à base de guaraná e os seus efeitos benéficos relatados pela literatura, torna-se importante a realização de estudos que ampliem o conhecimento sobre os efeitos hepáticos desta planta.

### 1.1 O guaraná

O guaranazeiro (Figura 1) é uma planta nativa da Amazônia, pertencente à família das sapindáceas, sendo encontrado em estado nativo nas regiões compreendidas entre os rios Amazonas, Maués, Paraná dos Ramos e Negro (estado de Amazonas) e na bacia do Rio Orinoco (Venezuela). Seu nome científico é *Paullinia cupana*, sendo que na Amazônia venezuelana e colombiana encontra-se de modo escasso a variedade *cupana*, enquanto na brasileira encontra-se a variedade *sorbilis*. Esta última, conhecida popularmente como guaraná, guaraná de Maués ou do Baixo Amazonas, foi a variedade cuja produção e comercialização se difundiu por várias regiões de clima favorável no Brasil (SUFRAMA, 2003) e que é utilizada popularmente para diversos fins medicinais.



Figura 1. O guaranazeiro. (Fonte: extraído de <http://www.caiabi.com.br/pt-br/publicacoes/guaranazeiro-saiba-mais-sobre-planta-paullinia-cupana>)

O guaranazeiro é um arbusto semi-ereto, trepador e lenhoso que, em seu habitat, se apoia nas árvores da floresta, atingindo altura de 9 a 10 metros (CORREIA, 1984). Possui folhas grandes, de verde acentuado, e frutifica em cachos. O fruto é redondo, preto e brilhante, assumindo a forma de uma cápsula deiscente de 1 a 3 válvulas, portanto uma



semente cada. Quando maduro, torna-se vermelho ou amarelo e faz surgir o arilo, substância branca que envolve parte da semente (Figura 2) (SUFRAMA, 2003).



Figura 2. Os frutos do guaranazeiro. (Fonte: extraído de <http://www.institutoamazonia.org.br>)

Do fruto do guaraná é possível obter a semente torrada, também conhecida como ramas. Destas, podem ser obtido o xarope (consumido diretamente como bebida energética ou usado para a produção de refrigerantes gaseificados), o bastão (usado para ralar e obter o pó para misturar a água e beber) ou o pó concentrado (geralmente acondicionado em frascos, cápsulas gelatinosas ou sachês, também utilizado na preparação caseira de bebida energética ou ingerido puro como tônico). De acordo com o levantamento feito pela Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA), a produção de ramas de guaraná no Brasil está estimada em 4.300 toneladas por ano, sendo que desse total 70% é absorvida pela indústria de refrigerante (sob a forma de xarope) e os 30% restantes abastecem o mercado interno e externo, na forma de pó, xarope e bastão. O Brasil ainda é o único país a produzir o guaraná em escala comercial (SUFRAMA, 2003).

O guaraná é uma das plantas mais conhecidas da biodiversidade da Amazônia brasileira e sua história está intimamente ligada à cultura e até à mitologia indígena local. Os índios Saturê-Mauê utilizam as sementes moídas do guaraná há centenas de anos para preparar bebidas para saciar a sede, a fome e principalmente o cansaço (KUSKOSKI et al., 2005). Além disso, usam o guaraná como estimulante e afrodisíaco (HENMAN, 1982). O conhecimento indígena acerca das propriedades do guaraná se difundiu para outras culturas e o mesmo, hoje, é popular e amplamente usado para diversos fins (SMITH e ATROCH, 2007).

Atualmente, *P. cupana* var. *sorbilis* é usada como ingrediente de bebidas não-alcólicas, refrigerantes e tônicos, bem como na fabricação de produtos de medicina alternativa (LIMA, et al., 2005; OTOBONE, et al., 2005). O guaraná é reconhecido como alimento seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA) (DUCAN et al., 2010) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005). Entre as principais motivações populares para o consumo do guaraná, estão: o aumento da capacidade cognitiva, a perda de peso, o uso como energético, assim como a melhora das performances física e sexual (O'DEA, 2003; OLIVEIRA et al., 2005; RAY et al., 2005).

### 1.1.1 Propriedades biológicas

Nos últimos anos a ciência, através de estudos *in vivo* e *in vitro*, vem pesquisando e comprovando muitos dos conhecimentos populares acerca do guaraná. Estudos em modelos animais e ensaios clínicos com humanos têm demonstrado que a ingestão de guaraná produz importantes resultados biológicos como o aumento do desempenho cognitivo (ESPINOLA et al., 1997; KENNEDY et al., 2004; OTOBONE et al., 2005), propriedades antiobesogênicas (BOOZER et al., 2001; BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005; OPALA et al., 2006) e propriedade antidepressiva (CAMPOS et al., 2005; OTOBONE et al., 2007). Além da comprovação destes usos populares, outras propriedades biológicas também já foram demonstradas, entre elas destacam-se, a atividade antioxidante (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005), antimicrobiana (PINHEIRO et al., 1987; BASILE et al., 2005; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), antialérgica (JIPPO et al., 2009) e as propriedades antimutagênica e anticarcinogênica (FUKUMASU et al., 2006, 2008, 2011). Além disso, estudos indicam que o guaraná possui efeitos cardioprotetores por inibir a agregação plaquetária (BYDLOWSKI et al., 1988; RAVI SUBBIAH e YUNKER, 2008).

Espinola et al. (1997) reportaram aumento nas capacidades físicas e efeitos anti-amnésia em ratos e camundongos tratados com pó da semente do guaraná submetidos aos testes de nado forçado e de esquiva passiva. Animais tratados com cafeína, nas mesmas concentrações encontradas no guaraná administrado, não tiveram melhora na capacidade física nem no desempenho mental, sugerindo que estes efeitos podem ocorrer em razão de outros componentes presentes no guaraná, diferentes da cafeína. Otobone et al. (2005) estudaram os efeitos do guaraná sobre o comportamento cognitivo de ratos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris e observaram que os animais que receberam tratamento

crônico com guaraná mostraram menor latência para encontrar a plataforma submersa comparados ao grupo controle, o que sugere efeito benéfico sobre a cognição.

A primeira evidência confirmando os efeitos psicotrópicos do guaraná em humanos foi dada por Kennedy et al. (2004). Estes pesquisadores demonstraram que o guaraná, e também sua associação com *Panax ginseng*, melhorou o desempenho cognitivo em comparação com o grupo placebo em indivíduos submetidos a uma série de testes padronizados. Em outro estudo duplo-cego, placebo controlado realizado com voluntários jovens e saudáveis que receberam quatro diferentes doses de guaraná (37,5 , 75, 150 e 300 mg, sendo que a concentração de cafeína em todas foi padronizada em 11 a 12%) foi verificado que as duas doses mais baixas produziram melhores efeitos cognitivos, melhora no desempenho da memória secundária e aumento de estado de alerta (HASKELL et al., 2007). Corroborando com estes achados, Kennedy et al. (2008) através de estudo duplo-cego, randomizado, demonstraram que administração de suplemento multivitamínico e mineral acrescido de guaraná (222mg) na forma de tablete efervescente em indivíduos sadios promoveu aumento na velocidade de desempenho em atividades cognitivas e a diminuição na fadiga mental após o consumo agudo. Além disso, a propriedade antidepressiva do guaraná foi demonstrada em animais submetidos ao teste de nado forçado (CAMPOS et al., 2005; OTOBONE et al., 2007).

Em relação às propriedades energéticas e antifatigantes do guaraná, o estudo de Miura et al. (1998) se destaca. Estes autores conduziram um experimento em que camundongos foram tratados com extrato aquoso de guaraná sendo submetidos a exercício físico e tratados com epinefrina, que induz a glicogenólise. O guaraná promoveu uma suspensão da hipoglicemia induzida pelo exercício via diminuição do conteúdo de glicogênio hepático que foi mobilizado para manter os níveis plasmáticos de glicose. Tais resultados corroboram fortemente com a hipótese de que o guaraná possui propriedades energéticas, já que a manutenção dos níveis glicêmicos diminui as sensações desconfortáveis provocadas pela hipoglicemia, incluindo fadiga. O efeito antifatigante do guaraná também foi demonstrado em humanos através de pesquisa com mulheres portadoras de câncer de mama submetidas à quimioterapia (CAMPOS et al., 2011).

Outra importante motivação para o uso do guaraná é a perda de peso. Procurando investigar as propriedades funcionais do guaraná na obesidade e obesogênese algumas pesquisas têm sido conduzidas. A primeira publicação a comentar a potencial associação do guaraná com a obesidade foi feita por Moreli e Zoorob (2000). Entretanto, as primeiras evidências anti-obesogênicas, foram demonstradas pelo trabalho de Boozer et al. (2001). Neste estudo, duplo-cego, placebo controlado, com indivíduos de ambos os sexos e com

duração de 2 meses, os resultados mostraram uma perda significativa de peso e gordura corporal, além de diminuição da circunferência abdominal e dos níveis séricos de triglicérides nos indivíduos tratados com um composto contendo guaraná e a erva chinesa Mahuang. Em outro estudo, foi observado um aumento de velocidade de esvaziamento gástrico e diminuição de peso em indivíduos que ingeriram guaraná (OPALA et al., 2006). Os efeitos anti-obesogênicos e o aumento no gasto calórico de indivíduos que ingerem guaraná tem sido atribuídos especialmente à cafeína e às catequinas de sua composição (BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005).

Costa Krewer et al. (2011) realizaram um estudo caso-controle sobre a ingestão de guaraná em uma amostra (n = 637) da população idosa do município Maués na Amazônia. Este estudo avaliou a ingestão habitual de guaraná sobre variáveis relacionadas às funções cardiometabólicas como biomarcadores antropométricos e sobre biomarcadores glicêmicos, lipídicos e de estresse oxidativo. Os sujeitos da pesquisa foram classificados como aqueles que faziam uso habitual do guaraná (GI) e aqueles que relatam nunca consumir o guaraná (NG). Os pesquisadores observaram menor prevalência de hipertensão, obesidade e síndrome metabólica no grupo GI. Além disso, os níveis de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) foram significativamente menores neste grupo.

Recentemente, interessados em elucidar os possíveis efeitos do guaraná sobre a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), um importante evento no desenvolvimento da aterosclerose, Portella et al. (2013) conduziram estudos *in vivo* e *in vitro*. Amostras séricas de idosos que ingeriam habitualmente o guaraná mostraram menor oxidação do LDL quando comparadas às amostras de idosos que nunca fizeram uso desta planta (redução de 27%). Além disso, neste trabalho o guaraná demonstrou *in vitro* uma alta atividade antioxidante e um aumento na resistência à oxidação do LDL. Os autores atribuem estes efeitos aos compostos polifenólicos presentes no guaraná e, apoiados nos achados de Costa Krewer et al. (2011) e Boozer et al. (2001), sugerem que seu consumo habitual ou sua eventual inclusão em dietas terapêuticas possa produzir benefícios à saúde e potencial defesa contra estresse oxidativo e desordem metabólica.

Estudo de Leite et al. (2011) demonstrou que guaraná é capaz de proteger contra dano testicular provocado por exposição ao cádmio, além disso, Campos et al. (2003) mostraram que o mesmo é capaz de promover proteção gástrica em lesões provocadas por etanol e indometacina. Os achados de Basile et al. (2005) sobre a atividade antimicrobiana do guaraná podem justificar o uso etnofarmacológico desta planta contra a diarreia e a disenteria, uma vez

que os autores demonstraram atividade desta planta contra alguns patógenos do trato digestório, entre eles *Escherichia coli*.

Bittencourt et al. (2013) avaliaram os efeitos protetores do extrato hidro-alcoólico de guaraná frente aos compostos gerados pela degradação do nitroprussiato de sódio, como o óxido nítrico (NO), em cultura de células fibroblásticas NIH-3T3 e verificaram que o guaraná foi capaz de diminuir a mortalidade celular, a peroxidação lipídica, o dano ao DNA e promover aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD). Estes resultados demonstram que o guaraná possui efeito antioxidante em situações onde há aumento dos níveis celulares de NO.

Quanto aos limites de segurança do guaraná, a ausência de toxicidade já foi demonstrada *in vivo* (ESPINOLA et al., 1997; MATTEI et al., 1998) e também em modelos *in vitro* em baixas concentrações (SANTA MARIA et al., 1998). A avaliação aguda e subcrônica de extrato semipurificado das sementes do guaraná, realizada por Antonelli-Ushirobira et al. (2010), revelou que a dose mais baixa (30 mg/Kg) não produziu nenhum efeito tóxico nos animais e nas doses de 150 e 300 mg/Kg, após 90 dias de tratamento, algumas alterações em marcadores hepáticos foram observadas no machos. Porém, estas concentrações são 50 e 100 vezes mais elevadas que as doses efetivas usadas por Otobone et al. (2005). Estes resultados indicam que o guaraná é um alimento seguro para o uso da população e o mesmo é assim classificado pelo FDA e pela ANVISA.

Com relação aos efeitos hepáticos da administração do guaraná, poucos estudos foram conduzidos. Dentre eles destacam-se o de Fukumasu et al. (2006), que reportaram que a administração de guaraná reduz a incidência e multiplicação de lesões pré-neoplásicas hepáticas induzidas pela administração de dietilnitrosamina (DEN) em camundongos. Este efeito foi atribuído à redução da proliferação celular determinado pela análise da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). No mesmo ano, também foi demonstrado que o guaraná possui efeito antígenotóxico ao proteger o DNA de hepatócitos de danos provocados pela administração de DEN (FUKUMASU et al., 2006). Além disso, este grupo de pesquisa demonstrou que camundongos induzidos à tumorigênese pulmonar e tratados com guaraná apresentaram 68,6% de redução na área abrangente pelo tumor, 57,9% de redução no índice de proliferação tumoral e 4,85% de aumento no índice apoptótico celular, quando comparados com os animais do grupo controle que não receberam o tratamento (FUKUMASU et al., 2008). Em nova pesquisa, o grupo constatou que o tratamento com guaraná, além de aumentar a sobrevivência de camundongos portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC), promoveu a diminuição da hemorragia e do volume do líquido ascítico, assim

como o decréscimo do número total de células cancerosas (54%) quando comparados aos animais controle que não receberam o tratamento. Estes efeitos estão relacionados ao fato do guaraná promover a diminuição da expressão da ciclina D1 e, assim, provocar a permanência das células cancerosas na fase G1 do ciclo celular, impedindo a proliferação celular (FUKUMASU et al., 2011) A ciclina D1 é produzida em excesso em uma variedade de carcinomas, sendo por isso considerada um pró-oncogênico (LU et al., 2003).

### 1.1.2. Fitoquímica do guaraná

As propriedades biológicas do guaraná são frequentemente relacionadas à sua composição química rica em compostos bioativos. O guaraná é rico em metilxantinas, tais como cafeína, teofilina e teobromina, além de conter taninos, ácido gálico, saponinas, catequinas, epicatequinas e outros compostos em menor concentração (HENMAN, 1982; BELLIARDO et al., 1985; HENMAN, 1986; SEIDEMANN, 1998). O transcriptoma do guaraná, estudado por Ângelo et al. (2008), mostra a presença de importantes compostos secundários nesta planta, incluindo sequências de transcrição, pelo menos 129, relacionados ao metabolismo dos flavonóides.

As metilxantinas, como a cafeína, são frequentemente reportadas como estimulantes do sistema nervoso central e também por agirem sobre os rins, estimulando a diurese, por estimularem o músculo cardíaco e produzirem relaxamento do músculo liso, em especial da musculatura brônquica (SIMÕES et al., 2004). Porém, estudos tem demonstrado que somente a presença de cafeína no guaraná não é suficiente para explicar todas as suas ações terapêuticas (ESPINOLA et al., 1997; OTOBONE et al., 2005). Além da cafeína, a semente do guaraná contém concentrações expressivas de compostos fenólicos, tais como catequinas, epicatequinas e taninos, e estes podem também estar relacionados com seus efeitos biológicos (MATTEI et al., 1998; FUKUMASU et al., 2006). Os compostos fenólicos ou polifenóis representam a classe mais abundante de antioxidantes da dieta humana, estando presentes em frutas, vegetais, chás, cereais, entre outros. Além de apresentarem propriedades redutoras, essas substâncias formam compostos intermediários estáveis, os quais apresentam na estrutura um anel aromático, que é responsável pelo sequestro de espécies reativas que podem causar peroxidação lipídica, danos a proteínas e ao DNA (SOUSA et al., 2007; QUIDEAU et al., 2011).

Os compostos bioativos encontrados no guaraná são similares aos encontrados no chá verde (*Camelia sinensis*) (BELLIARDO et al., 1985; ÂNGELO et al., 2008), uma planta

bastante estudada e com interessantes propriedades funcionais (BABU e LIU, 2008). Estudos demonstraram que os polifenóis do chá verde possuem efeitos antioxidantes, antitrombóticos, anti-inflamatórios, hipotensivos, hipocolesterolêmicos, anti-hipertensivos e anti-obesogênicos (YUNG et al., 2008). Assim, o guaraná, com suas raízes na cultura amazônica brasileira, emerge como potencial fonte de polifenóis e como alimento funcional plausível de alcançar difusão mundial de forma como ocorreu com o cacau, chá verde e o vinho.

## **1.2 Distúrbios hepáticos e modelos de hepatotoxicidade**

O fígado é um órgão com extraordinária pluralidade funcional. É um dos maiores órgãos humanos, no adulto pesa entre 1,2 e 1,5 Kg, está localizado abaixo do diafragma, no quadrante superior direito do abdome, protegido pelas costelas (BURTIS et al., 2008). Sua posição na cavidade abdominal favorece a captura, transformação, acúmulo e neutralização de substâncias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Assim, este órgão tem papel crítico e central no metabolismo, na digestão, no armazenamento, na detoxicação e na eliminação de substâncias do organismo (BURTIS et al., 2008). É um órgão hematopoiético com capacidade regenerativa e que possui microambientes imunológicos exclusivos (WATANABE et al., 2008). O fígado é um importante órgão alvo da toxicidade de fármacos e xenobióticos, os quais são absorvidos diretamente pelo intestino e transportados através do sangue portal para o fígado na forma concentrada. Nos últimos anos, o risco de intoxicação hepática tem aumentado pela alta exposição a toxinas ambientais, pesticidas e uso frequente de quimioterápicos (ORHAN et al., 2003).

Os danos ao fígado ocorrem principalmente devido ao consumo excessivo de álcool, infecções virais, e como consequência de efeitos adversos de medicamentos. As hepatites de etiologia viral são uns dos maiores problemas de saúde pública. A infecção pelo vírus da hepatite B é endêmica em muitas partes do mundo, estimando-se que existam, aproximadamente, 300 milhões de portadores crônicos deste vírus, cerca de 5% da população mundial (SCHIRALDI et al., 1992). No mundo o número de infectados pelo vírus da hepatite C é de 185 milhões de indivíduos e no Brasil a prevalência estimada é de 2,3 milhões de infectados (HANAFIAH et al., 2013).

A lesão hepática envolve processos de peroxidação lipídica, de alteração da permeabilidade das membranas celulares, modificação das atividades das enzimas ligadas às membranas e às proteínas de transporte, além de estar envolvida com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial (JAESCHKE et al., 2002). Geralmente a doença

hepática inicia-se com a hepatite e evolui para esteatose, fibrose, cirrose até o carcinoma hepatocelular (LOGUERCIO e FREDERICO, 2003; VITAGLIONE et al., 2004).

Hoje as doenças hepáticas constituem um problema médico de proporções mundiais (NEGI et al., 2008) e há um consenso geral de que o número de fármacos disponíveis e úteis está longe de ser suficiente. Assim, existe uma necessidade contínua de encontrar novas substâncias que possam prevenir e curar a lesão hepática, minimizando os efeitos adversos. Medicamentos à base de plantas têm sido intensamente estudados para determinar seus possíveis efeitos benéficos em lesões hepáticas (MURIEL e RIVER-ESPINOZA, 2008).

Para o estudo das patologias hepáticas e respectivas terapias são utilizados alguns modelos animais de indução de hepatotoxicidade. Os protocolos experimentais mais conhecidos empregam tetracloreto de carbono (SINGH et al., 2008; FENG et al., 2011), paracetamol (KUMAR et al., 2004; XU-YING et al., 2009), tiocetamida (GALISTEO et al., 2000; AHMAD et al., 2002) ou galactosamina (KOIZUMI et al., 2002; NAN et al., 2004; XING et al., 2011). Dentre estes, o tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) destaca-se por ser usado tanto para a indução de dano agudo, bem como de fibrose, esteatose, cirrose e carcinogênese, dependendo da rota de exposição escolhida (WEBER et al., 2003; LIMA et al., 2007). A administração aguda de  $\text{CCl}_4$  causa necrose e esteatose centrolobular. Na administração crônica, a repetida exposição promove a degeneração dos hepatócitos, ativando os mecanismos que culminam em fibrose e, posteriormente, em cirrose e carcinogênese (RECKNAGEL et al., 1989; JIMENEZ et al., 1992). Além disso, os danos causados pelo  $\text{CCl}_4$  são considerados análogos às lesões hepáticas causada por um variedade de hepatotoxinas em seres humanos (ZHU e FUNG, 2000) e o mesmo também induz alterações histológicas muito semelhantes às observadas em uma hepatite viral (WEBER et al., 2003), assim seu uso como indutor de hepatite também está bem estabelecido (JANAKAT e AL-MERIE, 2002).

A hepatotoxicidade induzida pelo  $\text{CCl}_4$  tem sua gênese em uma reação de desalogenação redutiva catalisada pelo citocromo P-450, presente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, sendo que o resultado desta biotransformação é a formação do radical triclorometil ( $\text{CCl}_3^\bullet$ ). Na presença de oxigênio, este radical é transformado em um radical ainda mais reativo, o triclorometil peroxil ( $\text{OOCCL}_3^\bullet$ ) (RECKNAGEL et al., 1989). Estes radicais atacam os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas biológicas, promovendo uma reação em cadeia que resulta na degradação estrutural das mesmas, na interrupção dos processos de energia celular e na síntese de proteínas (RECKNAGEL et al., 1989; PLAA, 2000; WEBER et al., 2003). Essa cadeia de reações direta ou indiretamente



interferem em moléculas celulares importantes (ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos) desordenando a fisiologia celular, aumentando a peroxidação lipídica, depletando o estoque de glutatona (RECKNAGEL et al., 1989) com consequente causa dano e/ou morte celular (WEBER et al., 2003; LIMA et al., 2007) (Figura 3). A bioativação do  $\text{CCl}_4$  é predominantemente executada pela isoenzima CYP2E, mas em altas doses deste composto outras isoformas são capazes de biotransformar este haloalcano (RAUCY et al., 1993; WEBER et al., 2003).

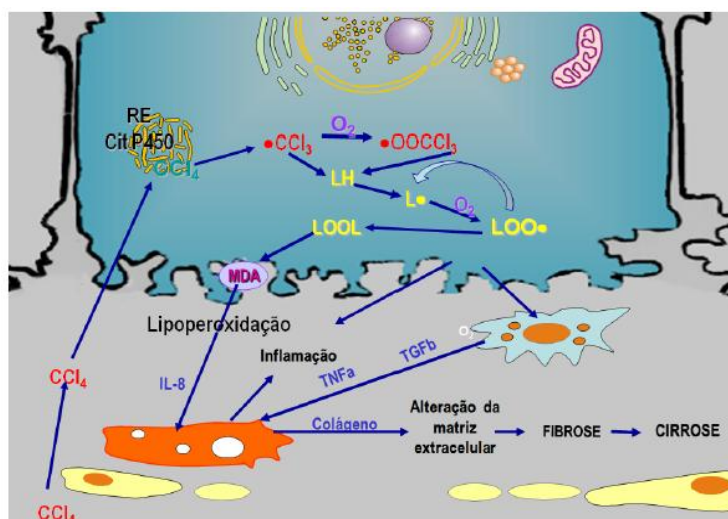


Figura 3. Geração de espécies reativas e o dano hepático produzido pela ação do  $\text{CCl}_4$ . (Fonte: adaptado de Pavanato et al., 2003).

### 1.3 Compostos vegetais e hepatoproteção

Com a falta de medicamentos úteis para o tratamento dos distúrbios hepáticos e o aumento substancial da utilização das chamadas terapias complementares, como o uso de plantas medicinais no tratamento de doenças hepáticas (STRADER et al., 2002; FOGDEN e NEUBERGER, 2003; HANJE et al., 2006), muitos trabalhos investigando a capacidade hepatoprotetora de compostos de origem vegetal tem surgido na literatura, com especial destaque para a silimarina.

A silimarina é um extrato derivado da semente da planta *Silybum marianum* (Milk Thistle), originária do sul da Europa, norte da África e Ásia Menor e bem aclimatada nas Américas do Sul e do Norte e Sul da Austrália (ABENAVOLI et al., 2010). *Silybum marianum* é uma das plantas mais bem pesquisadas no tratamento de doenças hepáticas (PRADHAN e GIRISH, 2006). O extrato é composto por um complexo de flavonoligninas

(silibina, isosilibina, silicristina e silidianina), sendo a primeira responsável por 60% do total e considerada o principal princípio ativo (SALLER et al., 2007). A atividade hepatoprotetora da silimarina foi demonstrada por vários pesquisadores de todo o mundo em relação a modelos de hepatectomia parcial e modelos tóxicos em animais experimentais usando paracetamol, tetracloreto de carbono, etanol e D-galactosamina (PRADHAN e GIRISH, 2006). Seu mecanismo de ação ainda está por ser definitivamente determinado e provavelmente é multifatorial como revisado por SALLER et al. (2007) e ABENAVOLI et al. (2010). Estes autores identificaram, a partir de estudos experimentais, que a ação hepatoprotetora da silimarina é encontrada em cinco sítios: (1) atividade antioxidante contra peroxidação de lipídios por capturar espécies reativas de oxigênio e aumentar a quantidade de glutatona; (2) habilidade de regular a permeabilidade da membrana dos hepatócitos aumentando sua defesa contra a agressão de xenobióticos; (3) ação anti-inflamatória agindo sobre o receptor do TNF-alfa, diminuindo a ação pró-inflamatória de diversos agentes agressores; (4) aumento da síntese proteica por estímulo da RNA-polimerase I, e esta propriedade promoveria a regeneração hepática tão importante na defesa do órgão contra doenças agudas e crônicas e finalmente (5) a diminuição da ativação das células estreladas, promovendo uma ação anti-fibrogênica.

A silimarina tem sido usada como fármaco padrão em diversos estudos envolvendo a investigação do potencial protetor, curativo e antioxidante de plantas em modelos animais de hepatotoxicidade (TUNG et al., 2009; HUANG et al., 2010; SOMASUNDARAM et al., 2010; PUSHPAVALLI et al., 2010; VUDA et al. 2012).

Além da silimarina, alguns produtos vegetais são usados como hepatoprotetores e já mostraram eficácia na proteção hepática contra toxicidade induzida por CCl<sub>4</sub>, geralmente por serem ricos em compostos com capacidade antioxidante, como os polifenóis. Entre estes produtos vegetais, destacam-se a curcumina, extraída da planta asiática *Curcuma longa* L., popularmente conhecida como açafrão-da-terra (REYES-GORDILLO et al., 2008; BISHT et al., 2011; HASSAN e AL-OLAYAN, 2012) e a glicirrizina, extraída da planta *Glycyrrhiza glabra* L., o alcaçuz (WAN et al., 2009; YIN et al., 2011).

#### **1.4 Principais indicadores bioquímicos de hepatotoxicidade**

Vários marcadores bioquímicos podem ser utilizados para avaliar alterações hepáticas. A aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas e parâmetros histológicos (HSIAO et al., 2003; SUJA et al., 2004) são empregados como

indicadores de lesão hepática. A fosfatase alcalina (FAL) e  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) são marcadores de colestase (GALISTEO et al., 2000; AHMAD et al., 2002; SHANKAR et al., 2003). Já a função hepática pode ser avaliada através dos níveis de proteínas plasmáticas, como a albumina, amônia (GALISTEO et al., 2000) e marcadores de coagulação.

A albumina é a proteína sérica mais comumente medida e é sintetizada exclusivamente pelos hepatócitos. Tem a meia-vida longa, de 15 a 20 dias, com 4% degradada a cada dia, por isso é marcador ruim para disfunção hepática aguda. Hipoalbuminemia é mais comum em hepatopatias crônicas como a cirrose, e usualmente reflete dano hepático grave e síntese baixa da proteína. (ZAIA et al., 1998). A hipoalbuminemia não é específica para doença hepática, podendo ocorrer em desnutrição proteica de qualquer causa, enteropatias perdedoras de proteínas, glomerulopatias com albuminúria e síndrome nefrótica.

A bilirrubina é um pigmento amarelo-alaranjado derivado da degradação do heme. É extraída e biotransformada no fígado e excretada na bile e na urina. A bilirrubina é transportada para o fígado, fracamente associada à albumina, em sua forma nativa não conjugada lipossolúvel (bilirrubina indireta). Transportada para o interior do hepatócito, ela é rapidamente conjugada para produzir os glicoronídeos de bilirrubina (bilirrubina direta), tornando-se mais hidrossolúvel (MOTTA, 2003; BURTIS et al., 2008). O aumento da bilirrubina indireta indica uma superprodução de bilirrubina, geralmente causada por hemólise, ou uma redução do metabolismo no fígado basicamente por defeitos congênitos. Com insuficiência hepática grave, a doença pode causar, primariamente, hiperbilirrubinemia não conjugada. O aumento da bilirrubina direta geralmente resulta de hepatite aguda ou colestase (bloqueio ou supressão do fluxo da bile). Assim, elevações de bilirrubina direta constituem marcadores altamente específicos de disfunção hepática (exceto em raros distúrbios hereditários, como a síndrome de Dubin-Johnson) (BURTIS et al., 2008).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente no citoplasma de todas as células do organismo, sendo rica no miocárdio, no fígado, no músculo esquelético, nos rins e nos eritrócitos. Devido a sua presença em vários tecidos, sua alteração não é um resultado específico, precisa ser analisado em conjunto com outros parâmetros (MOTTA, 2003). As elevações na atividade de LDH são observadas na doença hepática, mas essas elevações não são tão grandes quanto os aumentos das atividades de aminotransaminases.

A FAL pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas amplamente distribuídas nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado (membrana dos canalículos biliares), túbulos renais, ossos (osteoblastos) e placenta. A forma predominante no soro em adultos normais origina-se, principalmente, do fígado e ossos. Esta enzima está

elevada nas desordens do trato biliar. Quando há impedimento no fluxo biliar, a FAL atinge 2-3 vezes os valores de referência (podendo chegar a 10-15 vezes), dependendo do grau de estase biliar. Um aumento similar é visto em pacientes com câncer hepático primário avançado ou com metástases secundárias generalizadas. Na hepatite infecciosa, a atividade sérica de FAL é apenas moderadamente elevada ou mesmo normal. As determinações das atividades das diferentes isoenzimas são de maior valor quando coexistem doenças hepáticas e ósseas (MOTTA, 2003; BURTIS et al., 2008).

Mesmo o tecido renal tendo a maior concentração de GGT, a enzima presente no soro se origina primariamente do sistema hepatobiliar. Ela é um indicador sensível da presença de doença hepatobiliar, estando elevada na maioria dos indivíduos com doença hepática independente da causa. Sua utilidade clínica, entretanto, é limitada devido a falta de especificidade. Como a FAL, ela é mais alta nos casos de obstrução biliar e também está bastante elevada em pacientes com neoplasmas hepáticos primários ou metastáticos. Aumentos menores e transientes são observados em casos de intoxicação por xenobióticos. Além disso, a atividade desta enzima está aumentada em pacientes com hepatite alcoólica e na maioria do soro de pessoas que são etilistas pesados (MOTTA, 2003; BURTIS et al., 2008).

As aminotransaminases (transaminases) são enzimas amplamente distribuídas no organismo. A AST é encontrada principalmente no coração, no fígado, no músculo esquelético e no rim. A ALT é encontrada principalmente no fígado e no rim. A ALT é exclusivamente citoplasmática; tanto formas mitocondriais quanto citoplasmáticas de AST são encontradas nas células (BURTIS et al., 2008). A doença hepática é a causa mais importante de aumento de atividade de transaminases no soro. Na maioria dos tipos de doenças hepáticas, a atividade de ALT é maior do que a de AST. Embora as atividades de AST e ALT se tornem elevadas sempre que um processo patológico afeta a integridade da célula hepática, a ALT é a enzima mais específica para o fígado. As elevações séricas da atividade de ALT são raramente observadas em outras condições além da doença parenquimal hepática (BURTIS et al, 2008). Segundo Kaneko et al. (1997) os níveis séricos de ALT aumentam quando ocorrem alterações na permeabilidade ou injúria nos hepatócitos. Foi demonstrado que a elevação das enzimas hepáticas no soro, especialmente ALT, tem grande importância como um marcador específico de lesão hepática provocada por drogas tóxicas, álcool e vírus (SHERLOCK e DOOLEY, 2002).

Na investigação de dano hepático agudo, através do uso de modelos animais de hepatotoxicidade, as aminotransaminases (AST e ALT) são os parâmetros mais frequentemente utilizados. Está bem estabelecido que agentes químicos, tais como o CCl<sub>4</sub>,

causam lesões hepáticas promovendo grandes aumentos nas atividades séricas tanto de AST quanto de ALT (WEBER et al., 2003).

### **1.5 Estresse oxidativo e sua associação com a hepatotoxicidade**

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas, principalmente radicais livres, e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo dano oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), são produzidas de forma contínua em concentrações fisiológicas pelo metabolismo celular. No entanto, em situação de desequilíbrio entre a formação e a remoção dessas espécies decorrentes da diminuição dos antioxidantes endógenos, ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes, é gerado um estado pró-oxidante característico do estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006; VALKO et al., 2007).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O excesso de espécies reativas no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (1995), antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias que retardem ou previnam o dano oxidativo a uma molécula. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD) ou, não enzimaticamente, a exemplo de glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido dihidrolipóico (FINKEL e HOLBROOK, 2000). Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina-E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (HALLIWELL, 1995; PIETTA, 2000)

Quando estabelecido, o estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das EROs e ERNs a componentes celulares, podendo resultar em danos oxidativos a macromoléculas e diversas estruturas celulares que, na ausência de reparação podem alterar a funcionalidade das células, tecidos e órgãos. Ele está envolvido em uma grande variedade de condições patológicas, tais como artrite, choque hemorrágico, diabetes, aterosclerose, catarata, disfunções cognitivas, câncer e SIDA podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro

geral (HALLIWELL et al., 1992; DHALA et al., 2000; PIWOWAR et al., 2007; VICTOR et al., 2009).

Há evidências crescentes de que a alteração do estado redox celular, com a produção de EROs, desempenha um papel crucial nas diversas fases que iniciam e regulam a progressão das doenças hepáticas, independentemente do tipo de agente etiológico (MORISCO et al., 2008). Já foi demonstrado que EROs estão envolvidas na lesão hepática induzida por álcool, vírus, alteração do metabolismo de lipídios e carboidratos e por xenobióticos (LOGUERCIO et al., 2001). Além disso, o estresse oxidativo influencia a transcrição de vários mediadores bioquímicos (principalmente citocinas pró-inflamatórias) capazes de modular eventos celulares e teciduais, como a apoptose, colestase, fibrose e regeneração, que caracterizam os diferentes tipos de lesão hepática (TILG e DIEHL, 2000).

O estresse oxidativo está envolvido na hepatotoxicidade provocada pelo CCl<sub>4</sub>, na qual as espécies reativas de oxigênio têm importante papel. Hsu et al. (2009) observaram, em modelo animal, que o CCl<sub>4</sub> induziu uma diminuição da atividade antioxidante de algumas enzimas, como a SOD, a CAT, GPx e a glutatona redutase (GR), além de um aumento nos níveis de malonaldeído (MDA), biomarcador de liperoxidação, e depleção dos níveis de glutatona (GSH). Estes resultados estão de acordo com os observados por Sashreen et al. (2011).

## **1.6 Hepatotoxicidade e dano ao DNA**

O fígado, sendo o órgão mais importante no metabolismo dos xenobióticos, é muitas vezes alvo da toxicidade induzida por esses compostos. A ação direta destes ou dos produtos de sua metabolização pelo fígado pode ocasionar danos às diversas estruturas celulares hepáticas. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e ao RNA e que podem alterar a estrutura e função destas biomoléculas. Lesões no DNA podem bloquear os processos de replicação e transcrição, e, se não reparados ou reparados incorretamente, podem levar a mutações pontuais (alteração de um único par de bases do DNA ou um pequeno número de pares de base adjacentes) ou a aberrações cromossômicas (alterações na estrutura ou número de cópias de cromossomos), comprometendo a viabilidade da célula (GRIFFITHS et al., 2009; JACKSON e BARTEK, 2009). Além disso, o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese (BARREIROS e DAVI, 2006).

A estreita relação entre eventos genotóxicos e um grande número de doenças, como as hepáticas, torna importante a realização de testes que permitem a identificação de agentes

com potencial indutor e/ou protetor de alterações genéticas. Dentre os testes usados para a avaliação de dano ao DNA, destaca-se o teste cometa. Também conhecido como “*Single Cell Gel Assay*”, o teste cometa é uma técnica rápida, simples, sensível e de baixo custo usada para mensurar e analisar as lesões e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos (SINGH et al., 1995; DA SILVA, 2000; TICE et al., 2000; COLLINS, 2004). Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, pois pode ser utilizado para qualquer tipo de células nucleadas, é necessário um pequeno número das mesmas e não requerer células em divisão (HARTMANN e SPEIT, 1997).

Neste ensaio, as células são aplicadas em um gel de agarose sobre uma lâmina de vidro e a seguir lisadas e submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. A presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e crosslinks resultantes da ação de compostos genotóxicos, altera a estrutura do DNA das células, que normalmente está superenrolado e fortemente compactado, causando relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao anodo. Desta forma, após aplicação de corantes específicos, pode-se visualizar em microscópio a migração do DNA, que se assemelha a um cometa. A distância de migração do DNA celular durante a eletroforese reflete diretamente a extensão do dano ao DNA. O dano às células geralmente é pontuado de acordo com o comprimento da cauda e recebem pontuação de 0 (ausência de migração) a 4 (migração máxima) como mostrado na figura 4 (SINGH et al., 1995; TICE et al., 2000; NADIN et al., 2001).

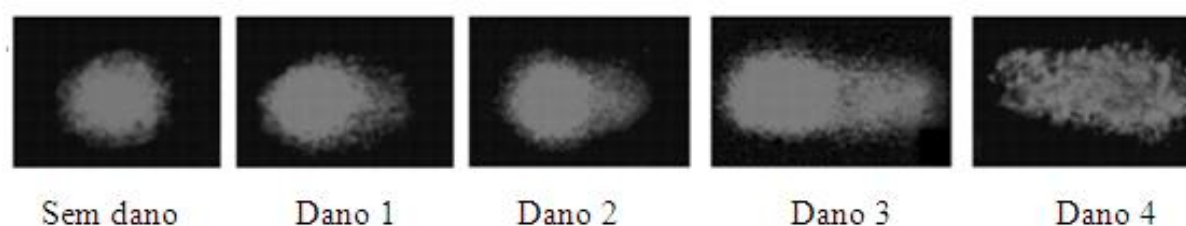


Figura 4. Classificação do dano ao DNA através da realização do ensaio cometa. Quanto maior o nível de dano, maior o comprimento da cauda e maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano. (Fonte: adaptado de Tatsch et al., 2011)

Trabalhos científicos têm demonstrado uma associação entre a hepatotoxicidade induzida por  $\text{CCl}_4$  e a fragmentação do DNA. Este composto não é diretamente genotóxico e mutagênico, porém, indiretamente, pela ação dos seus metabólitos reativos, que são citotóxicos e oxidantes, é capaz de promover efeitos deletérios sobre a estrutura dos ácidos

nucléicos (MANIBUSAN et al., 2007). A indução de dano hepático pela administração de  $\text{CCl}_4$  tem sido extensivamente estudada e é largamente usada como modelo de triagem de hepatoprotetores, sendo este composto hábil em provocar dano às estruturas do DNA e RNA, seu uso na triagem de genoprotetores também se torna possível.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar as atividades hepatoprotetora e genoprotetora do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito preventivo do guaraná sobre o dano hepático, induzido por CCl<sub>4</sub>, através da mensuração das enzimas AST, ALT e de albumina no soro dos animais do estudo;
- Avaliar a atividade genoprotetora do guaraná através da realização do ensaio cometa no tecido hepático dos animais do estudo;
- Avaliar o efeito do guaraná sobre a função renal através da dosagem dos níveis séricos de creatinina e uréia;
- Investigar a associação entre o dano ao DNA e os marcadores bioquímicos de hepatotoxicidade;
- Comparar os efeitos do pré-tratamento com guaraná com os efeitos do pré-tratamento com silimarina na prevenção do dano hepático induzido por CCl<sub>4</sub>.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os itens “Materiais e Métodos”, “Resultados” e “Discussão” referentes a esta dissertação estão apresentados sob a forma do manuscrito a seguir. O mesmo foi submetido e está organizado nas normas da revista *Plant Foods for Human Nutrition* com o título de “*Genoprotective e hepatoprotective effects of Paullinia cupana Mart. var. sorbilis on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats*”.

**Genoprotective e hepatoprotective effects of *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis* on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats.**

Helena Kober<sup>1</sup>, Etiane Tatsch<sup>2,3</sup>, Vanessa Dorneles Torbitz<sup>3</sup>, Lara Peruzzolo Cargini<sup>3</sup>,  
Manuela Borges Sangoi<sup>1,3</sup>, Guilherme Vargas Bochi<sup>1,3</sup>, Andreia Regina Haas da Silva<sup>2</sup>,  
Fernanda Barbisan<sup>1</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

\*Corresponding author: Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

**Abstract**

The protective effects of *Paullinia cupana* (guaraná) on liver damage were evaluated in rats exposed to carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Male Wistar rats were pretreated with guaraná powder (100, 300 and 600 mg/Kg) or silymarin 100 mg/Kg daily for 14 days before treatment with a single dose of CCl<sub>4</sub> (50% CCl<sub>4</sub>, 1 mL/Kg, intraperitoneally). The treatment with CCl<sub>4</sub> significantly increased the serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). In addition, CCl<sub>4</sub> increased the DNA damage index in hepatocytes. Guaraná in all concentrations was effective in decreasing the ALT and AST activities when compared with CCl<sub>4</sub> treated group. The treatment with guaraná 300 mg/Kg decreased DNA damage index when compared with CCl<sub>4</sub> treated group. In addition, the DNA damage index showed a significant positive correlation with AST and ALT. These results indicate that guaraná has hepatoprotective activity and prevents the DNA strand breakage in CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats.

**Keywords:** Hepatoprotective; Genoprotective; *Paullinia cupana*; Liver

## Introduction

The liver is the largest and most complex organ in the body and it is responsible for a large variety of exocrine and endocrine functions involving mainly synthesis, storage and metabolism. Liver injury can be caused by toxic chemicals, drugs, and virus infiltration from ingestion or infection [1]. The risk of liver toxicity is increased by the high exposure to environmental toxins, pesticides and frequent use of chemotherapy [2]. The lack of effective modern medications to treat acute and chronic liver injury [3] has led to research into the hepatoprotective activity of numerous medicinal plants using various experimental models. Carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) is a potent, lipid-soluble hepatotoxic agent which is widely used as a model for screening hepatoprotectors [4]. The administration of  $\text{CCl}_4$  to rats is an accepted experimental model to produce damage to liver. Liver injuries induced by  $\text{CCl}_4$  are mediated through the formation of reactive intermediates such as trichloromethyl radical ( $\text{CCl}_3\cdot$ ) and its derivative trichloromethyl perox radical ( $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ ) generated by cytochrome P-450 of liver microsomes. These free radicals are thought to react with membrane lipids leading to their peroxidation [5].

*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis* (Sapindaceae), popularly called guaraná, is a plant originated in Brazil that has been used for centuries as a stimulant by the Saturê-Mauê, which is an indigenous tribe living in the Amazon region [6]. The pharmaceutical industry uses the seeds in the production of medicines, and food industry uses them mainly in soft drinks and food supplements [7]. The popular motivations for consuming guaraná extracts as dietary supplements are: weight loss, energy boost, improvement of fitness and sexual performance, and increase of cognitive capacity [8, 9, 10]. Several biological effects of guaraná have been demonstrated such as antioxidant activity [11, 12], antimicrobial effects [13, 14, 15], anticarcinogenic properties [16, 17], improvement in cognitive performance [18, 19], antidepressive effects [20, 21], and enhanced weight loss [22, 23]. Recently, our team has

reported that habitual guaraná ingestion contributes positively to the prevention of various metabolic disorders in elderly [24]. Although there are studies reporting different biological activities of guaraná, little information is available on its effects on the liver, especially in the hepatotoxicity model induced by CCl<sub>4</sub>. Therefore, considering the growing consumption of guaraná by the population and its benefits already reported in the literature, the present study aimed to evaluate the potential hepatoprotective and genoprotective effects of powder seeds from guaraná on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats.

## Materials and Methods

### Chemicals

Silymarin was purchased from the Sigma Chemicals Co. St. Louis, USA. All other chemicals and reagents used were obtained from local sources and were of analytical grade.

### *Paullinia cupana* powder

*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis* powder was supplied by EMBRAPA, Amazônia Ocidental (Agropecuary Research Brazilian Enterprise) and was conserved dry and protected from light at -20° C until administration. The solution administered to the animals was prepared on the day of use by diluting the guaraná powder in water.

### Animals

Adult male Wistar rats (280-320 g) from Central Animal House of Federal University of Santa Maria (UFSM) were used. The animals were housed in cages and kept on a 12 h light/dark cycle, at a room temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food and water for 1 week before and during the experiments. The present study has been approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UFSM, Protocol n. 027/2012.

## Treatment

The animals were randomly divided into six groups of 5-8 rats each. Group 1 served as normal control and received orally vehicle (water) daily for a period of 14 days. Group II served as CCl<sub>4</sub> control and also received orally vehicle daily for a period of 14 days. Group III served as hepatoprotective control and received silymarin (100 mg/Kg) daily for a period of 14 days. Groups IV–VI received, orally, the guaraná powder dissolved in water at doses of 100, 300, and 600 mg/kg, respectively, daily for a period of 14 days. On day 14, one hour after treatment, animals of groups II, III, IV, V and VI were injected with a single intraperitoneally (i.p.) dose of carbon tetrachloride (1 ml/kg, 50% CCl<sub>4</sub> in olive oil) to induce hepatotoxicity.

## Blood collection and biochemical measurements

Blood samples were obtained by collecting retro-orbital 24 h after the end of the indicated treatments into tubes without anticoagulant. The samples were centrifuged for 15 min at 2800 rpm, and serum was used to measure the aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities as well as the levels of albumin, glucose, total cholesterol, creatinine, urea and nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>). Serum levels of albumin, creatinine, glucose, total cholesterol, urea and activities of AST and ALT were analyzed using standard techniques (Bioclin Quibasa, Belo Horizonte-MG, Brazil) on Cobas MIRA<sup>®</sup> automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). NO<sub>x</sub> was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira automated analyzer as previously described [25].

## Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al [26] in accordance with the general guidelines for the use of the comet assay [27, 28]. The samples of

liver were rapidly removed to perform the comet assay. Hepatocytes were suspended in 0.7% low-melting-point agarose and phosphate buffered saline (PBS) at 37°C and placed on microscopic slides with a layer of 1% agarose. The slides were immersed in lysis solution at 4°C for 1 h, and followed by electrophoresis at 25 V, 300 mA, for 40 min at steady temperature. The slides were then silver-stained as described by Nadin et al. [29]. All steps, from sample collection to electrophoresis, were conducted under yellow light to minimize the possibility of cellular DNA damage. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). Slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

#### Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test was used to determine statistical differences between the groups. Pearson correlation was assessed to evaluate the association between the variables. Statistical significance was assumed at  $p < 0.05$ .

#### Results

The serum biochemical data for the evaluation of CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity are showed in Table 1. There was a significant increase of serum ALT (about 37 times) and AST (about 22 times) activities in CCl<sub>4</sub> group when compared to the control group ( $p < 0.001$ ). Pre-treatment with silymarin and guaraná in all concentrations used in this experiment significantly decreased AST and ALT activities ( $p < 0.01$ ). No significant difference was



observed for glucose, total cholesterol, triglycerides, albumin, urea, creatinine or NOx between the groups. CCl<sub>4</sub> group presented significantly higher DNA damage index than the control group, as can be seen in Figure 1. The pretreatment with guaraná powder at 300 mg/kg provided a significant decrease in the rate of DNA damage when compared with the CCl<sub>4</sub> group. In addition, the DNA damage index showed significant positive correlations with AST ( $r=0.43$ ,  $p=0.0053$ ) and ALT ( $r=0.39$ ,  $p=0.0120$ ), as shown in Figure 2.

## Discussion

Hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub> is the most commonly used model system for the screening of hepatoprotective activity of plant extracts and drugs [30]. In this study, we reported at first time the hepatoprotective and genoprotective effects of guaraná in CCl<sub>4</sub>-hepatotoxicity induced in rats. In addition, we observed similar hepatoprotective effects of guaraná in comparison with sylimarin, which is a well documented hepatoprotective agent. We used an experimental model of CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatotoxicity in rats because this chemical is a potent hepatotoxin and a single exposure can rapidly lead to severe hepatic necrosis and steatosis [5, 31]. It is well known that chemical agents, such as CCl<sub>4</sub>, produce hepatic injury causing large increases in both ALT and AST activities [32]. These enzymes are employed in the evaluation of hepatic disorders and an increase in these enzyme activities reflects acute liver damage and hepatocellular disorders. Since these enzymes are cytoplasmic in nature, upon liver injury, these enzymes enter into the circulatory system due to altered permeability of membrane [33]. In the present study, a single dose intraperitoneally of CCl<sub>4</sub> caused an accentuated elevation in ALT and AST activities in serum, indicating that liver is susceptible to CCl<sub>4</sub>-induced toxicity. In contrast, the increased levels of these markers were significantly inhibited by the pretreatment with guaraná in all concentrations. The AST activity in the groups pre-treated with guaraná was 4 to 7 times lower than in the CCl<sub>4</sub> group,

whereas the ALT activity was 4 to 6 times lower. This reduction was also observed in the group treated with silymarin. We postulate that guaraná may stabilize the hepatic cellular membrane and protect the hepatocytes against toxic effects of CCl<sub>4</sub>, which may decrease the rate of leakage of the enzymes into the bloodstream.

Previous studies have reported that oxidative stress plays an essential role in the hepatic injury mediated by CCl<sub>4</sub> [5, 32, 34]. Oxidative stress not only damages cellular proteins and lipids, but also significantly affects DNA and generates various base modifications [35, 36]. This is of special importance because its accumulation and inheritance generations results in altered genotypes and functionally deficient cells [37, 38]. In the present study, we carried out the comet assay to determine the possible protective role of the guaraná against CCl<sub>4</sub>-induced DNA damage. This test is widely used to evaluate the genotoxic potential of chemicals and environmental contaminants that can induce oxidative stress leading to hepatic injury [39]. The results obtained with the comet assay in the present study show that the administration of a single dose of CCl<sub>4</sub> promoted a significant increase in the DNA damage index when compared to the control group. In addition, the pretreatment with guaraná 300 mg/Kg significantly decreased DNA damage index when compared with CCl<sub>4</sub> group, demonstrating the genoprotective effect of guaraná. Furthermore, we also observed that the pretreatment with guaraná in other concentrations showed a potential to prevent DNA damage, although not significantly. Our results are in agreement with Fukumasu et al [16], who demonstrated that guaraná has a protective effect against *N*-nitrosodiethylamine (DEN)-induced DNA damage in mouse liver. In addition, we also observed that the DNA damage index was positively correlated with AST and ALT activities, suggesting that CCl<sub>4</sub> promotes the DNA breakage as well as the release of enzymes from hepatocytes.

Several studies have reported that guaraná shows a number of beneficial effects probably because this plant is a source of bioactive substances with multifaceted activity.

Guaraná is rich in methylxanthines such as caffeine, theobromine and theophylline, and contains tannins, saponins, catechins, epicatechins, proanthocyanidols as well as trace concentrations of many other compounds [40]. Studies *in vitro* have evidenced the antioxidant effects of guaraná [11, 12, 15] probably due to a high concentration of polyphenols, such as tannins [11]. We infer that the hepatoprotective effects of guaraná observed in this study may be attributed to the action of several bioactive compounds present in guaraná. Thus, we suggest that these effects may have been caused by the action of the joint or isolated bioactive compounds in guaraná. However, in this study it was not possible to isolate these bioactive compounds or to evaluate their biological activity in isolation.

## **Conclusions**

This study demonstrates that guaraná has hepatoprotective activity and prevents the DNA strand breakage in CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. Guaraná is a well-known and widespread plant used popularly, and new reports assessing other biological activities are of interest. In this context, additional studies are required to investigate other activities of guaraná, such as the effects of its isolated compounds in different models.

## **Acknowledgments**

The authors thank Taís Côrrea Almeida, Alencar Kolinski Machado, Laíza Dalmolin and Ricardo Brandão for technical support and CNPq and CAPES for providing fellowships.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Lee SH, Heo SI, Li L, Lee MJ, Wang MH (2008) Antioxidant and hepatoprotective activities of *Cirsium setidens* NAKAI against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Am J Chin Med* 36:107-114
2. Orhan DD, Aslan M, Aktay G, Ergum E, Yesilada E, Ergum F (2003) Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. *Life Sci* 72:2273-2283
3. Subramoniam A, Pushpangadan P (1999) Development of phytomedicines for liver disease. *Indian J Pharmacol* 31:166-75
4. Wang T, Sun NL, Zhang WD, Li HL, Lu GC, Yuan BJ, Jiang H, She JH, Zhan GC (2008) Protective effect of dehydrocavidine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol* 117:300-308
5. Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL (1989) Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43:139-154
6. Henman AR (1982) Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. *J Ethnopharmacol* 6:311-338
7. Ortega GG, Schenkel EP, Athayde ML, Mentz LA (1989) Brasilianische Phytotherapeutika. Ihre rolle im Arzneimittelmkt. *Dtsch Apoth Ztg* 129:1847-1848
8. O'Dea JA (2003) Consumption of nutritional supplements among adolescents: usage and perceived benefits. *Health Educ Res* 18:98-107
9. Oliveira CH, Moraes ME, Moraes MO, Bezerra FA, Abib E, De Nucci G (2005) Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers. *Phyther Res* 19:54-57

10. Ray S, Phadke S, Patel C, Hackman RM, Stohs S (2005) Short-term and long-term in vivo exposure to an ephedra and caffeine containing metabolic nutrition system does not induce cardiotoxicity in B6C3F1 mice. *Arch Toxicol* 79:330-340
11. Mattei R, Dias RF, Espínola EB, Carlini EA, Barros SB (1998) Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *J Ethnopharmacol* 60:111-116
12. Basile A, Ferrara L, Pezzo MD, Mele G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D (2005) Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana*. *J Ethnopharmacol* 102:32-36
13. Pinheiro CE, De Oliveira SS, Da Silva SM, Poletto MI, Pinheiro CF (1987) Effect of guaraná and *Stévia rebaudiana* Bertoni (leaves) extracts, and stevioside, on the fermentation and synthesis of extracellular insoluble polysaccharides of dental plaque. *Rev Odontol Univ Sao Paulo* 1:9-13
14. Da Fonseca CA, Leal J, Costa SS, Leitão AC (1994) Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutat Res* 321:165-173
15. Yamaguti-Sasaki E, Ito LA, Canteli VC, Ushirobira TM, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV, de Mello JC (2007) Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* 12:1950-1963
16. Fukumasu H, Avanzo JL, Heidor R, Silva TC, Atroch A, Moreno FS, Dagli ML (2006) Proctetive effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var *sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food Chem Toxicol* 44:862-867
17. Leite RP, Wada RS, Monteiro JC, Predes FS, Dolder H (2010) Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pretreatment on cadmium -induced damages in adult Wistar testis. *Biol Trace Elem Res* 141:262-74

18. Espínola EB, Dias RF, Mattei R, Carlini EA (1997) Pharmacological activity of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *J Ethnopharmacol* 55:223-229
19. Kennedy DO, Haskell CF, Wesnes K A, Scholey AB (2004) Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guaraná (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. *Pharmacol Biochem Behav* 79:401-411
20. Campos AR, Barros AI, Albuquerque FA, Leal LK, Rao VS (2005) Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. *Phytoter Res* 19:441-443
21. Otobone FJ, Sanches AC, Nagae R, Martins JV, Sela VR, de Mello JC, Audi EA (2007) Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytoter Res* 21:531-535
22. Boozer CN, Nasser JA, Heymsfield SB, Wang V, Chen G, Solomon JL (2001) An herbal supplement containing Ma Huang-Guaraná for weight loss: a randomized, double-blind trial. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(3):316-324
23. Opala T, Rzymiski P, Pischel I, Wilczak M, Wozniak J (2006) Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extractbased weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Eur J Med Res* 11:343-350
24. Costa Krewer C, Ribeiro EE, Ribeiro EA, Moresco RN, Ugalde Marques da Rocha MI, Santos Montagner GF, Machado MM, Viegas K, Brito E, Cruz IB (2011) Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytoter Res* 25(9):1367-1374

25. Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, Kober H, Agertt VA, Campos MMA, Gomes P, Duarte MM, Moresco RN (2011) A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 44:348-350
26. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191
27. Tice RR, Agurell D, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221
28. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith G, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. 4<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18:45-51
29. Nadin S, Vargas-Roig L, Ciocca D (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49:1183-1186
30. Brautbar N, Williams J (2002) Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *Int J Hyg Environ Health* 205:479-491
31. Janakat S, Al-Merie H (2002) Optimization of the dose and route of injection, and characterisation of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 48:41-44
32. Weber LW, Boll M, Stampfl A (2003) Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33:105-136
33. Zimmerman HJ, Seeff LB (1970) Enzymes in hepatic disease. In: Goodly EL (ed) *Diagnostic Enzymology*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 1-38
34. Lin HM, Tseng HC, Wang CJ, Lin JJ, Lo CW, Chou FP (2008) Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn. extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Chem Biol Interact* 171:283-293

35. Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733-1735
36. Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, van de Cotte B, Morsa S, Ravanat JL, Hegie A, Triantaphylidès C, Shulaev V, Van Montagu MC, Breusegen F, Mittler R (2011) Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(4):1711-1716
37. Bohr V, Anson RM, Mazur S, Dianov G (1998) Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol Lett* 103:47-52
38. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (18):10469-10474
39. Das RK, Hossain SU, Bhattacharya S (2007) Protective effect of diphenylmethyl selenocyanate against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury. *J Appl Toxicol* 27(6):527-537
40. Belliaro F, Martelli A, Valle MG (1985) HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) and *Cola* spp. samples. *Z Lebensm Unters Forsch* 1180:398-401

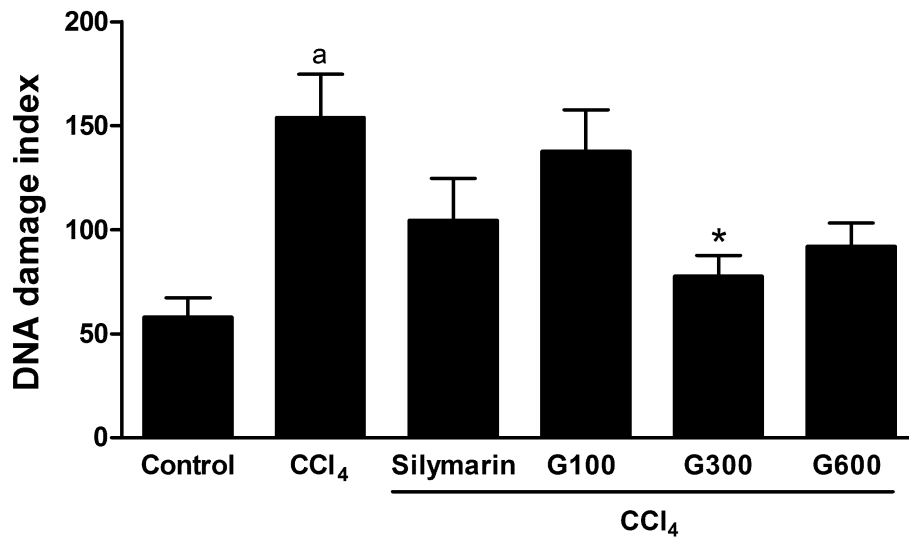


**Table 1.** Effects of guaraná pretreatment on serum biochemical parameters in CCl<sub>4</sub> intoxicated rats.

Parameters	Control	CCl <sub>4</sub>	Silymarin + CCl <sub>4</sub>	G100 + CCl <sub>4</sub>	G300 + CCl <sub>4</sub>	G600 + CCl <sub>4</sub>
AST (U/L)	146 ± 11	3349 ± 1098 <sup>a</sup>	394 ± 92*	842 ± 136*	479 ± 115*	668 ± 181*
ALT (U/L)	68 ± 3	2510 ± 1013 <sup>a</sup>	208 ± 50*	556 ± 94*	427 ± 122*	427 ± 125*
Glucose (mg/dL)	181 ± 12	148 ± 13	199 ± 13	182 ± 19	170 ± 8	177 ± 16
Total cholesterol (mg/dL)	69 ± 5	66 ± 9	67 ± 6	65 ± 4	59 ± 4	65 ± 6
Urea (mg/dL)	50 ± 2	57 ± 3	65 ± 3	62 ± 5	68 ± 5	66 ± 7
Creatinine (mg/dL)	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.31 ± 0.04
Albumin (g/dL)	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2
NOx (μmol/L)	74 ± 29	52 ± 19	60 ± 32	77 ± 24	48 ± 23	89 ± 33

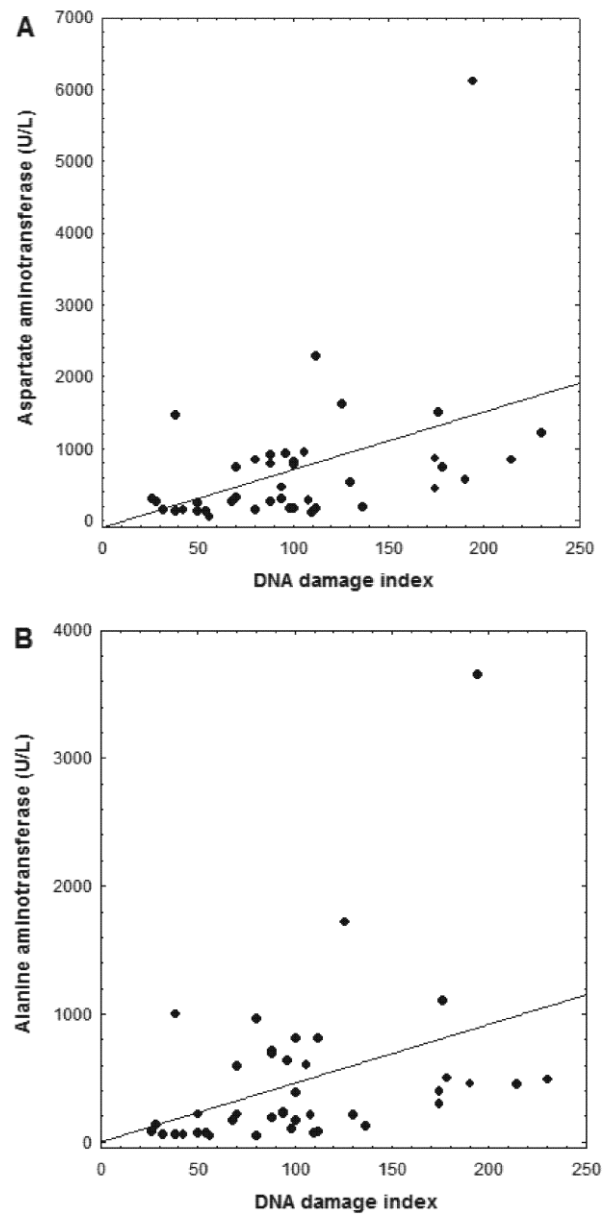
Values are mean and S.E.M of 5-8 rats. Differences between groups were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. <sup>a</sup> p<0.001 compare with control group. \* p<0.01 compare with CCl<sub>4</sub> group.

Figure 1



**Figure 1.** Effect of pretreatment with silymarin 100mg/Kg (Silymarin), guaraná 100 mg/Kg (G100), guaraná 300 mg/Kg (G300) and guaraná 600 mg/Kg (G600) on CCl<sub>4</sub>-induced DNA strand breakage. Values are expressed as mean and S.E.M of 5-8 rats. <sup>a</sup>p<0.01 compared with control group. <sup>\*</sup>p<0.05 compared with CCl<sub>4</sub> group.

Figure 2



**Figure 2.** Significant positive correlations between (A) DNA damage index and AST ( $r=0.43$ ,  $p=0.0053$ ), and (B) DNA damage index and ALT ( $r=0.39$ ,  $p=0.0120$ ).

## 4 CONCLUSÕES

- O guaraná apresentou atividade hepatoprotetora no modelo experimental utilizado, sendo observado, inclusive, efeito similar ao da silimarina em todas doses testadas.
- O guaraná apresentou efeito genoprotetor, uma vez que promoveu a diminuição no índice de dano ao DNA; porém, essa atividade foi observada apenas para uma dose de guaraná.
- O pré-tratamento com guaraná e com silimarina não promoveu alterações significativas nos marcadores renais, glicêmicos e lipídicos dos animais deste estudo, o que demonstra a inexistência toxicidade renal e de alterações metabólicas significativas.
- As correlações positivas observadas entre o índice de dano ao DNA e os marcadores bioquímicos de dano hepático permitem concluir que existe uma associação entre a liberação de enzimas originárias dos hepatócitos e a fragmentação do DNA.

## REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, L. et al. Milk Thistle in Liver Diseases: Past, Present, Future. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1423-1432, 2010.
- AHMAD, A. et al. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine pos-treatment against thioacetamine induced hepatic damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p.35-41, 2002.
- ÂNGELO, P. C. et al. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulation from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome, **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 117-124, 2008.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M. et al. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1817-1820, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_alimentos.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm)>. Acesso em: 05 de maio 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVI, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.
- BABU, P. V.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Current Medical Chemistry**, v. 15, p. 1840-1850, 2008.
- BELLIARDO, F.; MARTELLI, A.; VALLE, M. G. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) and *Cola* spp. samples. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 1180, p. 398-401, 1985.
- BÉRUBÉ-PARENT, S. et al. Effects of encapsulated green tea and Guaraná extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 432-436, 2005.
- BISHT, S. et al. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc™) ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury and fibrosis through reduction of pro-inflammatory cytokines and stellate cell activation. **Laboratory Investigation**, v. 91, p. 1383-1395, 2011.
- BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 119-125, 2013.
- BOOZER, C. N. et al. An herbal supplement containing Ma Huang- Guaraná for weight loss: a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 316-324, 2001.

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 535-538, 1988.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CAMPOS, A. R. et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1199-1202, 2003.

CAMPOS, A. R. et al. Acute effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 441-443, 2005.

CAMPOS, M. P. O. et al. Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 6, p. 505-512, 2011.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n.3, p. 249-261, 2004.

CORREIA, P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

COSTA KREWER, C. et al. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1367-1374, 2011.

DA FONSECA, C. A. et al. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 321, p. 165-173, 1994.

DA SILVA, J. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental *in vivo* biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 241-245, 2000.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, p. 655-673, 2000.

DHULEY, J.N.; NAIK, S.R. Protective effect of Rhinax, a herbal formulation against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury and survival in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 159-164, 1997.

DUCAN, E.; PATEL, N. D., FEUCHT, C. Energy drinks: a review of use and safety for athletes. **Physician and Sports Medicine**, v. 38, p. 171-179, 2010.

ESPINOLA, E. B. et al. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 223-229, 1997.

FENG, Y. et al. Hepatoprotective effect and its possible mechanism of *Coptidis rhizome* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced chronic liver hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n.3, p. 683-690, 2011.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FOGDEN, E., NEUBERGER, J. Alternative medicines and the liver. **Liver Internacional**, v. 23, p. 213-220, 2003.

FUKUMASU, H. et al. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158-164, 2006.

FUKUMASU, H. et al. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, Guaraná, increases survival of Ehrlich Ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 11-16, 2011.

FUKUMASU, H. et al. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p. 305-310, 2008.

FUKUMASU, H. et al. Protective effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44. P. 862-867, 2006.

GALISTEO, M. et al. Antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus* in a model of acute hepatic damage induced by thioacetamine. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 522-526, 2000.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995

HANAFIAH, K. M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333-1342, 2013.

HANJE, B. et al. The use of selected nutrition supplements and complementary and alternative medicine in liver disease. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 21, p. 255-272, 2006.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v. 90, p. 183-188,1997.

HASKELL, C. F. et al. Double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21(1), p. 65-70, 2007.

HASSAN, Z. K.; AL-OLAYAN, E. M. Curcumin reorganizes miRNA expression in a mouse model of liver fibrosis. **Asian Pacific Organization for Cancer Prevention**, v. 13, p. 5405-5408, 2012.

HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 311-338, 1982.

HENMAN, A. R. **Vida natural**. O Guaraná: sua cultura, propriedades, formas de preparação e uso. São Paulo: Global/Ground, 1986.

HSIAO, G. et al. Antioxidative and Hepatoprotective effects of *Antrodia camphora* extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3302 -3308, 2003.

HSU, Y. et al. Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2281-2288, 2009.

HUANG, B. et.al. Hepatoprotective and antioxidant effects of the methanolic extract from *Halenia elliptica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 276-281, 2010.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, p. 1071-1078, 2009.

JAESCHKE, H. et al. Forum - Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 166-176, 2002.

JIMENEZ, W. et al. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: an useful tool for investigating the pathogenesis in chronic liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, p. 90-97, 1992.

JANAKAT, S.; AL-MERIE, H. Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 48, p. 41-44, 2002.

JIPPO, T. et al. Effects of Guarana Seed Extract on Passive Cutaneous Anaphylaxis and Mast Cell Degranulation. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, p. 2110-2112, 2009.

JUNQUEIRA, L; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, San Diego: Academic Press, 1997.



KENNEDY, D. O. et al. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 401-411, 2004.

KENNEDY, D. O. et al. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, p. 506-513, 2008.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; de MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p. 502-506, 2012.

KOIZUMI, S. I. et al. Mechanisms of the proctetive effect of L-Alanine to D-galactosamine-induced hepatocellular injury: comparative studies of L-alanine and Pyruvates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 91, p. 99-104, 2002.

KUMAR, G. et al. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacostrum* L. against paracetamol and thiocetamide intoxication in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 37- 40, 2004.

KUSKOSKI, E. M. et al. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, v. 12 (2), p. 45-52, 2005.

LATHA, U.; RAJESH, M.G.; LATHA, M.S. Hepatoprotective effect of an ayurvedic medicine. **Indian Drugs**, v. 36, p. 470-473, 1999.

LEITE, R. P. et al.. Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pretreatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biological Trace Element Research**, v. 141, p. 262-274, 2011.

LIMA, W. P. et al. Lipid metabolism in trained rats: effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 1019-1028, 2005.

LIMA, C. F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; WILSON, C.P. Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 456-464, 2007.

LOGUERCIO, C. et al. Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease. **Biological Trace Element Research**, v. 81, p. 245-254, 2001.

LOGUERCIO, C.; FREDERICO, A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, p. 1-10, 2003.

LU, F.; GLADDEN, A. B.; DIEHL, J. A. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is nuclear oncogene. **Cancer Research**, v. 63, p. 7056-7061, 2003.

MANIBUSAN, M. K. et al. Postulated Carbon Tetrachloride Mode of Action: A Review. **Journal of Environmental Science and Health Part C**, v. 25, p. 185-209, 2007.

- MATTEI, R. et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116, 1998.
- MITRA, S. K. et al. Effect of HD-03-a herbal formulation in galactosamine-induced hepatopathy in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 44, p. 82-86, 2000.
- MIURA, T. et al. Effect of guarana on exercise in normal and epinephrine-induced glycogenolytic mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 6, p. 646-648, 1998.
- MORELLI, V; ZOOROB, R.J. Alternative therapies: Part I. Depression, diabetes, obesity. **American Family Physician**, v. 62, n. 5, p. 1051-1060, 2000.
- MORISCO, F. et al. Foods and liver health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, p. 144-150, 2008.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório. Princípios e Interpretações**. São Paulo: Médica Missau, 2003.
- MUKAZAYIRE, M. J. et al. Traditional phytotherapy remedies used in Southern Rwanda for the treatment of liver diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 415-431, 2011.
- MURIEL, P.; RIVER-ESPINOZA. Beneficial drugs for liver diseases. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 93-103, 2008.
- NADIN, S.; VARGAS-ROIG, L.; CIOCCA, D. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of Histochemistry e Cytochemistry**, v. 49, p. 1183-1186, 2001.
- NAN, J. X. et al. Effect of *Acanthopanax koreanum* Nakai (Araliaceae) and d-galactosamine and lipopolysaccharide fulminant hepatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 71-77, 2004.
- NEGI, A. S. et al. Recent Advances in Plant Hepatoprotectives: A Chemical and Biological Profile of Some Important Lead, **Medical Research Reviews**, v. 28, p. 746-772, 2008.
- O'DEA, J. A. Consumption of nutritional supplements among adolescents: usage and perceived benefits. **Health Education Research**, v. 18, p. 98-107, 2003.
- OLIVEIRA, C. H. et al. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 54-57, 2005.
- OPALA, T. et al. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects - a randomised double-blind placebo - controlled clinical trial. **European Journal of Medical Research**, v. 11, p. 343-350, 2006.
- ORHAN, D. D. et al. Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. **Life Science**, v. 72, p. 2273-2283, 2003.

OTOBONE, F. J. et al. Effect of crude extract and its purified constituents from Guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Lucke] on cognitive performance in Morris Water Maze in rats]. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 723-728, 2005.

OTOBONE, F. J. Effect of lyophilized extracts from Guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 531-535, 2007.

PAVANATO, A. et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 48, n. 4, p. 824-829, 2003.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINHEIRO, C. E. et al. Effect of guaraná and *Stevia rebaudiana* Bertoni (leaves) extracts, and stevioside, on the fermentation and synthesis of extracellular insoluble polysaccharides of dental plaque. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 9-13, 1987.

PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, p. 188-192, 2007.

PLAA, G. L. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 43-65, 2000.

PORTELLA, R. et al. Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an *in vitro* and *in vivo* study. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, p. 12, 2013.

PRADHAN, S. C.; GIRISH, C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. **Indian Journal of Medical Research**, v. 124, p. 491-504, 2006.

PUSHPAVALLI, G.; VEERAMANI, C.; PUGALENDI, K. V. Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against D-galactosamine-induced hepatotoxicity rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1654-1659, 2010.

QUIDEAU, U. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586-621, 2011.

RAY, S. et al. Short-term and long-term *in vivo* exposure to an ephedra- and caffeine containing metabolic nutrition system does not induce cardiotoxicity in B6C3F1 mice. **Archives of Toxicology**, v. 79, p. 330-340, 2005.

RAVI SUBBIAH, M. T.; YUNKER, R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, p. 96-101, 2008.

RAUCY, J. L.; KRANER, J. C.; LASKER, J. M. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, p. 1-20, 1993.

RECKNAGEL, R. O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, p. 139-154, 1989.

REYES-GORDILLO, K. et al. Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl<sub>4</sub> in rats: role of TGF-beta modulation and oxidative stress. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 417-427, 2008.

SALLER, R. et al. An Updated Systematic Review of the Pharmacology of Silymarin. **Forschende Komplementarmedizin**, v. 144, p. 70-80, 2007.

SANTA MARIA, A. et al. Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, p. 164-167, 1998.

SASHREEN, S.; KHAN, M. R.; KHAN, A. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl<sub>4</sub>-induced damage in rat. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 48-56, 2011.

SCHIRALDI, O.; PASTORE, G.; DENTICO, P. **Progress and prospects in viral hepatitis**. Italy: Gerni, 1992.

SEIDEMANN, J. Guarana (*Paullinia cupana* H.B.K.) – an active agent from the tropical rain forest. **Tropenlandwirt**, v.99, p. 49-63, 1998.

SHANKAR, K.; VAIDYA, V. S.; WANG, T. Streptozotocin-induced diabetic mice resistant to lethal effects of thioacetamine hepatotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 188, p. 122-134, 2003.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Diseases of the liver and biliary system**. London: Blacwell, 2002.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's Journey from Regional Tonic Aphrodisiac and Global Energy Drink. Review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 279-282, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, 2004.

SINGH, N. et al. Protective effect of potato peel extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 241-246, 2008.

SINGH, N. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1995.

SOMASUNDARAM, A. et al. Evaluation of hepatoprotective activity of *Kyllinga nemoralis* (Hutch & Dalz) rhizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127 , n.2, p. 555-557, 2010.

SOUSA, C. M. et al. Fenóis totais e atividades antioxidantes de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

STRADER, D. B. et al. Use of complementary and alternative medicine in patients with liver disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 97, p. 2391-2397, 2002.

SUJA, S. R. et al. Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 61-66, 2004.

SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS (SUFRAMA). **Projeto Potencialidades regionais. Estudo de Viabilidade Econômica**. Guaraná. Julho de 2003. Disponível em [www.suframa.gov.br/publicacoes/proj\\_pot\\_regionais/guarana.pdf](http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/guarana.pdf). Acesso em: 03 mar. 2013.

TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 348-350, 2011

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

TILG, H.; DIEHL, A. M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. **New England Journal Medicine**, v. 343, p. 1467-1476, 2000.

TUNG, Y. et al. Protective effect of *Acacia confusa* bark extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1385-1392, 2009.

WAN, X. Y. et al. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, p. 15-19, 2009.

WATANABE, T. et al. Molecular mechanisms of portal vein tolerance. **Hepatology Research**, v. 38, n. 5, p. 441-449, 2008.

WEBER, L.W.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical Reviews Toxicology**, v. 33, p. 105-136, 2003.

YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

YUNG, L. M. et al. Tea polyphenols benefit vascular function. **Inflammopharmacology**, v. 16, p. 230-234, 2008.

YIN, G. et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra* extract against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 209-216, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VENKATESWARAN, S. et al. Protective effect of Livex, a herbal formulation against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 161-167, 1997.

VICTOR, V. M. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 376-389, 2009.

VITAGLIONE, P.; MORISCO, F.; CAPORASO, V. Dietary antioxidant compounds and liver health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 575-586, 2004.

VUDA, M. et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of aqueous extract of *Hybanthus enneaspermus* against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 855-859, 2012.

XING, W. W. et al. Hepatoprotective effects of IL-22 on fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. **Cytokine**, v.56, n. 2, p. 174-179, 2011.

XU- YING, W. et al. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, p. 15-19, 2009.

ZAIA, D.A.D.; ZAIA, C.T.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZHU, W.; FUNG, P. C. W. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury of mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 870-880, 2000.

## ANEXOS

### Anexo A- Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**  
**CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** " Avaliação da atividade hepatoprotetora do guaraná (Paullinia cupana) em modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) em ratos "

**Numero do Parecer:** 027/2012

**Pesquisador Responsável:** Rafael Noal Moresco

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:**

Santa Maria, 16 de Maio de 2012.

## Anexo B – Comprovantes de submissão do artigo científico

YAHOO! MAIL

Entrada (2)  
Rascunhos (64)  
Enviadas  
Spam  
Lixeira (83)

ENTRADA | CONTATOS | AGENDA | Enc: Thank you for y...

Escrever | Apagar | Mover | Spam | Ações

**Enc: Thank you for your approval** Ter, 18 Jun 2013 às 19:50

De: Rafael N. Moresco  
Para: Helena Kober

2 Anexos | 739 KB | Salvar tudo em

PDF 850 KB: QUAL-S-13-00461.pdf  
DOC 88 KB: Manuscript Kober et al - June 18

----- Mensagem encaminhada -----  
De: Plant Foods for Human Nutrition <jubilyn.hilario@springer.com>  
Para: Rafael Moresco <mmoresco@yahoo.com.br>  
Enviadas: Terça-feira, 18 de Junho de 2013 19:41  
Assunto: Thank you for your approval

Dear Prof. Moresco,

Thank you for approving the changes that we made to your submission entitled "Genoprotective e hepatoprotective effects of Pautlinia cupana Mart. var. sorbilis on CCl4-induced liver damage in rats".

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://qual.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,



**Plant Foods for Human Nutrition**  
**Genoprotective e hepatoprotective effects of Paullinia cupana Mart. var. sorbills on**  
**CCI4-induced liver damage in rats**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Genoprotective e hepatoprotective effects of Paullinia cupana Mart. var. sorbills on CCI4-induced liver damage in rats
<b>Article Type:</b>	Manuscript (should not exceed 16 pages)
<b>Keywords:</b>	Hepatoprotective; Genoprotective; Paullinia cupana; Liver
<b>Corresponding Author:</b>	Rafael Moresco, Ph.D. Federal University of Santa Maria Santa Maria, RS BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Federal University of Santa Maria
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Helena Kober
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Helena Kober Etiane Tatsch Vanessa Torbitz Lara Cargnin Manuela Sangoi Guilherme Bochi Andréia Regina da Silva Fernanda Barbisan Ivana Beatrice da Cruz Rafael Moresco, Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	The protective effects of Paullinia cupana (guaraná) on liver damage were evaluated in rats exposed to carbon tetrachloride (CCl4). Male Wistar rats were pretreated with guaraná powder (100, 300 and 600 mg/Kg) or silymarin 100 mg/Kg daily for 14 days before treatment with a single dose of CCl4 (50% CCl4, 1 mL/Kg, intraperitoneally). The treatment with CCl4 significantly increased the serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). In addition, CCl4 increased the DNA damage index in hepatocytes. Guaraná in all concentrations was effective in decreasing the ALT and AST activities when compared with CCl4 treated group. The treatment with guaraná 300 mg/Kg decreased DNA damage index when compared with CCl4 treated group. In addition, the DNA damage index showed a significant positive correlation with AST and ALT. These results indicate that guaraná has hepatoprotective activity and prevents the DNA strand breakage in CCl4-induced liver damage in rats.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Rahmat Khan Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, University of Science and Technology Bannu, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan Rahmatgul_81@yahoo.com

*Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation*

	Yonghui Zhang Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China zhangyh@mails.tjmu.edu.cn
	Robin Chiou Department of Food Science, National Chiayi University, 300 University Road, Chiayi 60051, Taiwan, ROC. rychiou@mail.ncyu.edu.tw
	Prakash Mungli Department of Biochemistry and Genetics, St Matthew's University, School of Medicine, P.O. Box 32330, Regatta Office Park, Leeward Three, Grand Cayman KY1-1209, Cayman Islands prakashmungli@yahoo.co.in
	Jarbas De Oliveira Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil jarbas@pucri.br