



**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO  
UNIFENAS**

**PROGRAMA DE MESTRADO EM SAÚDE**

**ESTUDO DO POTENCIAL CLASTOGÊNICO E  
GENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Piper cubeba* EM  
CÉLULAS DE ROEDORES *in vivo***

**Adriana Pereira Freire Junqueira**

**ALFENAS - MG  
2006**

Adriana Pereira Freire Junqueira

ESTUDO DO POTENCIAL CLASTOGÊNICO E  
GENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Piper cubeba* EM  
CÉLULAS DE ROEDORES *in vivo*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Mestrado em Saúde da Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro

**ALFENAS – MG  
2006**

Junqueira, Adriana Pereira Freire

Estudo do potencial clastogênico e genotóxico do extrato de *Piper cubeba* em células de roedores *in vivo*./ Adriana Pereira Freire Junqueira.  
– Alfenas: UNIFENAS, 2006

60 p.

Orientador: Prof. Dr. Édson Luis Maistro

Dissertação ((Mestrado em Saúde) – Universidade José do Rosário Vellano.

Referências Bibliográficas: págs 54 - 63

1. *Piper cubeba* 2. Teste do Micronúcleo 3. Single Cell Gel Electrophoresis 4. SCGE

CDU: 615 (043)

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço em primeiro lugar, a Deus, por ter me dado fé, paciência e força;
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luis Maistro pela paciência, pelas explicações, amizade, carinho e profissionalismo;
- A Lucimara, pela calma, amizade, companheirismo e profissionalismo;
- Ao meu marido Frank, pelo carinho, por agüentar os momentos de mau humor e estresse e ainda assim, ter paciência;
- Ao meus pais e irmãos, pela força, incentivo e por nunca me deixar desistir;
- A Eliza, a Juliana e a Érica, que além de amigas, contribuíram muito comigo;
- Ao Bruno e ao Guilherme, que sempre ajudavam, dando um jeitinho nos momentos difíceis;
- Ao Dr. Fábio Perazzo, por contribuir com a obtenção e caracterização do extrato usado neste trabalho;
- Aos Professores Tanuri, José Maurício e Fiorini, por compartilharem seus laboratórios;
- A todos os funcionários dos laboratórios que nos auxiliaram;
- A todo o corpo docente, por acrescentar muito ao meu trabalho e de toda a turma do mestrado;
- A todos os amigos que estiveram presentes, dando força e torcendo para que tudo desse certo.
- Aos professores da banca, por dedicarem um pouco do seu escasso tempo na análise desta dissertação.

## Resumo

A *Piper cubeba* é distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e é usada de várias maneiras na medicina, como nos ensaios de genética toxicológica. Neste estudo, foi investigado o potencial clastogênico e genotóxico do extrato cru dos frutos da *P. cubeba* em células de roedores, usando o teste do micronúcleo e o ensaio *single cell gel electrophoresis* – SCGE – (ensaio cometa). Os animais foram tratados por gavagem com 3 concentrações do extrato: 25, 50 e 75% da LD<sub>50</sub> (2 g/Kg). Dos ratos Swiss, foi coletado sangue periférico 24h após o tratamento para o ensaio SCGE e 48 e 72h para o teste do micronúcleo, quando os animais foram sacrificados. Para os camundongos Wistar, coletou-se sangue periférico e células hepáticas, para o ensaio SCGE, e células de medula óssea, para o teste do micronúcleo, 24h após o tratamento, quando os animais foram submetidos à eutanásia. No extrato na concentração de 75% da LD<sub>50</sub>, foi observado um aumento estatisticamente significativo no número de células com micronúcleos e danos no DNA nas células de roedores analisadas, e, no terceiro grupo de animais analisados, foi observada também toxicidade genética na concentração de 50% da DL<sub>50</sub>. Conforme nossa condição experimental, o extrato de *P. cubeba* mostrou efeito clastogênico e genotóxico moderado em células de roedores.

## Abstract

*Piper cubeba*, widely distributed in the tropical and subtropical regions of the world, is used medicinally in various manners without genetic toxicity evaluation. In this study we investigated the clastogenic and genotoxic potential of the crude extract of the fruits of *P. cubeba* in rodents cells using the micronucleus and single cell gel electrophoresis (SCGE) test systems. The animals were treated by gavage with 3 concentrations of the extract, 25, 50 and 75 per cent of the LD<sub>50</sub> (2 g/kg). From Swiss mice peripheral blood was collected at 24 h after the treatment for SCGE assay and at 48 and 72 h for micronucleus test, when the animals were sacrificed. From Wistar rats peripheral blood and hepatic cells were collected for SCGE assay and bone marrow cells for micronucleus test 24 h after the treatment and then the animals were submitted to euthanasia. At the 75% of the LD<sub>50</sub> extract concentration, a statistically significant increase in the mean number of cells with micronuclei and with DNA damage was observed in all rodents' cell types analyzed, and on three of the analyzed animal groups genetic toxicity was observed also at the 50% of the LD<sub>50</sub> concentration. Under our experimental conditions, *P. cubeba* extract showed moderate clastogenic and genotoxic effect in the rodents' cells.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Considerações gerais sobre o uso das plantas medicinais pelo homem.....	01
1.2. Mutação.....	05
1.2.1. Mutagênese.....	06
1.4. Considerações sobre testes de mutagenicidade utilizados neste trabalho.....	07
1.4.1. Ensaio cometa ou <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> (SCGE).....	08
1.4.1.2. Princípios do teste.....	08
1.4.1.3. Aplicações do teste.....	09
1.4.1.3.1. Detecção de agentes genotóxicos.....	09
1.4.1.3.2. Reparo do DNA.....	10
1.4.1.3.3. Aplicação clínica.....	14
1.4.1.3.4. Biomonitoramento ambiental.....	14
1.4.1.3.5. Monitoramento humano.....	15
1.4.1.3.6. Apresentação e interpretação dos dados.....	15
1.5. Teste do micronúcleo.....	17
1.5.1. Princípios do teste.....	18
1.5.2. Aplicações do teste.....	19
1.6. Considerações gerais sobre a <i>Piper cubeba</i> .....	20
1.6.1. Descrição da <i>Piper cubeba</i> .....	20
1.6.2. Propriedades e usos.....	21
2. OBJETIVO.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Materiais.....	29
3.1.1. Material vegetal e obtenção do extrato de <i>Piper cubeba</i> .....	29
3.1.2. Animais.....	29
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Grupos experimentais.....	30
3.2.2. Preparo de células.....	31
3.2.3. Preparo das lâminas.....	32
3.2.4. Eletroforese e coloração.....	32
3.2.5. Avaliação dos danos do DNA.....	33
3.2.6. Teste do cometa em células de medula óssea de ratos.....	34
3.3. Obtenção de células da medula óssea para análise da ocorrência de micronúcleos (técnica para ratos wistar).....	35
3.3.1. Sangue periférico.....	36
3.4. Análise Estatística.....	36
4. ARTIGO.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Considerações gerais sobre o uso das plantas medicinais pelo homem**

As plantas medicinais têm sido um importante recurso terapêutico desde os primórdios da humanidade até nossos dias. No passado representavam a principal arma terapêutica conhecida. Em todos os registros sobre médicos famosos da Antigüidade, tais como Hipócrates, Avicena e Paracelcus, as plantas medicinais ocupavam lugar de destaque em sua prática (ALVES & SILVA, 2002).

O reino vegetal, além de ser o maior reservatório de moléculas orgânicas conhecido, é um poderoso laboratório de síntese. A partir de plantas achadas e usadas pelo conhecimento popular, foram descobertos diversos medicamentos usados até os nossos dias pela medicina. Até hoje, diversas moléculas com estrutura complexa dependem de síntese biológica, pois a síntese em laboratório não pode ser feita ou é economicamente inviável; por isso, plantas medicinais são usadas como matéria-prima para a fabricação de medicamentos (ALVES & SILVA, 2002).

A idéia básica dos tratamentos naturais é a de fornecer ao organismo – tanto ao seu como ao de sua família e de seus filhos – os meios para que ele próprio se defenda das agressões múltiplas, infelizmente cada vez mais numerosas em nossa sociedade submetida a uma imensidão de poluentes. Os ecólogos compreenderam esse fato, e a corrente por eles iniciada, que hoje se expande bastante, conquistando o entusiasmo de nossos contemporâneos apreensivos, é prova disso; sem o respeito pelo corpo e pela natureza, o progresso é perigoso e não traz a felicidade. Porém, até o presente momento, apesar do crescente interesse por uma medicina sensata, capaz de considerar com discernimento tanto o médico e os antibióticos, quanto os tratamentos

naturais para o dia-a-dia, para a prevenção, e para auxiliar os corpos maltratados pela química, não era fácil, no plano prático, conciliar natureza e ciência. Era preciso consultar inúmeras obras, malfeitas, de apresentação difícil, algumas vezes desencorajantes, e freqüentemente pouco clara (RUDDER, 2002).

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% deram-se por indicação médica. Existem cerca de 20.000 plantas medicinais com aproximadamente 4.000 remédios derivados de plantas (ALVES & SILVA, 2002).

Além disso, um número considerável de produtos naturais são usados nos sistemas médicos tradicionais em muitos países. Embora as drogas alopáticas tenham atividade potente, têm vários efeitos adversos severos. Conseqüentemente, os agentes de origem natural têm efeitos colaterais muito pequenos e são requeridos como o terapêutico químico substituto (VERPOORTE, 1999).

Estudos farmacológicos têm gerado novos conhecimentos para plantas de emprego tradicional, que estão obrigando à revisão do seu uso. A normatização do registro de medicamentos de origem vegetal junto aos organismos governamentais de vigilância sanitária, por sua vez, produziu uma nova série de exigências, relacionadas com a comprovação da eficácia, segurança e especificação da qualidade, que envolvem aspectos da matéria-prima, do processamento tecnológico e do produto final (SIMÕES *et al.*, 2000).

A partir do estabelecimento de parâmetros de qualidade para a matéria-prima, e considerando-se um planejamento adequado e um controle do processo de produção

do medicamento, a qualidade do produto final estará, em grande parte, assegurada (IHRIG & BLUME, 1992).

Contudo, a qualidade das matérias-primas vegetais não garante, por si, a eficácia, a segurança e a qualidade do produto final. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde, como, por exemplo, metais pesados, agrotóxicos, microorganismos e seus produtos metabólicos, produtos de degradação, entre outros (SIMÕES *et al.*, 2000).

Seguindo esta linha de biosegurança, no início dos anos 80 os órgãos de saúde pública e as agências ambientais, em vários países industrializados, acrescentaram a mutagenicidade à lista das propriedades tóxicas a serem avaliadas antes que agentes químicos, aditivos de alimentos e medicamentos fossem introduzidos no mercado, implementando assim, o desenvolvimento da Genética Toxicológica. Além disso, Doll & Peto (1981), revisando as causas e prevenção do câncer, argumentaram que a proporção de cânceres causada pelos agentes químicos ambientais é, provavelmente, baixa, quando comparada com a proporção dos cânceres atribuída ao cigarro, aos componentes de dieta, as infecções e aos carcinógenos naturais. Esta visão foi recentemente endossada e reforçada por Ames & Gold (2000). No entanto, a justificativa da preocupação da exposição a agentes químicos ambientais, os quais alguns autores consideram uma fonte menor de mutagênese, é que uma exposição adicional representa um aumento na carga mutagênica, e que o risco em excesso necessita ser avaliado e, se possível, minimizado.

A genética toxicológica avalia efeitos genotóxicos em potencial, uma vez que são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é freqüentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (FEARON & VOGELSTEIN, 1990), havendo alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem (MCCANN *et al*, 1975; PURCHASE *et al.*, 1978). Como resultado dessas considerações, os testes em toxicidade genética são utilizados, rotineiramente, para uma avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos.

Segundo Ribeiro, Salvadori & Marques (2003) um número de testes de curta-duração está disponível para a avaliação do perigo genético. Esses modelos são freqüentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação desses indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, com os mecanismos conhecidos de ativação de protooncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade.

Enquanto existe pouca ou nenhuma dúvida de que os testes de genotoxicidade devem fazer parte de um sistema de avaliação de todos os novos agentes químicos, o sistema apropriado, bem como o modelo do protocolo, têm sido freqüentemente determinados pelas diretrizes regulatórias internacionais. Um grande progresso tem sido obtido, nos últimos anos, na tentativa de se padronizar os protocolos para testes de genotoxicidade, particularmente por esforços da *International Conference on*

*Harmonization* (ICH), [www.ich.org](http://www.ich.org) e da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), [www.oecd.org](http://www.oecd.org). (RIBEIRO *et al.*, 2003).

## 1.2. Mutação

Segundo Gardner (1977) mutação é o processo pelo qual um gene sofre mudança estrutural. Dá-se o mesmo nome ao gene modificado por esse processo. Mais amiúde, porém, a palavra mutação indica mudança fenotípica resultante de um gene mutado. O termo mutante é usado para designar um indivíduo que expressa a alteração do genótipo resultante de mutação.

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações, que podem ser causadas por erros durante a sua duplicação, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por conseqüência, não são, também, detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens e um crescimento desordenado das células (GARDNER, 1977).

Os chamados agentes mutagênicos que vão alterar a seqüência das bases no DNA podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do

controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento do câncer (GARDNER, 1977).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO et al., 2003).

### **1.3. Mutagênese**

Há muitos anos se sabe que a maioria dos agentes mutagênicos mais potentes, tais como radiações ionizantes, a luz ultravioleta e produtos químicos, como aqueles discutidos nas sessões precedentes, são também carcinogênicos, isto é, indutores de câncer. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas técnicas sensíveis para testar os produtos químicos e outros agentes para mutagenicidade e carcinogenicidade. Os testes de carcinogenicidade são feitos normalmente com roedores e mais freqüentemente em camundongos recém-nascidos. Esses estudos envolvem a ingestão ou injeção de substâncias a serem testadas e, subseqüentemente, exame dos animais para a formação de tumores. Os testes para mutagenicidade normalmente são feitos de forma similar. Entretanto, como as mutações são eventos de baixa freqüência e como a sua manutenção em grandes populações de animais, tais como camundongos, são um empreendimento caro, estes testes em animais são normalmente muito pouco sensíveis. Isto é, raramente se detectam baixos níveis de mutagenicidade (GARDNER & SNUSTAD, 1986).

A correlação observada entre a mutagenicidade e a carcinogenicidade é consistente com a teoria de que o câncer é causado por mutações somáticas. A maioria dos geneticistas concorda que as mutações somáticas podem causar câncer. Isso recebeu um grande reforço a partir da recente descoberta da oncogênese celular (genes que causam câncer) e a demonstração de que a oncogênese responsável por carcinoma de bexiga no homem resultou da modificação de um único par de bases em relação ao par celular normal. A característica comum de todos dos muitos tipos diferentes de câncer é que as células malignas, qualquer que seja o tipo, continuam a se dividir enquanto as células normais demorariam algum tempo para entrar em outra divisão celular. Isto é, todos os cânceres apresentam uma perda do controle normal de divisão celular, resultando na formação de tumores. A divisão celular está indubitavelmente, pelo menos em parte, sob controle genético. Sendo assim, uma mutação em um gene envolvido no controle da divisão celular, como uma mutação em qualquer outro gene, pode causar uma perda de função e, portanto, uma perda do controle normal da divisão celular. Qualquer pessoa pode prever facilmente causas epigenéticas para o câncer, isto é, mudanças nos estados de diferenciação, ao invés de modificações permanentes no material genético em si. Conseqüentemente, a questão-chave não parece ser se as mutações somáticas podem causar câncer e sim que proporção dos cânceres humanos é, na realidade, causada por mutações somáticas (GARDNER & SNUSTAD, 1986).

#### **1.4. Considerações sobre testes de mutagenicidade utilizados neste trabalho**

##### **1.4.1. Ensaio Cometa Ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)**

Nas últimas duas décadas, a busca para as metodologias novas que podem avaliar os danos do DNA foi desenvolvida. Rydberg e Johanson foram os primeiros a quantificar diretamente os danos do DNA em células individuais, lisando e encaixando-as na agarose em lâminas sob condições alcalinas suaves para permitir o desenrolar parcial do DNA (ROJAS, LOPEZ & VALVERDE, 1999).

O teste do cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O teste do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o teste do cometa pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente, célula e tecido-específicos, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

#### **1.4.1.2. Princípios do teste**

O comportamento do DNA em células individualizadas leva em conta sua organização dentro do núcleo. Para ser compactado, após seu enovelamento com proteínas histônicas, o DNA forma alças de 5-200 Kpb as quais são aderidas a uma

rede protéica ou 'matriz nuclear' (COOK & BRAZELL, 1976,1977; RAZIM, 1995; ERIKSSON, NYGREN & AHNSTRON, 2002). Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo histonas) extraídas com altas concentrações de sais (e.g., 2,5M NaCl), o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, designada como 'nucleóide' (COOK & BRAZELL, 1976). Dentre as poucas proteínas que resistem a esta extração, estão as proteínas da matriz nuclear (OLIVE & BANÁTH, 1995). Portanto, por definição, o nucleóide é uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (COOK & BRAZEL, 1976, 1977; VOGELSTEIN, PARDOLL & COFFEY, 1980).

#### **1.4.1.3. Aplicações do teste**

##### **1.4.1.3.1. Detecção de agentes genotóxicos**

Por sua simplicidade e relativo baixo custo, o teste do cometa é promissor para a avaliação de produtos químicos em larga escala. Além disso, o teste pode ser utilizado para distinguir entre danos genotóxicos ou citotóxicos, *in vitro*, ou entre cancerígenos de ação genotóxica ou não genotóxica, *in vivo*. O teste do cometa pode vir a integrar as baterias de testes *in vitro/in vivo* usadas para fins de regulamentação de produtos

químicos, uma vez, que até o momento, não se encontra validado para este fim (TICE et. al., 2000).

Segundo Rojas, Lopez & Valverde (1999), uma variedade de células normais e transformadas, que incluem o ser humano, o animal e o vegetal, foi usada em estudos *in vitro*. A maioria dos trabalhos com células humanas têm usado leucócitos e linfócitos, mas outros tecidos têm sido usados também, como células epiteliais (córnea, bucal, nasal e mucosa gástrica, células cutâneas e subcutâneas), células reprodutivas, células do cólon, fibroblasto neonatal, células pancreáticas, células de adenocarcinoma, células linfóides, inclusive células do sangue.

A sensibilidade mostrada por este ensaio permite-nos o uso de uma ferramenta potente para o estudo da genotoxicidade, sendo que, aproximadamente 85% dos estudos realizados nesta área encontrou um resultado positivo. Contudo, mais estudos são requeridos para a investigação da persistência e reparos de danos observados, e correlacionados com outros testes genéticos (ROJAS, LOPEZ & VALVERDE, 1999).

#### **1.4.1.3.2. Reparo do DNA**

Segundo Ribeiro, Salvadori & Marques (2003), desde a origem da vida na Terra, foram selecionados organismos que têm capacidade de manter sua informação genética. Se por um lado, as mudanças ocorridas nessa informação (mutações) propiciam diversidade, fundamental para o processo evolutivo, por outro, colocam em risco a própria existência do organismo. Esse delicado equilíbrio, entre a necessidade da mutagênese para a evolução das espécies e seus efeitos deletérios para o organismo, tem sido central na manutenção da vida em nosso planeta. Os processos

precisos de replicação do DNA e os que removem lesões no material genético (conhecidos com processos de reparo de DNA) constituem os principais mecanismos celulares que garantem a estabilidade gênica e, portanto, atuam diretamente nesse equilíbrio.

De fato, o DNA não é uma molécula estável. Quando foi desvendada a sua estrutura de dupla-hélice, no famoso trabalho de James D. Watson e Francis Crick (em 1953), já se pôde prever os mecanismos pelos quais essa molécula é replicada ou mesmo como transfere sua informação para o RNA, durante a transcrição. No entanto, Crick reconheceu mais tarde que eles não foram capazes de prever que “a molécula de DNA é muito preciosa e que vários sistemas de reparo de DNA devem existir”. A molécula de DNA é constantemente agredida por fatores físicos, como luz ultravioleta (UV) e radiação gama, ou químicos, incluindo produtos do próprio metabolismo celular, como os radicais de oxigênio provenientes da respiração (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Todas as células têm vários sistemas que removem lesões no DNA, ou simplesmente auxiliam as células a tolerá-las. Os sistemas de reparo de DNA constituem, portanto, mecanismos de defesa extremamente eficientes que garantem a estabilidade do genoma, e, conseqüentemente, a própria existência da célula e/ou do organismo. No caso de seres humanos, as lesões podem ser diretamente responsáveis por processos degenerativos, como o envelhecimento e o câncer (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Assim, a compreensão dos mecanismos de reparo de DNA pode auxiliar a entender como agentes genotóxicos podem se tornar mutagênicos, e como podemos identificá-los, de modo a reduzir os riscos associados a eles.

Basicamente, as vias de reparo de DNA podem ser classificadas em: i) reversão da lesão, ii) reparo por excisão, iii) reparo recombinacional e iv) tolerância a lesões. Elas devem atuar em conjunto nas células, de modo a garantir a manutenção genética e a sobrevivência dos organismos (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

O teste do cometa é rápido e eficaz para detecção da cinética de reparo do DNA. É importante determinar qual o tipo de lesão que se quer estudar, para utilizar a versão adequada do teste cometa (tabela 1) (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

**Tabela 1.** Variações mais comuns no teste do cometa para detecção de danos de DNA

Versão	Danos que detecta	Observações técnicas	Referências
Alcalina (pH>13)	Quebras de fita simples, sítios alcalilábeis, sítios incompletos de reparo, sítios abásicos, quebras de fita dupla e ligações cruzadas.	1 h de lise; 20-60 min de relaxamento; 10-40 min de eletroforese; 5 min de neutralização.  Tampão de eletroforese: 1-2mM Na <sub>2</sub> EDTA, 300mM NaOH, pH > 13  Condições de eletroforese: 300mA, 0,5-1,0 V/cm à temperatura constante (recomenda-se <10°C)	Sing <i>et al.</i> (1989); Olive <i>et al.</i> (1990); Tice <i>et al.</i> (2000).
Alcalina (pH 2,1-12,5)	Quebras de fita simples, sítios incompletos de reparo, quebras de fita dupla e ligações cruzadas	1 h de lise; 20-60 min de relaxamento; 10-40 min de eletroforese; 5 min de neutralização*.  Tampão de eletroforese: 1-2mM Na <sub>2</sub> EDTA, 300mM NaOH, ajustados para o pH 12,1-12,5 com HCl.  Condições de eletroforese: 250mA, 0,5-1,0 V/cm à temperatura constante (recomenda-se <10°C)	Miyamae <i>et al.</i> (1997).
Neutra (pH 7,5 - 9,0)**	Quebras de fita dupla e ligações cruzadas***	24 h de lise****, 20 min de descanso; 1-2 h de eletroforese,; 5 min de neutralização*  Tampão de eletroforese: 300mM acetato de sódio, 100mM Tris pH 9 com ác. acético glacial  Condições de eletroforese: 50-60mA, 0,4-0,6 V/cm à temperatura constante (recomenda-se <10°C)	Singh & Stephens (1997).

\* É recomendável expor as lâminas, por 10 min, à solução alcalina (Ph>13 após a eletroforese e antes na neutralização. Isso pode auxiliar na remoção de RNA residual e melhorar a definição das imagens dos cometas por modificações topológicas nas alças do DNA (Singh & Stephens, 1997; Gontijo *et al.*, dados não publicados).

\*\* Aparentemente o comportamento do DNA não sofre mudanças em relação à sua integridade nesses pHs.

\*\*\* O teste também é sensível ao relaxamento de alças de DNA, que pode ser causado por quebras de fita simples ou por agentes intercalantes (Ostling & Johanson, 1984; Belyaev *et al.*, 1999).

\*\*\*\* Pode ser necessário digerir os nucleóides com proteinase K (1mg/ml) na solução de lise sem DMSO ou Triton-X por 1-2 h a 37°C. Após a digestão, colocar a cuba de lise com as lâminas em geladeira por 10 min antes de conduzir a eletroforese. Isso pode evitar o descolamento e a perda de géis das lâminas.

#### **1.4.1.3.3. Aplicação clínica**

A possível utilização deste ensaio na área clínica foi observada por Ostling et al. (1994), que aplicou a versão neutra para avaliar níveis dos danos do DNA em células provenientes de pacientes com doença de Hodgkin que receberam radioterapia, linfoma de Hodgkin, células escamosas de carcinoma ou adenocarcinoma. Devido ao pequeno número de células, precisou-se de uma análise que pôde ser conduzida com uma quantidade de sangue obtida por picada no dedo ou tecido sólido usando a técnica de biópsia, dando ao ensaio cometa (SCGE) um número enorme de aplicações possíveis (ROJAS, LOPEZ & VALVERDE, 1999).

#### **1.4.1.3.4. Biomonitoramento ambiental**

O ensaio Cometa (SCGE) é um ótimo método para detectar os danos de genotoxicidade e mostrou ser capaz de detectar algumas classes de danos em células de vários organismos, fornecendo níveis de danos de células individuais, mostrando sensibilidade, rapidez e custo eficaz (TICE *et al.*, 1995). O ensaio Cometa (SCGE), outra vez por causa da sua simplicidade, sensibilidade e a necessidade de somente um número pequeno de células, foi sugerido como uma técnica ideal para tais estudos (ROJAS, LOPEZ & VALVERDE, 1999).

Atualmente, o que tem sido observado é que, quando um órgão alvo é analisado, diferentes tipos celulares são lisados na mesma preparação. De acordo com Sasaki et al. (1997), é fundamental saber o(s) tipo(s) de células(s) que é (são) afetada(s) na

agressão por agentes que provocam danos no DNA. Considerando a especificidade celular para o ataque de determinados agentes mutagênicos, ignorar tais variações pode representar uma distribuição heterogênea e uma superestimação da variabilidade dos resultados após os tratamentos químicos (MIYAMAE et al., 1998). Além disso, células de um mesmo órgão podem apresentar, além da variabilidade normal entre células do mesmo tipo, uma variabilidade entre células de tipos distintos (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

#### **1.4.1.3.5. Monitoramento humano**

Uma importante aplicação do ensaio Cometa (SCGE) em monitoramento humano é que ele avalia os danos do DNA nas amostras de células dos indivíduos expostos ocupacionalmente ou ambientalmente (ROJAS, LOPEZ & VALVERDE, 1999).

A relevância do SCGE nesta área encontra-se em exigência de amostras muito pequenas de células, sua habilidade de avaliar os danos do DNA de células não-proliferativas e o fato dos procedimentos não serem invasivos contribuem para obter números suficientes de células de tecidos diferentes (ROJAS, LOPEZ & VALVERDE, 1999).

#### **1.4.1.3.6. Apresentação e interpretação dos dados**

O teste do cometa é essencialmente um teste comparativo. Assim, é sempre necessária a presença simultânea de controle negativo e positivo para os experimentos.

Deve-se ter em mente que não existe célula sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula. O que se faz, rotineiramente, é modular as condições técnicas (tempo de relaxamento e eletroforese) para que um mínimo de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles negativos. Contudo, por menor que seja esta migração, ela é recomendável para o adequado funcionamento do teste. Idealmente, seria necessário calibrar as condições do ensaio para cada tipo celular e tratamento realizado, a fim de se obter a melhor sensibilidade e especificidade para o teste (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Além das vantagens citadas e do relativo baixo custo, o teste do cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA (AHNSTRÖM, 1988; MONTEIGH & VANSTONE, 1995) por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas. Além disso, o fato do ensaio possibilitar o acesso às quebras do DNA de uma única célula, poucos milhares de células (de 1 a 10.000 células) são suficientes para sua realização. Contudo, muito deve ser ainda realizado para que o ensaio seja padronizado e validado para ser rotineiramente utilizado na identificação de danos no DNA em diferentes tecidos-alvo do ataque de agentes genotóxicos. De grande valia, no entanto, são as recomendações publicadas recentemente para estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliação de compostos genotóxicos (TICE et al., 2000) e para biomonitoramento genético de populações expostas a agentes genotóxicos (ALBERTINI et al., 2001).

### 1.5. Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001). Os testes regulatórios de Genética toxicológica se constituem em uma série de testes de mutagenicidade, bem definidos, selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações. Uma mutação é definida como uma mudança na seqüência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os agentes que mudam a seqüência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de “genotóxicos”. Uma vez que as mutações são freqüentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

O Teste do Micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al.*, 1987; HAYASHI *et al.*, 1994). Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongo (SCHMID, 1976), mas é também realizado em ratos (GEORGE, WOOTTON & GATEHOUSE, 1990).

As características básicas do teste são (1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs); (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; e (4) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem.

Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula.

Os MN são analisados em eritrócitos policromáticos (PCEs, eritrócitos jovens) de medula óssea de camundongos ou ratos.

Os resultados positivos obtidos com o Teste do Micronúcleo fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas (isto é, quando ocorre exposição da medula óssea), os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo* (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

### **1.5.1. Princípios do teste**

O Teste do Micronúcleo é um método desenvolvido, primariamente, para se avaliar a habilidade de substâncias para induzir dano cromossômico estrutural e/ou

numérico em células em estágio de divisão, na medula óssea. Tanto os danos cromossômicos estruturais como numéricos estão associados com o aparecimento (iniciação) e/ou progressão de tumores, e com efeitos reprodutivos adversos. Todos os testes de toxicidade genética, utilizados rotineiramente para propósitos regulatórios são testes de mutação. Com relação à avaliação de risco para o câncer, os resultados dos testes de toxicidade genética são utilizados para a identificação de agentes mutagênicos. Por outro lado, se um agente é conhecido para ser um carcinógeno, o conhecimento da sua genotoxicidade fornece informações a respeito do mecanismo da carcinogenicidade, informação importante para a seleção das metodologias de caracterização de risco (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

### **1.5.2. APLICAÇÕES DO TESTE**

Segundo Ribeiro, Salvadori & Marques (2003), duas grandes preocupações têm levado ao uso de testes de toxicidade genética para identificar mutágenos químicos e caracterizar os seus efeitos. A primeira é a indução de mutação em células germinativas, que pode tanto afetar a performance reprodutiva do indivíduo como resultar em doenças genéticas nas gerações futuras. A segunda preocupação é baseada no papel da mutação em células somáticas, na iniciação e progressão de doenças degenerativas como o câncer.

Atualmente, o teste de toxicidade genética *in vivo* mais utilizado para a avaliação do perigo de agentes químicos é o Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores, o qual tem vantagens importantes sobre a análise de danos cromossômicos

em células metafásicas de medula óssea. Comparado com outros testes em medula óssea *in vivo*, o Teste do Micronúcleo é tecnicamente mais simples, pode ser conduzido em menor tempo, tem um resultado menos subjetivo, detecta tanto agentes clastogênicos como aneugênicos, geralmente requer o uso de um menor número de animais, podendo ser automatizado para a análise de micronúcleo por análise de imagem e citometria de fluxo. Estas propriedades tornam o Teste do Micronúcleo altamente apropriado para testes toxicológicos de rotina (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

### **1.6. Considerações gerais sobre a *Piper cubeba***

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, distribuída extensamente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, e é usada na medicina de várias maneiras. Economicamente, as plantas pertencentes ao gênero das Piperaceae são importantes para a produção da pimenta nos mercados de especiarias (USIA *et al.*, 2005b).

#### **1.6.1. Descrição da *Piper cubeba***

A *Piper cubeba* é uma planta nativa de Java e de outras ilhas do leste da Índia, conhecida como pimenta de Java ou pimenta asiática. Tem o caule perene, liso, vertical, articulado. Folhas com espinhos, acuminada, inteira, lisa, coreácea e nervada. Flores com ausência de cálice ou corola. O fruto é uma baga redonda, marrom-acinzentado, do tamanho de uma ervilha pequena, enrugado e duro, tendo apenas uma

semente. A baga dessa planta é utilizada na medicina. É agradavelmente aromática, mas se aquecido, o gosto se torna desagradável, ligeiramente amargo e canforáceo. Quantidades consideráveis de um transparente óleo volátil amarelo-esverdeado são obtidas delas e também uma resina branca, inodora e cristalizada, quase sem gosto chamada cubebina. A idade avançada das plantas prejudica as bagas, perdendo óleo volátil e deteriorando seu pó rapidamente (SUMATHYKUTTY *et al.*, 1999).

### **1.6.2. Propriedades e usos**

As bagas são estimulantes dos rins e bexiga. Agem sobre a membrana das mucosas em geral e tem ação moderada na circulação. São usados como especiaria e no tratamento da gonorréia, disenteria, sífilis, dor abdominal diarréia, enterite e asma (SASTROAMIDJOJO, 1997; Medicine Herbal Index in Indonesia, 1995).

O óleo, quando aquecido, tem sido usado na dispepsia atônica, mais geralmente como tônico estomacal verdadeiro e por sua ação nos rins. Acredita-se que altas doses produzem cefaléias e vertigens, provavelmente por ter a circulação cerebral aumentada. Seu uso contínuo não é aconselhável. Seus principais usos podem ser primeiramente, estimulante das membranas de mucosas gástricas, aumentando a secreção gástrica e na flatulência dispéptica; segundo, em doses pequenas, como sedativa no sistema cérebro-espinal, nas vertigens e falha da memória, na congestão e na inflamação crônica da garganta, bexiga e uretra. Cinco a dez gramas da dose para dispepsia, três vezes ao dia; na gonorréia, vinte gramas ou mais. O óleo é usado para as mesmas finalidades, nas doses que variam de três a dez gotas, no açúcar ou na mucilagem;

mais empregado atualmente, na maioria das vezes, como adjuvante aromático na emulsão de copaiva. A tintura da *P. cubeba* pode ser preparada por maceração ou por percolação com quatro bagas diluídas em um quarto de álcool (BADHEKA et al., 1986; 1987).

Foram realizados estudos na doença de Chagas, que é uma doença infecciosa difícil de controlar, desde que foi descoberta em 1909 (CHAGAS, 1909), devido às suas características múltiplas. Quase toda a população Latino Americana corre risco de infecção, onde mais de 18 milhões de indivíduos estão infectados, causando a morte de aproximadamente 400.000 pessoas por ano (ANDRADE & MAGALHÃES, 1996).

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença, mostra uma patogenicidade, influenciada por características do corpo humano e da linhagem do *T. cruzi*. Assim, o curso da infecção nos vertebrados suscetíveis é influenciado por fatores como: a temperatura ambiental, idade, sexo, constituição genética do corpo humano, como as características genéticas e morfológicas do agente infectante, bem como dos agentes terapêuticos (BRENER e ANDRADE, 1979).

O tratamento clínico de pacientes infectados foi feito usando o benzonidazol, que causa efeitos colaterais sérios e não é efetivo para o tratamento da fase crônica da doença (ANDRADE & MAGALHÃES, 1985). Conseqüentemente, há uma demanda urgente para a descoberta dos compostos terapêuticos novos para tratar a doença de Chagas (SILVA et al., 2004).

Nesta consideração, os produtos naturais atraíram a atenção especial dos investigadores, devido a estruturas químicas encontradas na natureza, com atividades biológicas importantes, uma fonte potencial para descoberta de novos compostos (MONTANARI & BOLZANI, 2001; YUNES, PEDROSA & CECHINEL FILHO, 2001).

Avaliaram então, as atividades tripanocidas dos compostos obtidos pela síntese parcial, usando-se (-)-cubebina. Os compostos obtidos pela síntese parcial de (-)-cubebina foram isolados das sementes da *Piper cubeba* L. Os compostos obtidos pela síntese parcial de (-)-cubebina foram: (-)-O-acetil cubebina (3), (-)-O-benzil cubebina (4), (-)-O-(*N,N*-dimetilaminoetil)-cubebina (5), (-)-hinoquinina (6) e (-)-6,6'-dinitrohinoquinina (7). Para essa finalidade, as sementes pulverizadas foram extraídas exaustivamente por maceração com etanol aquoso a 96% (SILVA *et al.*, 2004).

O ensaio foi investigado *in vitro*, sendo que a hinoquinina 6 é um composto promissor para ser estudado, pois indicou uma atividade mais elevada do que o benzonidazol. Além disso, a droga terapêutica comercializada, benzonidazol, causa efeitos colaterais sérios que fazem os derivados de dibenzilbutirolactona uma fonte potencial muito importante para obter novos compostos para o tratamento da doença de Chagas (SILVA *et al.*, 2004)

No estudo da atividade antiinflamatória, a *Piper cubeba* foi utilizada por ter efeito inibitório na protease do vírus da hepatite C (JANUÁRIO *et al.*, 2002). Foram utilizados ratos machos para avaliação da atividade antiinflamatória por edema de pata, orelha e artrite, assim como atividades antialérgica (tipo IV) e analgésica. Os resultados deste demonstram claramente as atividades antialérgicas do tipo IV e antiinflamatórias significativas (HWANG & CHOI, 2003).

A atividade do extrato testado no estudo pode ser relacionada à sua atividade antioxidante, que inibe o metabolismo do ácido araquidônico durante o estágio de reação de peroxidação enzimática (NAKADATE *et al.*, 1984).

Mudar a estrutura química de compostos ativos tem sido o objetivo de químicos nos últimos anos que apontam melhorar as atividades biológicas, para reduzir os efeitos

colaterais, assim como para obter os compostos que apresentem atividades biológicas valiosas novas (WERMUTH, 1996). Do mesmo modo, (-)-cubebina (1), lignana dibenzilbutirolactona, foram modificados em sua estrutura original para render (-)-O-acetil cubenina (2), (-)-O-metil cubebina (3) e (-)-O-dimetiletilamina cubebina (4) derivados, respectivamente, por acetilação, por metilação e por aminação de seu grupo do lactol em uma tentativa de melhorar suas atividades analgésicas e antiinflamatórias, introduzindo grupos diferentes no oxigênio no carbono 9 (BASTOS *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos para o grupo tratado com a morfina eram altamente significativos. Assim, estes compostos foram considerados como não tendo nenhum efeito analgésico no sistema nervoso central que poderia contribuir para o seu efeito analgésico periférico. Com base nestas investigações, pôde-se concluir que os compostos não-esteroidais derivados da cubebina [ (2), (3) e (4) ] mostraram atividades antiinflamatórias e analgésicas similares àquela observada para as drogas não-esteroidais. Pôde-se também sugerir que o mecanismo da ação dos compostos testados pode estar associado com a inibição da síntese da prostaglandina, como observado para a maioria de drogas não-esteroidais (BASTOS *et al.*, 2004).

Efeitos antiinflamatório e analgésico de três lignanas do dibenzilbutirolactona, (-)-hinoquinina (2), (-)-6,60-dinitrohinoquinina (3), e (-)-6,60-diaminohinoquinina (4), obtidos pela síntese parcial da (-)-cubebin (1), foi investigado usando-se modelos de animais diferentes. Observou-se que os compostos (1) e (2) inibiram a formação do edema de pata do rato no mesmo nível e que todas as respostas eram dependente da dose. Também, na dose de 30 mg/kg, combina os compostos 1, 2, 3, e 4, que inibiram a formação do edema em 53%, 63%, 54%, e 82%, respectivamente, na terceira hora da experiência. No teste de indução por ácido acético nos ratos, os compostos 2 e 4

produziram níveis da inibição de 97% e de 92%, respectivamente, quando o composto 3 indicou um efeito mais baixo (75%), que foi ainda mais elevado de 1 (BASTOS *et al.*, 2005).

Em anos recentes, houve um aumento substancial no uso de terapias complementares e alternativas por pacientes com doença de fígado. Os profissionais e os laboratórios médicos necessitam ser informados sobre terapias alternativas populares e a possibilidade de que algum benefício pode vir de algumas terapias consideradas atualmente como alternativas (BEAN, 2002).

Algumas pessoas estão se voltando para as ervas para auxílio no tratamento da hepatite buscando melhora nos efeitos colaterais do interferon. Recentemente, 152 extratos metanólicos e aquosos de partes diferentes de 71 plantas usadas geralmente na medicina tradicional foram selecionados para estudos de seus efeitos inibitórios na protease de HCV (fotorreceptor) utilizados em métodos de ensaio *in vitro* (HUSSEIN *et al.*, 2000). Oito dos 152 extratos - extratos metanólicos de *Acácia nilotica*, *Boswellia carterii*, *Embelia schimperi*, *Quercus infectoria*, *Trachyspermum ammaind* e extrato aquoso de *Piper cubeba*, *Q. infectoria* e *Syzygium aromaticum* – mostraram atividades  $\geq 90\%$  de inibição na concentração de 100ug/ml. O uso de componentes botânicos glicirrizina, catequina, silimarina e fitosteróis, e os antioxidantes do N-n-acetilcisteína e a vitamina E foram revistos também para sua eficácia no tratamento de hepatite crônica e em afetar os danos do fígado, demonstrando ação hepatoprotetora (PATRICK, 1999).

Recentemente, diversos relatórios demonstraram que os compostos naturais podem causar a interação farmacocinética com prescrição convencional quando administrados simultaneamente, e reconhece-se que a inibição da enzima do citocromo P450 é uma das razões principais para essas incomuns farmacocinéticas (FOSTER *et*

*al.*, 2003; NEBEL *et al.*, 1999; TAYLOR & WILT, 1999), e que inibição de CYP pode causar sintomas de overdose, incluindo uma resposta farmacológica exagerada e/ou toxicidade da droga, e é reconhecida como importante causa de interações de drogas pela Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA) e por outras agências regulatórias (MADAN *et al.*, 2002).

Cinco lignanas do metilenedioxifenil, (-)-clusin (1), (-)-dihidroclusin (2), (-)-iatein (3), (-)-hinoquinina (4), e (-)-dihidrocubebina (5), foram isoladas da *Piper cubeba* como inibidores potentes e seletivos de encontro ao citocromo P4503A4 (CYP3A4). Foi investigado o mecanismo da inibição de CYP3A4 por estas lignanas e pela possibilidade de sua inibição mecanismo-baseada.

Outros relatórios demonstraram que na administração simultânea, algumas especiarias, ervas, chás pretos e produtos da soja podem causar a interação farmacocinética com drogas ocidentais (FOSTER, *et al.*, 2003; STRANDELL, NEIL & CARLIN, 2004; BUDZINSKI *et al.*, 2000).

A inibição do citocromo P450 (CYP) pode conduzir às interações clínicas sérias da droga quando as drogas são concomitantemente metabolizadas pelo mesmo CYP. Na investigação da atividade inibitória no metabolismo CYP3A4 e CYP2D6 de plantas medicinais da Indonésia, foi observado que as soluções da *Piper nigrum*, da *Piper cubeba* e da *Zingiber aromaticum* apresentaram atividade inibitória potente de encontro ao metabolismo do medidor CYP3A4 (USIA *et al.*, 2005b).

Resultados demonstraram que (-)-clusin (1), (-)-dihidroclusin (2), (-)-iatein (3), (-)-hinoquinina (4), e (-)-dihidrocubebina (5) isolados da *P. cubeba* causam potente inibição do CYP3A4 através da formação do complexo MI. Para determinar se essas lignanas

induzem a interação erva-droga em situações clínicas, estudos adicionais de absorção e estabilidade metabólicas são necessários (USIA *et al.*, 2005a).

## 2. OBJETIVOS

Em vista da inexistência de estudos avaliando a toxicidade genética de extratos obtidos de *Piper cubeba* e devido à sua potencialidade terapêutica para uso em seres humanos, elaborou-se este projeto visando avaliar o potencial clastogênico e genotóxico do extrato bruto obtido das bagas de *Piper cubeba* sobre células da medula óssea, hepáticas e sangüíneas de roedores *in vivo*, utilizando as técnicas de análise de eritrócitos e reticulócitos policromáticos micronucleados (teste do micronúcleo) e do ensaio cometa (SCGE).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. MATERIAIS

#### 3.1.1. Material vegetal e obtenção do extrato de *Piper cubeba*

As sementes da *Piper cubeba* L. foram importadas da Índia. As sementes foram secas ao ar (55°C), pulverizadas e extraídas por maceração com uma solução água-etanol (70.0%, 3.0 L) durante 2 dias. O macerado foi filtrado e o procedimento da extração foi repetido, tendo por resultado um extrato hidroalcoólico. A concentração dos extratos combinados sob a pressão reduzida forneceu 54 g do extrato cru (rendeu 18%).

O extrato da planta *Piper cubeba* foi obtido no Laboratório de Fitofármacos da UNIFENAS.

#### 3.1.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos machos e fêmeas com o peso entre 100 e 120 g e camundongos Swiss albinos machos e fêmeas com peso entre 30 a 40 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de Alfenas – UNIFENAS, Alfenas – MG, concedidos após aprovação pelo Comitê de Ética desta instituição (Protocolo 15 A/2005). Em todos os experimentos realizados, o número de ratos e camundongos por grupos foi igual a 6 (n = 6), sendo 3 machos e 3 fêmeas. Os animais foram tratados com ração comercial Labina – Purina e água *ad libidum*, durante todo o experimento, garantida sua adaptação por 7 dias em sala climatizada a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo claro-escuro de 12 h, e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção. Ao

término dos experimentos, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Os grupos experimentais**

#### **Avaliação de genotoxicidade**

Os experimentos foram desenvolvidos em 5 grupos de animais, constituídos cada um por três animais de cada sexo. Os tratamentos em cada grupo foram delineados considerando que a DL50 foi superior a 5.000mg/Kg. Sendo assim, serão testadas 3 doses do extrato, tendo como partida a máxima dose permitida que é de 2.000mg/Kg, sendo as outras 1.000 e 500mg/Kg. Os grupos de animais foram tratados conforme descrito a seguir:

**1. Controle positivo:** Aos camundongos foi administrada intraperitonealmente 1 mL/100g de peso corporal da droga Ethyl-nitroso-uréia (ENU) na concentração de 50 mg/Kg, e os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após a aplicação. Foram coletados cerca de 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga.

**2. Controle negativo:** Os camundongos foram tratados com 0,5 ml de água destilada, via oral, e foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após o tratamento. Foram coletados cerca de 10 microlitros de

sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga.

**3. Tratamento 1:** Os camundongos foram tratados com 0,5 mL de solução com o extrato de *Piper cubeba* na concentração de 500mg/Kg, via oral, e os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após a aplicação. Foram coletados cerca de 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga.

**4. Tratamento 2:** Os camundongos foram tratados com 0,5 mL de solução com o extrato de *Piper cubeba* na concentração de 1000mg/Kg, via oral, e os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após a aplicação. Foram coletados cerca de 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga.

**5. Tratamento 3:** Os camundongos foram tratados com 0,5 mL de solução com o extrato de *Piper cubeba* na concentração de 1500mg/Kg, via oral, e os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após a aplicação. Foram coletados cerca de 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga.

### **3.2.2. Preparo de células**

#### **Sangue total**

Misturar 20 $\mu$ l de sangue com 120 $\mu$ l de agarose LMP; então adicionar na lâmina.

### 3.2.3. Preparo das lâminas

- 1) Limpar lâminas com etanol antes do uso.
- 2) Preparar agarose normal 1,5% (300mg em 20ml PBS) e ferver 2-3 vezes antes do uso. Mergulhar a lâmina na agarose quente ( $>60^{\circ}\text{C}$ ), retirar a agarose de um lado das lâminas com papel e colocar em posição horizontal para secar *overnight* em temperatura ambiente (procedimento rápido). Essas lâminas podem ser estocadas e usadas por várias semanas.
- 3) Preparar agarose 0,5% (100mg em 20ml PBS). Aquecer em microondas e colocar em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  para uso.
- 4) Adicionar  $120\mu\text{l}$  de agarose LMP ( $37^{\circ}\text{C}$ ) com  $5\text{-}15\mu\text{l}$  de suspensão celular. Cobrir com lamínula e condicionar em refrigerador durante 10-20 minutos. Após a adição das células na lâmina, evitar exposição à luz direta (irradiação) para prevenção de danos adicionais no DNA.
- 5) As lamínulas são retiradas gentilmente e as lâminas acondicionadas na solução de lise em refrigerador ( $4^{\circ}\text{C}$ ) durante pelo menos 1 hora. As lâminas podem ser estocadas durante períodos longos na solução de lise gelada (mas geralmente não mais do que 4 semanas). Quando ocorrer precipitação da solução de lise, as lâminas podem ser lavadas gentilmente em PBS antes da eletroforese.

### 3.2.4. Eletroforese e coloração

- 1) Após o tempo da lise, remover as lâminas gentilmente. Colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese preenchendo o máximo possível os espaços (completar com lâminas limpas).
- 2) Adicionar o tampão de eletroforese gentilmente até cobrir as lâminas. Realizar a eletroforese mergulhando a cuba em recipiente com gelo (4°C).
- 3) Deixar desnaturando o DNA no tampão alcalino de 20 a 60 minutos. Para a maioria dos experimentos 25 minutos é o tempo recomendado.
- 4) Iniciar a corrida de eletroforese com 25 volts e 300 miliamperes acertando esses parâmetros, removendo ou adicionando tampão. Dependendo do experimento a corrida pode variar de 10-40 minutos. Para a maioria dos experimentos, 25 minutos é o tempo recomendado.
- 5) Após a eletroforese, retirar as lâminas gentilmente e neutralizar com 5ml de solução, aproximadamente durante 5 minutos. Repetir mais duas vezes.
- 6) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol durante 5 minutos. Estocar as lâminas na geladeira para posterior análise (quando necessário). Para coloração, adicionar 100µl de brometo de etídeo e cobrir com lamínula, deixar descansar 5 minutos e analisar. As lâminas devem ser coradas uma por uma e analisadas imediatamente.

### **3.2.5. Avaliação dos danos no DNA**

Para visualização dos danos no DNA, as lâminas são observadas em aumento 250x (400x) usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de

515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Geralmente são analisadas 50 células de cada amostra (100 células). A avaliação pode ser feita de três maneiras:

- 1) Analisar 50 células visualmente de acordo com a intensidade da cauda em 5 classes (de não danificada, 0, até dano máximo, 4). Iniciar com 4 classes (0 - sem dano; 1 - dano pequeno; 2 - dano médio; e 3 - dano máximo). Fazer o escore (somatório do número de células identificadas em cada classe vezes o valor da classe).
- 2) Analisar 50 células utilizando ocular com escala de calibração. Para cada célula, é medida (microns) a extensão da imagem (diâmetro do núcleo mais a migração do DNA), calculando-se uma média.
- 3) Sistema de análise de imagem com câmara CCD e programa específico para avaliação do cometa.

### **3.2.6. Teste do cometa em células da medula óssea de ratos**

- 1) Tratar o rato i.p. durante 1h com 0,1ml de MMS (0,2M)
- 2) Sacrificar os animais por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas.
- 3) Região dorsal.
- 4) Retirar a medula com 1ml de SBF 9.
- 5) Homogeneizar o material e centrifugar 5 min, 800rpm.
- 6) Preparar a suspensão celular (quando necessário diluir com PBS) e iniciar o teste do cometa.

### **3.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA PARA ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS (TÉCNICA PARA RATOS WISTAR)**

A técnica utilizada para a obtenção das células de medula óssea para o estudo da frequência de micronúcleos foi de SCHIMID (1976), modificada por ZAMBRANO et al. (1982), que consiste em:

1. Administrar a substância a ser testada por via oral ou intraperitoneal.
2. Submeter o animal à eutanásia por deslocação cervical ou eterização.
3. Retirar o fêmur.
4. Limpar o osso e cortar na epífise proximal.
5. Aspirar 1,0 ml de NaCl 0,9% à temperatura ambiente de um tubo de centrífuga cônico em seringa de 1cm<sup>3</sup> e introduzir agulha na extremidade aberta do fêmur.
6. Lavar a medula, em tubo de centrífuga cônico contendo 3 ml de NaCl 0,9%.
7. Homogeneizar a suspensão com pipeta Pasteur siliconizada.
8. Centrifugar a 1000 rpm/ 5 mim.
9. Descartar o sobrenadante. Adicionar 5 gotas de formol 4% e homogeneizar o botão de células com pipeta Pasteur.
10. Transferir uma gota de suspensão celular para a lâmina e fazer o esfregaço.
11. Deixar secar no ar.
12. No dia seguinte, fixar em álcool 70% durante 10 mim.
13. Secar bem.
14. Corar com Giemsa diluído 1:10 em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 mim.
15. Lavar em água corrente.

16. Secar bem.
17. Observar em objetiva de imersão.

### **3.3.1. SANGUE PERIFÉRICO**

1. Colher o material da veia ocular do animal (com capilar de hematócrito) e gotejar o sangue diretamente sobre a lâmina seca. Com uma lamínula fazer o esfregaço como no caso anterior
2. Secar e fixar em metanol por 5 minutos
3. Corar com Giemsa (1:10) por 20 minutos apenas no dia seguinte

### **3.4. Análise estatística**

#### ***In vivo***

O número de animais por grupo experimental pode variar de espécie para espécie. Geralmente, não se deve utilizar menos que 4 animais por grupo, pois considera-se o mínimo de 4 medidas por grupo/tratamento. Assim sendo, deve-se considerar a utilização de 6-10 animais por grupo para não correr o risco de invalidar o experimento, caso algum animal adoença ou vá a óbito. Obtém-se, assim, uma média e desvio padrão de cada animal. Cada grupo terá, portanto, o mínimo de quatro médias. Com essas médias, será feita a análise estatística com teste-t de Student ou ANOVA, dependendo da quantidade de grupos. Novamente, podem-se utilizar os múltiplos teste-t, como descrito acima, no caso de avaliação de efeito dose-resposta. Os dados devem

ser apresentados como a média do grupo (ou seja, média das 4 médias)  $\pm$  desvio padrão ou erro padrão das médias. Para facilitar a interpretação, pode-se calcular e apresentar os dados em tabelas e gráficos como média  $\pm$  intervalo de confiança a 95%, o qual é diretamente proporcional ao desvio padrão e inversamente proporcional ao tamanho da amostra (TICE et al., 2000).

#### 4. ARTIGO

### **Clastogenicity and genotoxicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) extract in mammalian cell system *in vivo***

Adriana Pereira Freire Junqueira\*, Fabio Ferreira Perazzo\*\*, Gustavo Henrique Bianco Souza\*\*\* and Edson Luis Maistro\*

\* Faculdade de Farmácia, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas Campus, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

\*\* Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Brazil.

\*\*\* Lab. de Química Orgânica, NuBBE II - I.Q. UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil.

RUNNING HEAD: Clastogenic/Genotoxic effects of *Piper cubeba*.

KEY WORDS: *Piper cubeba*, micronucleus test, Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE.

\*Corresponding author: Edson Luis Maistro. UNIFENAS, Laboratório de Genética, Caixa Postal 23, Alfenas, MG, Brazil. 37130-000. Fax. +55 35 32993125;

E-mail address: edson.maistro@unifenas.br

## Abstract

*Piper cubeba*, widely distributed in the tropical and subtropical regions of the world, is used medicinally in various manners without genetic toxicity evaluation. In this study we investigated the clastogenic and genotoxic potential of the crude extract of the fruits of *P. cubeba* in rodents cells using the micronucleus and single cell gel electrophoresis (SCGE) test systems. The animals were treated by gavage with 3 concentrations of the extract: 25, 50 and 75 per cent of the LD<sub>50</sub> (2 g/kg). From Swiss mice peripheral blood was collected 24 h after the treatment for SCGE assay, and 48 and 72 h for the micronucleus test, when the animals were sacrificed. From Wistar rats peripheral blood and hepatic cells were collected for SCGE assay, and bone marrow cells for micronucleus test 24 h after the treatment and then the animals were submitted to euthanasia. At the 75% of the LD<sub>50</sub> extract concentration a statistically significant increase was observed in the mean number of cells with micronuclei and with DNA damage in all rodents cell types analyzed. Genetic toxicity was observed in three of the animal groups at the 50% of the LD<sub>50</sub> concentration. Under our experimental conditions, *P. cubeba* extract showed moderate clastogenic and genotoxic effect in the rodents cells.

## Introduction

A number of natural products are used in the traditional medical systems in many countries. Alternative medicine for treatment of various diseases is getting more popular. Many medicinal plants provide relief of symptoms comparable to that obtained from allopathic medicines. Therefore, an assessment of their genotoxic and clastogenic potential is necessary to ensure a relatively safe use of medicinal plants (Surh and Ferguson, 2003).

The genus *Piper* belongs to the Piperaceae family and has over 1000 species distributed in both hemispheres. They are erect or scandent herbs, shrubs or infrequently trees. People throughout the tropics use *Piper* for many purposes, such as food, ornamentals, spices, perfumes, oils, fish bait, fish poison, insecticides, hallucinogens, and many medicines (Barrett, 1994; Joly 1981). A number of compounds have been isolated from *Piper*, such as terpenes, phenylpropanoids, lignans, other phenolic and a series of alkaloids (Jensen *et al.*, 1993; Parmar *et al.*, 1997).

*Piper cubeba* L. is one of the popular medicinal plants extensively used in Indonesia. The fruits are used as a spice and for the treatment of gonorrhoea, dysentery, syphilis, abdominal pain, diarrhoea, enteritis, and asthma (Eisai, 1995). *P. cubeba* (fruit) has been reported to have inhibitory effect on hepatitis C virus protease (Januario *et al.*, 2002). Choi and Hwang (2003) demonstrated the significant anti-inflammatory and antinociceptive activities of the methanolic extract from fruits of *P. cubeba*. In Brazil, *P. cubeba* is popularly known as “pimenta de Java”.

In view of the potential therapeutic use of *P. cubeba* extract and the absence of any data on its genetic toxicity in eukaryotes, the present study was undertaken to

evaluate the potential clastogenic and genotoxic effects of this extract in terms of DNA damage in hepatic and peripheral blood cells and induction of micronuclei in bone marrow cells and reticulocytes of rodents *in vivo*.

## Material and Methods

### Plant material

Seeds of *Piper cubeba* L. were imported from India. The seeds were air dried (55 °C), powdered and extracted by maceration with a water-ethanolic solution (70.0%, 3.0 L) during 2 days. The macerate was filtered, and the extraction procedure repeated, resulting in the crude water-ethanolic extract. Concentration of the combined extracts under reduced pressure furnished 54 g of crude extract (yielded 18%).

### Chemicals

The agent N-nitroso-N-ethylurea (ENU, CAS No. 759-73-9) was used as the DNA damaging agent in the SCGE and micronucleus assay using Swiss mice. It was dissolved in phosphate-buffer pH 6. The alkylating agent cyclophosphamide (CPA, CAS: C 0768, Sigma) was used as the clastogenic agent in the micronucleus assay and SCGE using Wistar rats. The other main chemicals used were obtained from the following suppliers: normal melting point (NMP) agarose (Cat. No. 15510-019: Invitrogen); low melting point (LMP) agarose (Cat. No. 15517-014: Invitrogen); Sodium salt *N*-lauroyl sarcosine (L-5125: Sigma) and EDTA (Merck).

### Animals and assay procedures

Experiments were carried out on six-week-old Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing approximately 100 g and on Swiss mice (*Mus musculus*) 12 weeks old, weighing 25-30 g. The animals were acquired from the animal house of the Jose do Rosario Vellano University (UNIFENAS), kept in polyethylene boxes ( $n = 6$ ), in a climate-controlled environment ( $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$  humidity) with a 12h, light/dark cycle (7 a.m. to 7 p.m.). Food and water were available *ad libitum*. Rats and mice were divided into experimental groups of six animals, three females and three males each. *Piper cubeba* extract was administered in a single dose of 0.5ml by gavage at concentrations of 25%, 50% and 75% of the  $\text{LD}_{50}$  (2 g/kg, Perazzo F.F., personal communication). The negative control groups (both mice and rats) received distilled water. The positive control group using Swiss mice received 50 mg of N-nitroso-N-ethylurea/kg and the Wistar rats received 30 mg of cyclophosphamide/kg. For the micronucleus (MN) assay on Wistar rats cells, animals were sacrificed 24 hours after the treatment and the bone marrow cells from one femur were prepared as recommended by Schmid (1976). For the micronucleus (MN) assay on Swiss mice, peripheral blood was collected from orbital the vein 48 and 72 h after the treatment and then blood smears were made. All the slides were coded, fixed with methanol and stained with Giemsa solution. For micronucleus (MN) presence two thousand polychromatic erythrocytes were scored from each Wistar rat and four thousand reticulocytes from each Swiss mice (2000 cells from 48 h blood sample and 2000 cells from 72 h blood samples).

The single cell gel electrophoresis test (SCGE) was carried out by the method described by Speit and Hartmann (1999), which is based on the original work of Singh *et*

*al.* (1988) and includes modifications introduced by Klaude *et al.* (1996), as well as additional modifications. Four and 24 hours after the treatment, peripheral blood cells from Swiss mice were taken, and 24 h after the treatment peripheral blood and liver cells from Wistar rats were taken. Liver cells were washed in saline solution, in an ice bath. A small portion was transferred to a Petri dish containing 1 mL of Hank's solution (pH 7.5) and then homogenized gently. A 10  $\mu$ l aliquot of the cells from each animal was mixed with 120  $\mu$ l of 0.5% low melting point agarose at 37°C, and rapidly spread onto microscope slides pre-coated with 1.5% normal melting point agarose. Coverslips were added and the slides were allowed to gel at 4°C for 20 min. The coverslips were removed gently and the slides were then immersed in cold, freshly prepared lysing solution consisting of 89 ml of a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH set to 10.0 with ~8g solid NaOH, 890 ml of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosine), plus 1 ml of Triton X-100 (Merck) and 10 ml of DMSO. Protected from light, the slides were left to stand at 4°C for 1 h and then placed in the gel box, positioned at the anode end, and left in a high pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH per 1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 N NaOH and 200 mM, pH 10.0, EDTA) at 4°C for 20 min before electrophoresis to allow the DNA to unwind. Electrophoresis run was performed in an ice bath (4°C) for 20 min at 25 V and 300 mA. The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethyl alcohol for 10 min. The slides were dried and stored at least overnight before staining. For the process of staining, slides were briefly rinsed in distilled water, covered with 30  $\mu$ l of 1x ethidium bromide staining solution prepared from a 10x stock (200 $\mu$ g/ml) and covered with a coverslip. The material was

evaluated immediately at 400x magnification, using a fluorescence microscope (Nikon) with a 515-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter.

#### Scoring procedures and data evaluation

The extent and distribution of DNA damage indicated by the SCGE assay was evaluated by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells on the slides per each animal. These cells were scored visually according to tail size into four classes, as follow: (1) class 0: undamaged, with no tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1 to 2x the diameter of the head; and (4) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head. Comets with no heads and images with nearly all DNA in the tail, or with a very wide tail, were excluded from evaluation because they probably represent dead cells (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 200 comets was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class, ranging from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged). The Animal Bioethical Committee of the UNIFENAS approved the present study on October 25, 2005.

#### Statistical Analysis

The data obtained on micronucleus and SCGE assays were submitted to One-way analysis of variance test (ANOVA) and the Tukey-Kramer multiple comparison test (Sokal and Rohlf, 1995), using the GraphPad InStat<sup>®</sup> software (version 3.01). Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

The single cell gel electrophoresis (SCGE) is a sensitive, reliable, and rapid method for DNA double- and single-strand breaks, alkali-labile sites and delayed repair site detection, in eukariotic individual cells. The test is an important tool to evaluate genotoxic potential of compounds *in vitro* and *in vivo* (Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000; Sekihashi *et al.*, 2002). In the present study, we performed SCGE to evaluate the genotoxic potential of *P. cubeba* crude extract *in vivo*. Table 1 shows the effect of a 24 h treatment with the *P. cubeba* on DNA migration in peripheral blood cells from Swiss mice, and Tables 2 and 3 shows the effects of a 24h treatment with the extract on DNA migration in peripheral blood and liver cells from Wistar rats on the comet assay, respectively. As expected, N-nitroso-N-ethylurea and cyclophosphamide agents used as positive control lead to some fragmentation and migration of the fragments in the SCGE assay peripheral blood and liver cells ( $p < 0.001$ ). Statistically significant increase in the total cells with damage and the scores were observed at the 75% of the LD<sub>50</sub> extract concentration tested in the blood cells of Swiss mice and in the liver cells of Wistar rats ( $p < 0.001$ ; Tables 1 and 3), and statistically significant increase in DNA damage were found at the 50% and 75% of the LD<sub>50</sub> extract concentration in the blood cells of Wistar rats ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) (Table 2). In the concentrations with significant increase in DNA damage, the majority of the damaged cells showed minor damage (class 1) and very few showed a large amount of damage (class 2 and 3).

The micronucleus assay in rodents is the *in vivo* test on genotoxic effects (chromosome aberrations) with the best documentation concerning the number of tested chemicals (Morita *et al.*, 1997). Experiments using erythrocytes from other mammalian

species, including man, rat, and also wild-living rodent species, have met a lesser degree of success when compared to experiments with mice concerning, e.g., sensitivity in the detection of the effects of low doses of radiation and chemicals (Simula and Priestly, 1992; Holden *et al.*, 1997).

In the present study the micronucleus assay was used to evaluate the clastogenic potential of *P. cubeba* extract. Table 4 shows the micronucleus test results obtained for female and male Swiss mice treated with *P. cubeba* extract, the number of micronucleated polychromatic reticulocytes (MNRET) of each animal and means, for untreated controls and treated animals. The clastogenicity test revealed enhancement in the mean number of micronucleated polychromatic reticulocytes at 50% and 75% of the LD<sub>50</sub> doses ( $p < 0.001$ ) on both cell blood samples analyzed (48 and 72h) and, as was expected, N-nitroso-N-ethylurea administered intraperitoneally as positive control at 50 mg/kg showed a significant increase in the mean number of cells with micronuclei ( $p < 0.001$ ).

Table 5 summarizes the results of the analysis of micronucleus in bone marrow cells of Wistar rats following treatment with the three concentrations of the *P. cubeba* tested and controls. The extract resulted in a statistically significant increase in the average number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) at 50% and 75% of the LD<sub>50</sub> extract doses ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). The PCE/NCE ratio was significantly increased in the treatment with 50% of the LD<sub>50</sub> extract dose ( $p < 0.01$ ) indicating that the *P. cubeba* extract does not present cytotoxic properties in bone marrow cells of the rats at any tested doses and induce a significant increase in the mitotic index at 50% of the LD<sub>50</sub> extract concentration.

Jha *et al.* (2002) observed clastogenic effect of the chemical carbazole in mouse bone marrow cells *in vivo* only for the two higher tested doses, concluding that carbazole or its metabolite is moderately clastogenic in the cells of Swiss mice. Similar results were obtained in the present study using the association of SCGE and micronucleus assay.

The phytochemistry screen of *P. cubeba* extracts have shown the presence of alkaloids/amides, lignans, neolignans, terpenes and miscellaneous compounds as piperol A, piperol A-triacetate, piperol B, piperol C, (+)-Zeylinol, among others (see Parmar *et al.*, 1997 for a review). *Piper guineense*, *P. brachystachyum* and *P. nigrum* are species of the genus *Piper* that present insecticidal properties (Jacobson and Crosby, 1971; Parmar *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 2006). Some compounds present in *P. cubeba* seed extract are also present in *P. guineense* seed extract such as alkaloid piperine, lignans aschantin, dihydrocubebin and sesamin, and several terpenes as  $\alpha$ -copaene, p-cymene, germacrene D, limonene, among others (see Parmar *et al.*, 1997, for a review). Since several insecticides have compounds with mutagenic effects (Jha *et al.*, 2002; Beard, 2006), the clastogenic and genotoxic effects of the *P. cubeba* seed extract observed in the present work could be attributed to some compound with insecticide potential. We intend to investigate some isolated compounds from *P. cubeba* extract to verify this hypothesis.

The genotoxic and clastogenic effect of *P. cubeba* extract on the cells of Swiss mice and Wistar rats was studied for the first time in the present work. The results indicated that the mixture of the compounds found in these extracts induced a significant increase in the mean number of cells with DNA damage and with micronuclei only when given at high doses, indicating that the extract or its metabolites showed moderate

genetic toxicity in the rodents cells and that caution is necessary regarding its indiscriminate use by the public.

#### Acknowledgments

This investigation was supported by FAPEMIG (Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos, EDT – 1879/02), and UNIFENAS.

Table 1 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Piper cubeba* extract in peripheral blood cells from Swiss mice female (F) and male (M) *in vivo*.

Treatments	Comet class						Scores
	Animals	Total <sup>1</sup>	0	1	2	3	
Negative control (Water)	F <sub>1</sub>	3	97	2	1	0	4
	F <sub>2</sub>	7	93	5	1	1	10
	F <sub>3</sub>	2	98	2	0	0	2
	M <sub>1</sub>	8	92	6	2	0	10
	M <sub>2</sub>	9	91	7	2	0	11
	M <sub>3</sub>	12	88	9	2	2	16
		<b>6.83 ± 3.76</b>	<b>93.1 ± 3.76</b>	<b>5.16 ± 2.78</b>	<b>1.33 ± 0.81</b>	<b>0.33 ± 0.51</b>	<b>8.83 ± 5.0</b>
<i>P. cubeba</i> extract (25% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	6	94	5	1	0	7
	F <sub>2</sub>	7	93	6	1	0	8
	F <sub>3</sub>	3	97	3	0	0	3
	M <sub>1</sub>	5	95	4	1	0	6
	M <sub>2</sub>	3	97	3	0	0	3
	M <sub>3</sub>	20	80	16	4	0	24
		<b>7.33 ± 6.40</b>	<b>92.6 ± 6.40</b>	<b>6.16 ± 4.96</b>	<b>1.16 ± 1.47</b>	<b>0.0 ± 0.0</b>	<b>8.50 ± 7.86</b>
<i>P. cubeba</i> extract (50% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	13	87	12	1	0	14
	F <sub>2</sub>	18	82	16	2	0	20
	F <sub>3</sub>	37	63	34	3	0	40
	M <sub>1</sub>	17	83	17	0	0	17
	M <sub>2</sub>	28	72	25	3	0	31
	M <sub>3</sub>	10	90	9	1	0	11
		<b>20.5 ± 10.1</b>	<b>79.5 ± 10.1</b>	<b>18.8 ± 9.19</b>	<b>1.66 ± 1.21</b>	<b>0.0 ± 0.0</b>	<b>22.1 ± 11.1</b>
<i>P. cubeba</i> extract (75% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	22	78	20	2	0	24
	F <sub>2</sub>	58	42	55	2	1	62
	F <sub>3</sub>	43	57	41	2	0	45
	M <sub>1</sub>	47	53	47	0	0	47
	M <sub>2</sub>	32	68	30	2	0	34
	M <sub>3</sub>	33	67	32	1	0	34
		<b>39.1* ± 12.7</b>	<b>60.8* ± 12.7</b>	<b>37.5* ± 12.6</b>	<b>1.50 ± 0.83</b>	<b>0.16 ± 0.40</b>	<b>41* ± 13.2</b>
N-Nitroso-N-Ethylurea (50 mg/kg)	F <sub>1</sub>	68	32	63	3	2	75
	F <sub>2</sub>	60	40	57	3	0	63
	F <sub>3</sub>	64	46	60	4	0	68
	M <sub>1</sub>	43	57	40	1	2	48
	M <sub>2</sub>	55	45	52	2	1	59
	M <sub>3</sub>	82	18	76	6	0	88
	<b>Mean ± SD</b>	<b>62.0* ± 13.0</b>	<b>39.6* ± 13.3</b>	<b>58.0* ± 11.9</b>	<b>3.16 ± 1.72</b>	<b>0.83 ± 0.98</b>	<b>66.8* ± 13</b>

\* Significantly different from the negative control (p < 0.001);

<sup>1</sup>Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 2 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of a *Piper cubeba* extract on peripheral blood cells from Wistar rats female (F) and male (M) *in vivo*.

Treatments	Animals	Total <sup>1</sup>	Comet class				Scores
			0	1	2	3	
Control	F <sub>1</sub>	6	94	6	0	0	6
	F <sub>2</sub>	6	94	6	0	0	6
	F <sub>3</sub>	4	96	3	1	0	5
	M <sub>1</sub>	2	98	2	0	0	2
	M <sub>2</sub>	3	97	3	0	0	3
	M <sub>3</sub>	1	99	1	0	0	1
		<b>3.66 ± 2.06</b>	<b>96.3 ± 2.0</b>	<b>3.5 ± 2.0</b>	<b>0.16 ± 0.4</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>3.83 ± 2.1</b>
<i>P. cubeba</i> extract (25% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	32	68	27	5	0	37
	F <sub>2</sub>	2	98	2	0	0	2
	F <sub>3</sub>	4	96	4	0	0	4
	M <sub>1</sub>	1	99	1	0	0	1
	M <sub>2</sub>	2	98	2	0	0	2
	M <sub>3</sub>	1	99	1	0	0	1
		<b>7.0 ± 12.2</b>	<b>93.0 ± 12.2</b>	<b>6.1 ± 10.2</b>	<b>0.83 ± 2.0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>7.83 ± 14.3</b>
<i>P. cubeba</i> extract (50% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	27	73	27	0	0	27
	F <sub>2</sub>	20	80	20	0	0	20
	F <sub>3</sub>	30	70	29	1	0	31
	M <sub>1</sub>	42	58	42	0	0	42
	M <sub>2</sub>	59	51	59	0	0	59
	M <sub>3</sub>	49	51	48	1	0	50
		<b>37.8** ± 14.7</b>	<b>63.8** ± 12.2</b>	<b>37.5** ± 14.7</b>	<b>0.33 ± 0.5</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>38.1* ± 14.7</b>
<i>P. cubeba</i> extract (75% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	62	38	50	9	3	77
	F <sub>2</sub>	73	27	63	9	1	84
	F <sub>3</sub>	59	41	59	0	0	59
	M <sub>1</sub>	53	44	53	0	0	53
	M <sub>2</sub>	29	71	24	2	3	31
	M <sub>3</sub>	26	74	23	3	0	28
		<b>50.3*** ± 18</b>	<b>49.1*** ± 18.9</b>	<b>45.3*** ± 17.5</b>	<b>3.83 ± 4.1</b>	<b>1.16 ± 1.4</b>	<b>55.3*** ± 23</b>
Cyclophosphamid	F <sub>1</sub>	29	70	25	4	0	33
	F <sub>2</sub>	58	42	53	5	0	63
	F <sub>3</sub>	55	45	49	5	1	62
	M <sub>1</sub>	32	68	30	1	1	35
	M <sub>2</sub>	69	31	61	8	0	77
	M <sub>3</sub>	17	83	16	1	0	18
		<b>43.3** ± 20.1</b>	<b>56.5*** ± 20.0</b>	<b>39.0** ± 17.8</b>	<b>4.0 ± 2.6</b>	<b>0.33 ± 0.5</b>	<b>48** ± 22.6</b>
<b>Mean ± SD</b>							

\* Significantly different from the negative control (P<0.05);

\*\* Significantly different from the negative control (P<0.01);

\*\*\* Significantly different from the negative control (P<0.001);

<sup>1</sup>Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 3 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of a *Piper cubeba* extract on liver cells from Wistar rats female (F) and male (M) *in vivo*.

Treatments	Animals	Total <sup>1</sup>	Comet class				Scores
			0	1	2	3	
Control	F <sub>1</sub>	5	95	4	1	0	6
	F <sub>2</sub>	5	95	5	0	0	5
	F <sub>3</sub>	2	98	2	0	0	2
	M <sub>1</sub>	11	89	8	3	0	14
	M <sub>2</sub>	4	96	4	0	0	4
	M <sub>3</sub>	2	98	2	0	0	2
		<b>4.83 ± 3.31</b>	<b>95.1 ± 3.31</b>	<b>4.16 ± 2.22</b>	<b>0.66 ± 1.21</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>5.5 ± 4.4</b>
<i>P. cubeba</i> extract (25% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	14	86	14	0	0	14
	F <sub>2</sub>	6	94	6	0	0	6
	F <sub>3</sub>	6	94	6	0	0	6
	M <sub>1</sub>	11	89	11	0	0	11
	M <sub>2</sub>	2	98	2	0	0	2
	M <sub>3</sub>	4	96	4	0	0	4
		<b>7.16 ± 4.49</b>	<b>92.8 ± 4.49</b>	<b>7.16 ± 4.49</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>7.1 ± 4.4</b>
<i>P. cubeba</i> extract (50% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	7	93	7	0	0	7
	F <sub>2</sub>	16	84	14	2	0	18
	F <sub>3</sub>	8	92	7	1	0	9
	M <sub>1</sub>	21	78	19	3	0	25
	M <sub>2</sub>	32	68	29	2	1	36
	M <sub>3</sub>	50	50	45	4	1	56
		<b>22.3 ± 16.3</b>	<b>77.5 ± 16.3</b>	<b>20.1 ± 14.7</b>	<b>2.0 ± 1.41</b>	<b>0.33 ± 0.51</b>	<b>25.1 ± 18.4</b>
<i>P. cubeba</i> extract (75% DL <sub>50</sub> )	F <sub>1</sub>	57	43	40	12	5	79
	F <sub>2</sub>	58	42	51	4	3	68
	F <sub>3</sub>	61	39	52	6	3	73
	M <sub>1</sub>	65	35	55	7	3	78
	M <sub>2</sub>	51	49	50	1	0	52
	M <sub>3</sub>	26	74	23	3	0	29
		<b>53.0*** ± 14.0</b>	<b>53*** ± 14</b>	<b>45*** ± 11</b>	<b>5.5** ± 3.8</b>	<b>2.3** ± 1.9</b>	<b>63.1*** ± 19.4</b>
Cyclophosphamid	F <sub>1</sub>	30	70	26	4	0	34
	F <sub>2</sub>	69	31	64	4	1	75
	F <sub>3</sub>	60	40	52	7	1	69
	M <sub>1</sub>	32	68	30	1	1	35
	M <sub>2</sub>	61	39	53	8	0	7
	M <sub>3</sub>	37	63	32	5	0	42
		<b>48.1*** ± 17.0</b>	<b>51.8*** ± 17</b>	<b>42*** ± 15</b>	<b>4.8* ± 2.4</b>	<b>0.5 ± 0.5</b>	<b>43.6** ± 25</b>

\* Significantly different from the negative control (P<0.05);

\*\* Significantly different from the negative control (P<0.01);

\*\*\* Significantly different from the negative control (P<0.001);

<sup>1</sup>Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 4 – Number of micronucleated reticulocytes (MNRETs) observed in the peripheral blood cells of female (F) and male (M) Swiss mice treated with a *Piper cubeba* extract, and respective controls. For each time period (48 and 72 h) 2000 cells were analyzed, giving a total of 4000 cells per animal. SDM = standard deviation of the mean.

Treatments	Blood collect time	Number of MNRETs per Animal						Mean MNRETs $\pm$ SD
		F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	
Negative control (water)	48 h	1	2	3	1	2	2	1.83 $\pm$ 0.75
	72 h	1	3	2	2	2	1	1.83 $\pm$ 0.75
<i>P. cubeba</i> (25% DL <sub>50</sub> )	48 h	4	6	5	6	0	4	4.16 $\pm$ 2.22
	72 h	4	5	5	4	6	2	4.33 $\pm$ 1.36
<i>P. cubeba</i> (50% DL <sub>50</sub> )	48 h	9	5	7	7	8	4	6.66* $\pm$ 1.86
	72 h	8	11	6	4	8	7	7.33* $\pm$ 2.33
<i>P. cubeba</i> (75% DL <sub>50</sub> )	48 h	5	8	6	6	7	7	6.50* $\pm$ 1.04
	72 h	7	6	6	7	7	7	6.66* $\pm$ 0.51
Positive control N-Nitroso-N-Ethylurea (50 mg/kg)	48 h	10	9	8	8	7	7	8.16* $\pm$ 1.16
	72 h	9	8	9	8	9	7	8.33* $\pm$ 0.81

\* Significantly different from negative control ( $p < 0.001$ ).

Table 5 – Mean of polychromatic erythrocytes with micronuclei (MNPCE) observed in bone marrow cells of female (F) and male (M) Wistar rats treated with a *Piper cubeba* extract, and respective controls. Two thousand cells were analyzed per animal, for a total of 12000 cells per group. SDM = standard deviation of the mean.

Treatments	Dose mg/kg	Number of MNPCE per animal						MNPCE (Mean ± SDM)	PCEs/NCEs (Mean ± SDM)
		F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>		
Negative control (Water)	0	2	1	3	4	0	1	1.83 ± 1.47	1.34 ± 0.22
<i>Piper cubeba</i> extract	25% DL <sub>50</sub>	3	1	2	1	1	3	1.83 ± 0.98	0.95 ± 0.1
<i>Piper cubeba</i> extract	50% DL <sub>50</sub>	6	4	7	5	5	6	5.5* ± 1.04	2.16 ± 0.67
<i>Piper cubeba</i> extract	75% DL <sub>50</sub>	8	3	7	5	5	9	6.16** ± 2.22	1.6 ± 0.22
Positive control (Cyclophosphamide)	50	8	5	1	9	8	7	6.33** ± 2.94	1.8 ± 0.28

Polychromatic erythrocytes (PCEs) / Normochromatic erythrocytes (NCEs): One thousand cells were analyzed per animal.

\* Significantly different from negative control (P < 0.05).

\*\* Significantly different from negative control (P < 0.01).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHNSTROM, G.; Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: A review. Int. J. Radiat. Biol., v. 54, p. 695-707, 1988.

ALBERTINI, K.J. *et al.*; IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. Mutat. Res., v. 463, p. 111-172, 2001.

ALVES, D. L. & SILVA, C. R. da.; Fitohormônios: Abordagem Natural da Terapia Hormonal. São Paulo: Editora Atheneu, p 1- 02. 2002.

AMES, B. N.; GOLD., L. S.; Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. Mutat. Research, v. 447, p. 3-13, 2000.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B; PONTES, A. L.; Bull. World Health Org., v. 63, p. 721, 1985.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; Rev. Inst. Med. Trop, S. Paulo, v. 30, p. 27, 1996.

BADHEKA, L. P. *et al.*; Lignans of Piper cubeba. Phytochemistry, v. 26, n. 7, p. 2033-2036, 1987.

BADHEKA, L. P. *et al.*; Dibenzylbutyrolactone lignans from Piper cubeba. Phytochemistry , v. 25, n 2, p. 487-490, 1986.

BARRETT, B.; Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic Coast. Economic Botany, v. 481, p. 8-20, 1994.

BASTOS, J. K., *et al.*; Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-O-acetyl, (-)-O-methyl, (-)-O-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. Elsevier SAS. 2003. IL FARMACO, v. 59, p. 55-61, 2004.

BASTOS, J. K., *et al.*; Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter, vol. 15, p. 1033-1037, 2005.

BEAN, P.; The use of alternative medicine in the treatment of hepatitis C; American Clinical Laboratory, 2002.

BEARD, J.; DDT and human health. Sci Total Environ. V. 355, p. 78-89, 2006.

BRENER, Z.; ANDRADE, C.; O parasita e as relações hospedeiro-parasita. O Trypanosoma cruzi e a doença de chagas. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1–41.

BUDZINSKI, J.W. *et al.*; Phytomedicine, v. 7, p. 273-282, 2000.

CHAGAS, C. R. J. das: Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 1(2):159-218, ago. 1909.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K.; Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. Journal of Ethnopharmacology, v. 89, p. 171-175, 2003.

CHOY, W. N.; Regulatory genetic toxicology tests. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment, New York, p. 93-113, 2001.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; Conformational constraints in nuclear DNA. J. Cell Sci., v. 22, p. 287-302, 1976.

COOK P. R.; BRAZELL I. A.; The superhelical density of nuclear DNA from human cells. Eur J. Biochem, v. 74, p. 527-531, 1977.

DOLL, R.; PETO, R.; The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Natl Cancer Inst., v. 66, p. 1191-1308, 1981.

EISAI, P.T.; Medicinal Herb Index in Indonesia. 2. ed. Indonésia: Jakarta, 1995, p.21.

ERIKSSON, S, NYGREN J, AHNSTROM G; Matrix association of early – and late – replicating chromatin studied by single cell gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta., v. 1590, p. 103 – 108, 2002.

FEARON, E. R.; VOLGELSTEIN, B.; A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, v. 61, p. 759-767, 1990

FOSTER, B.C. *et al.*; In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. Phytomedicine, v. 10, p. 334–342, 2003.

GARDNER, E. J.; Principles of Genetics. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1977.

GARDNER, J. E. & SNUSTAD, P.; Principles of Genetics; 7. ed.; New York: John Wiley & Sons. Inc., 1986.

GEORGE, E., WOTTON, A.K.; GATEHOUSE, D.G.; Micronucleous induction by azobenzene and 1,2-dibromo-3-chloropropane in rat: Evaluation of a triple-dose protocol. Mutat Res., v. 324, p. 129 – 134, 1990.

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

HAYASHI, M. *et al*; The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutat. Res., v. 245, p. 245-249, 1994.

HOLDEN, H.E., MAJESKA, J.B.; STUDWELL, D.; A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the micronucleus assay. Mutat. Res., V. 391, p. 87-89, 1997.

HUSSEIN. G., *et al.*; Inhibitory effects of sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) tease. Phytother Res Nov; v. 14, n. 7, p. 516, 2000.

HWANG, J.K.; CHOI, E.M.; Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. Journal of Ethnopharmacology, v. 89, p. 171-175, 2003.

IHRIG, M.; BLUME, H.; Zur Beurteilung von Phytopharmaka aus pharmazeutischer Sicht. Pharm. Ztg, v. 137, n. 36, p. 2715-2725, 1992.

JACOBSON, M.; CROSBY, D.G.; Naturally occurring insecticides. Journal JSTOR; The National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (Marcel Dekker), p. 144-226, 1971.

JANUARIO, A.H. *et al.* Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). Phytotherapy Research, v. 16, p. 445-448, 2002.

JENSEN, S., HANSEN, J.; BOLL, P.M.; Lignans and neolignans from Piperaceae (Review). Phytochemistry, v. 33, p. 523-530, 1993.

JENSEN, H.R., *et al.*; Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of *Piper nigrum*. J. Agric. Food Chem., v. 54, p. 1289-1295, 2006.

JHA, A.M., SINGH, A.C.; BHARTI, M.K.; Clastogenicity of carbazole in mouse bone marrow cells *in vivo*. Mutat. Res. V. 521, p. 11-17, 2002.

JOLY, L.G.; Feeding and trapping fish with *Piper auritum*. Econ Bot, v. 35, p. 383-390, 1981.

KLAUDE, M. , *et al*; The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutat. Res., v. 363, p. 89-96, 1996.

MACGREGOR, J.T., *et al.*; Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutat Res, v. 189, p. 103-112, 1987.

MADAN, A., *et al.* In vitro approaches for studying the inhibition of drug metabolizing enzymes and identifying the drug-metabolizing enzymes responsible for the metabolism of drugs. In: Rodrigues, A.D. (Ed.), Drug-drug interactions, 2002, p. 212–294.

MCCANN, J. *et al.* Detection of carcinogens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci., v.72, p. 5135-5139,1975.

*MEDICINAL HERB INDEX IN INDONESIA*. 2. ed.; Indonesia: Jakarta; 1995. p. 21.

MIYAMAE, Y., *et al.*; Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay: II. Relationship between DNA migration and alkaline conditions. Mutat. Res., v. 393, p. 107–113,1997.

MIYAMAE, Y., *et al.*; Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (Comet) assay: a collaborative study by five laboratories. Mutat. Res., v. 418, p. 131-140, 1998.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.; Quím. Nova, v. 24, p. 105, 2001.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE. J.; Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. Mutat Res., v. 345, p. 97-103,1995.

MORITA, T.; Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Group 1. 2A and 2B). The summary report of the 6<sup>th</sup> collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Mutat Res., v. 389, p. 3-122,1997.

NAKADATE, T. *et al.*; Effects of flavonoids and antioxidants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused epidermal ornithine decarboxylase induction and tumor promotion in relation to lipoxygenase inhibition by these compounds. Gann, v. 75, p. 214– 222, 1984.

NEBEL, A., *et al.* Potential metabolic interaction between St. John's wort and theophylline. Annals Pharmacotherapy, v. 33, p. 502, 1999.

OLIVE, P., BANATH, J.P.; Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. Exp.Cell Res. V. 221, p. 19-26, 1995.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J.; Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun, v. 123, p. 291–298, 1984.

OSTLING, O., *et al.*; Acta oncol, v. 26, p. 45, 1987.

PARMAR, V.S., *et al.*; Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry, V. 46, p. 597-673, 1997.

PATRICK, L.; Hepatitis C:epidemiology and review of complementary/alternative medicine treatments. Altern Med Rev Aug, v. 4, n. 4, p.220 – 238, ayg, 1999

PURCHASE, I. F., *et al.*; An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. Br. J. Cancer, v. 37, p. 873-959, 1978.

RAZIN, S. Molecular properties of mollicutes: a synopsis. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, edited by S. Razin & J. G. Tully. Tokyo: Academic Press, 1995. p. 1-25.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. & MARQUES, E. K.; Mutagênese Ambiental – Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 356p.

ROJAS, E., LOPEZ, M.C. & VALVERDE, M.; Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. Journal of Chromatography B, v. 22, p. 225-254, 1999.

RUDDER, E. A. Maury Chantal de; Guia compacto das plantas medicinais – São Paulo: Rideel, 2002, p. 01-02.

RYDBERG, B. & JOHANSON, K.J.; Estimation of single strand breaks in single mammalian cell, in: P.C. Hanawalt, E.C., friedberg, C.F. Fox \*Eds.), DNA Repair Mechanisms. New York: Academic Press, 1978. p. 465

SASAKI, Y.F., *et al.*; Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow). Mutat. Res., v. 391, p. 215 – 231,1997.

SASTROAMIDJOJO, S.; In *Obat Asli Indonesia*; TJOKRONEGORO, A., Ed.; Dian Rakyat: Indonesia,1997. p. 171

SCHMID, W.; The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Ed. A. Hollaender. New York: Plenum Press N.Y.,1976. V. 4, p. 31-53

SEKIHASHI, K.; Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. Mutat. Res., v. 517, p. 53-74, 2002.

SILVA, M. L. A., *et al.* Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigota forms of *Trypanosoma cruzi*. In:Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. France: Núcleo de Pesquisa em ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca. SP – Brasil, 2004.

SIMÕES, C. M. O. *et al.*; Farmacognosia: da planta ao medicamento; 2.ed.– Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.

SIMULA, A.P.; PRIESTLY, B.G.; Species differences in the genotoxicity of cyclophosphamide and styrene in three *in vivo* assays. Mutat. Res., v. 271, p. 49-58, 1992.

SINGH N. P., *et al.* A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res., v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E.; Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. Mutat Res., v. 383, p. 167-175, 1997

STRANDELL, J., NEIL, A.; CARLIN, G.; Phytomedicine , v. 11, p. 98-104, 2004.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J.; In: W.H. Freeman (Ed.), Biometry. San Francisco, p. 175 – 205; 404 – 486, 1995.

SPEIT, G.; HARTMANN, A.; The comet assay (single-cell gel test), in: HENDERSON, D.S. (Ed.). Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, Humana Press Inc., Totowa, NJ, V. 113, p. 203-212. 1999.

SUMATHYKUTTY, M. A. *et al.*; Essential oil constituents of some Piper species. Flavour and Fragrance Journal. V. 4, n. 5, p. 279-282, sept. oct. 1999.

SURH, Y. ; FERGUSON, L.R.; Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. Mutat. Res., p. 523-524:1-8, 2003.

TAYLOR, J.R.; WILT, V.M.; Probable antagonism of warfarin by green tea. Annals of Pharmacotherapy, v. 33, p. 426-428, 1999.

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

TICE, R.R., *et al.*; Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change, London: Plenum Press, p. 69, 1995.

USIA, T., *et al.* Metabolite-cytochrome P450 formation by methylenedioxyphenyl lignans of Piper cubeba: Mechanism-based inhibition. Science Direct, v. 76, p. 2381 – 2391, 2005a.

USIA, T., *et al.*; Potent CYP3A4 Inhibitory Constituents of *Piper cubeba*. J. Nat. Prod., v. 68, p. 64-68, 2005b.

VERPOORTE, R.; Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug Discovery Today, v. 3, p. 232-238, 1999.

VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D.M.; COFFEY, D.S.; Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. Cell, v. 22 p. 79-85, 1980.

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C. & CECHINEL FILHO, V. C.; Quym. Nova, v. 24, p. 147, 2001.

ZAMBRANO, M.A., TARGA, H.J.; RABELLO-GAY, M.N.; Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleous and metaphase slide preparations. Stain Technology, v. 57, p. 48-49, 1982.

WERMUTH, C.G. The Practice of Medicinal Chemistry. London: Academic Press, 1996.