

**Universidade Federal do Piauí**

**Citogenotoxicidade e efeito protetor da piperina e capsaicina em células meristemáticas de *Allium cepa* L.**

**Marcondes Soares Dias**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

**Teresina  
2019**



**Marcondes Soares Dias**  
**Licenciado em Ciências Biológicas**

**Citogenotoxicidade e efeito protetor da piperina e capsaicina em células meristemáticas de *Allium cepa* L.**

**Orientadora:**

Profa. Dra. Ana Paula Peron

**Coorientador:**

Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.**

**Teresina**  
**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

D541c Dias, Marcondes Soares.  
Citogenotoxicidade e efeito protetor da piperina e capsaicina em células meristemáticas de *Allium cepa* L. / Marcondes Soares Dias. -- 2019.  
55 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Teresina, 2019.  
“Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Peron”.  
“Coorientador: Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida”.

1. Genética bioquímica. 2. Alterações cromossômicas.  
3. Compostos bioativos. 4. Efeito modulador de danos ao DNA.  
I. Título.

CDD: 572.8

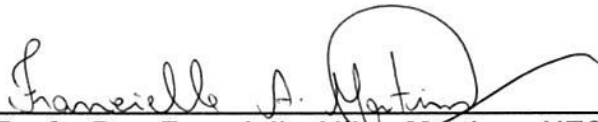
**"Citogenotoxicidade e efeito protetor da piperina e capsaicina células meristemáticas de *Allium cepa* L."**

**Marcondes Soares Dias**

**Licenciado em Ciências Biológicas**

**Aprovado em 23/08/2019**

**Comissão Julgadora:**



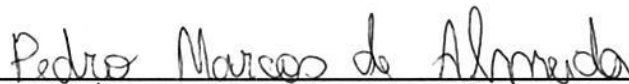
---

**Profa. Dra. Francielle Aline Martins - UESPI**



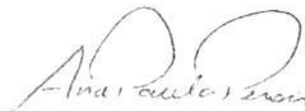
---

**Prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente - CCN/UFPI**



---

**Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida - UESPI**  
**Coorientador**



---

**Profa. Dra. Ana Paula Peron - UTFPR**  
**Orientadora**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai José Soares de Sousa, minha mãe Maria Zilda Alves Dias e aos meus irmãos.*

*À toda minha família e amigos que sempre acreditaram em mim, e sempre me davam conforto e mais força com suas palavras.*

*À minha companheira Edineia da Silva Araújo, em todos os momentos contribuindo para minha estabilidade nessa caminhada, suas palavras e até mesmo o seu ouvir me ajudaram muito.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Ana Paula Peron pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigado pela confiança e por me atender com paciência sempre que precisei.

Ao meu coorientador Pedro Marcos de Almeida, quem abraçou esse trabalho desde o início e me abriu muitas portas permitindo que o mesmo fosse realizado.

À banca de avaliação da dissertação que além de sua contribuição direta na dissertação, contribuíram também para o meu profissionalismo e também para o ser humano ainda mais pensante que me tornei, Profa. Francielle Aline Martins e Prof. Sérgio Emilio dos Santos Valente.

Agradeço a todos os professores das disciplinas que cursei e aos demais professores do programa pela dedicação para fazer com que a pós-graduação em genética e melhoramento alcance cada vez patamares mais altos. Ao secretário César Viana, que sempre foi prestativo e amigo em muitos momentos.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado cujo apoio e amizade foram de grande valia durante esse desafio que nos propomos encarar. Aos colegas Matheus Gonçalves e Gabriel Gonçalves estendo agradecimentos ainda mais afetuosos pela parceria dentro e fora do programa e pelas palavras positivas em vários momentos, e que me fazia perceber que tudo era mais simples do que eu pensava.

À turma do Laboratório Labgene (UESPI), principalmente a Bianca Cristina dos Santos Fernandes e Erasmo Pereira do Vale Júnior, que foram muito atenciosos e paciente, contribuindo muito com a realização dos experimentos. No Laboratório de Análises do Solo (LASO), sou grato ao Prof. Jadson Emanuel Lopes Antunes e à técnica do laboratório Louise Oliveira.

À agência de fomento CAPES pela bolsa de estudos durante boa parte do curso.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Importância Sócio-Econômica das Pimentas.....	12
2.2 Aspectos botânicos do gênero <i>Piper</i> .....	13
2.3 Aspectos botânicos do gênero <i>Capsicum</i> .....	14
2.4 As pimentas e suas atividades biológicas .....	15
2.4.1 Piperina o principal bioativo das pimentas <i>Piper</i> .....	16
2.4.2 Capsaicina principal bioativo das pimentas <i>Capsicum</i> .....	18
2.5 Sistema teste de alterações cromossômicas em <i>Allium cepa</i> .....	20
2.6 Metilmetanosulfonato (MMS) como agente indutor de danos ao DNA.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Compostos testados, período e local.....	23
3.2 Bioensaio <i>Allium cepa</i> .....	23
3.3 Análise dos dados.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1 Citotoxicidade e efeito modulador de danos celulares da piperina e capsaicina.....	26
4.2 Genotoxicidade da piperina e capsaicina.....	32
4.3 Antigenotoxicidade da piperina e capsaicina .....	36
5 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43



## RESUMO

DIAS, M. S. **Citogenotoxicidade e efeito protetor da piperina e capsaicina em células meristemáticas de *Allium cepa* L.** 55f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFPI, Teresina, 2019.

A piperina e a capsaicina são moléculas bioativas com atividades biológicas e farmacológicas, no entanto estudos quanto aos aspectos toxicogenéticos ainda são incipientes. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citogenotóxico e antígenotóxico da piperina e capsaicina nas células meristemas de *Allium cepa*. Raízes de *A. cepa* foram expostas ao controle negativo (CN) (Dimetilsulfóxido 2%) e ao positivo (MMS, Metilmetanosulfonato, 10 µg/mL). Nos tratamentos, as sementes de *A. cepa* germinadas foram expostas à piperina ou capsaicina nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µM para avaliar a citogenotoxicidade. O efeito protetor foi avaliado pela exposição aos isolados (piperina ou capsaicina) antes, simultaneamente ou após a exposição do MMS, representando os protocolos pré, simultâneo e pós, respectivamente. Para a confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N (10 min.) e coradas com Reativo de Schiff (2h). Cinco mil células meristemáticas foram analisadas em microscópio óptico (400x). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) “a posteriori” no programa BioEstat 5.3. A piperina e a capsaicina foram citotóxicas nas maiores concentrações (50, 100 e 200 µM), pois houve redução significativa do índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa* em relação ao CN, sendo dose dependente quando expostas à capsaicina. O efeito citoprotetor não foi observado nas células de *A. cepa* quando expostas à piperina ou à capsaicina, evidenciando que os compostos isolados não foram capazes de neutralizar a ação citotóxica do MMS. A piperina provocou aumento significativo na média total das alterações cromossômicas (efeito genotóxico) nas maiores concentrações (50 a 200 µM), destacando-se a presença significativa de micronúcleos e brotos nucleares. Para a capsaicina, o efeito genotóxico foi dose-dependente com aumento significativo para todas as concentrações testadas com a presença de micronúcleos, brotos nucleares e aderências cromossômicas significativas. Quanto ao efeito modulador de danos ao material genético, foi observado a redução significativa da média total das alterações cromossômicas de *A. cepa* quando expostas à piperina no pré (50 a 200 µM), simultâneo (todas as concentrações) e no pós-tratamento (todas as concentrações) em relação ao MMS. O efeito protetor também foi observado para a capsaicina, principalmente no pré (todas as concentrações) e no simultâneo (todas as concentrações), enquanto no pós-tratamento apenas a maior concentração (200 µM) reduziu as alterações cromossômicas. Além disso, a redução da maioria das alterações cromossômicas analisadas individualmente nas células de *A. cepa* reforçam o efeito protetor exercido pelas duas moléculas. Portanto, o presente estudo evidenciou a importante atividade quimiopreventiva da piperina e capsaicina, que estão indiretamente relacionadas com a prevenção e/ou tratamento de doenças genéticas como o câncer, sendo complementar aos poucos estudos toxicogenéticos que foram realizados para investigar seus efeitos no DNA.

**Palavras-chave:** Alterações cromossômicas. Compostos bioativos. Efeito modulador de danos ao DNA. Índice mitótico. Toxicogenética.

## ABSTRACT

DIAS, M. S. **Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin in meristematic cells of *Allium cepa* L.** 55f. Dissertation (Master in Genetics and Breeding), UFPI, Teresina, 2019.

Piperine and capsaicin are bioactive molecules with biological and pharmacological activities, however studies on toxicogenetic aspects are still incipient. Thus, the present work aimed to evaluate the cytogenotoxic and antigenotoxic effect of piperine and capsaicin on *Allium cepa* meristematic cells. *A. cepa* roots were exposed to negative (CN) (Dimethylsulfoxide 2%) and positive (MMS, Methylmethanesulfonate, 10 µg / mL) control. In the treatments, germinated *A. cepa* seeds were exposed to piperine or capsaicin at concentrations of 25, 50, 100 and 200 µM to evaluate cytogenotoxicity. The protective effect was evaluated by exposure to the isolates (piperine or capsaicin) before, simultaneously or after MMS exposure, representing the pre, simultaneous and post protocols, respectively. To make the slides, the roots were hydrolyzed in 1N HCl (10 min) and stained with Schiff Reactive (2h). Five thousand meristematic cells were analyzed under optical microscope (400x). Data were analyzed by Kruskal-Wallis test and Student-Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ) "a posteriori" in the BioEstat 5.3 program. Piperine and capsaicin were cytotoxic at the highest concentrations (50, 100 and 200 µM), as there was a significant reduction in the mitotic index of *A. cepa* meristematic cells in relation to CN, being dose dependent when exposed to capsaicin. The cytoprotective effect was not observed in *A. cepa* cells when exposed to piperine or capsaicin, showing that the isolated compounds were not able to neutralize the cytotoxic action of MMS. Piperine caused a significant increase in the total average of chromosomal alterations (genotoxic effect) at higher concentrations (50 to 200 µM), highlighting the significant presence of micronuclei and nuclear sprouts. For capsaicin, the genotoxic effect was dose dependent with significant increase for all concentrations tested with the presence of micronuclei, nuclear shoots and significant chromosomal adhesions. Regarding the modulating effect of damage to genetic material, a significant reduction in the total average of *A. cepa* chromosomal alterations was observed when exposed to piperine before (50 to 200 µM), simultaneously (all concentrations) and post-treatment (all concentrations) in relation to MMS. The protective effect was also observed for capsaicin, mainly pre (all concentrations) and simultaneously (all concentrations), while post-treatment only the highest concentration (200 µM) reduced chromosomal changes. Moreover, the reduction of most chromosomal alterations individually analyzed in *A. cepa* cells reinforces the protective effect exerted by the two molecules. Therefore, the present study showed the important chemopreventive activity of piperine and capsaicin, which are indirectly related to the prevention and / or treatment of genetic diseases such as cancer, being complementary to the few toxicogenetic studies that were conducted to investigate their effects on DNA.

**Key words:** Chromosomal changes. Bioactive compounds. Modulating effect of DNA damage. Mitotic index. Toxicogenetics.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – (A) Videira de escalada de *P. nigrum*; (B) espigas verdes de *P. nigrum*; (C) frutos pretos, brancos e verdes *P. nigrum* (D) pimenta processada (AHMAD et al., 2012).....13
- Figura 2 - Variação da morfologia de plantas e frutos no gênero *Capsicum*. Acessos de *Capsicum annuum* (A-M). Barra de escala, 10 cm (NAVES, et al., 2019).....15
- Figura 3 - Estrutura da Piperina (CID:638024), disponível em PubChem.....16
- Figura 4 - Estrutura da Capsaicina (CID:154894), disponível em PubChem.....18
- Figura 5 - Alterações cromossômicas e nucleares observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. A: interfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D: anáfase normal; E: telófase normal; F: micronúcleo (seta); G: interfase com broto nuclear; H: quebras cromossômicas (seta); I: aderência cromossômica; J: C-metáfase; K: perda cromossômica (seta); L: ponte cromossômica (seta) e quebra cromossômica (cabeça de seta); M: anáfase multipolar; N: célula binucleada; O: alterações nucleares; P: célula sob processo de morte (núcleo heteropicnótico e deslocado para a periferia celular; vacuolização e polimerização do citoplasma). Barra: 10µm (para todas as imagens).....35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito citotóxico da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em diferentes concentrações.....	27
Tabela 2 - Efeito citoprotetor da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em diferentes concentrações.....	30
Tabela 3 - Efeito genotóxico da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em diferentes concentrações.....	32
Tabela 4 - Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após exposição a piperina e capsaicina em diferentes concentrações.....	35
Tabela 5 - Efeito antígenotóxico da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em diferentes concentrações. ....	37
Tabela 6 - Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após exposição a piperina ou capsaicina para avaliar a antigenotoxicidade em diferentes concentrações. ....	40

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de especiarias como aditivos para melhorar o sabor e aroma dos alimentos é praticado mundialmente e está ligado histórico/culturalmente com muitos povos (PLATEL; SRINIVASAN). Sendo moeda valiosa de troca praticada em transações comerciais por séculos e ainda hoje é um setor importante da economia (GHODKI; GOSWAMI, 2016; MELO; ALVES, 2019).

Dentre as especiarias, as pimentas são consideradas os membros mais importante, utilizados como temperos, conservantes, ou mesmo na medicina tradicional, principalmente nos países latino-americanos que são o centro de origem do gênero *Capsicum*, e no sudeste asiático centro de origem do gênero *Piper* (PERRY et al., 2007; SINGLETARY, 2010).

Estudos documentaram os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e imunomoduladores das especiarias, com bioatividade atribuída principalmente aos seus metabólitos secundários (BAE et al., 2012; SILVA et al. 2018; SRICHAROEN et al., 2017). Os compostos oriundos do metabolismo das plantas têm efeito quimiopreventivo e quimioterápico (KOLEVA et al., 2012; MUHAMMAD et al., 2018). A busca por fitoquímicos que tenham capacidade de modular efeitos de agentes mutagênicos e carcinogênicos é constante e teve resultados satisfatórios para uma gama de compostos: polifenóis, carotenoides, alcaloides, taninos, etc. (LI et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018; SÁ et al., 2019).

Os estudos que utilizam basicamente extratos naturais (extratos aquosos, alcoólico, etc.) de espécies dos gêneros *Piper* e *Capsicum* para análises de estudos de genotoxicidade e antígenotoxicidade são em maior número, no entanto, trabalhos que avaliam compostos isoladamente são cada vez mais frequentes, dado o aprimoramento nos métodos de extração desses compostos e ao acesso a essas substâncias comercialmente (BLEY et al., 2012; QIAN et al., 2016; RATHER; BHAGAT; 2018).

A piperina e a capsaicina são alcaloides com efeito antioxidante, antiparasitário e imunomodulador (SOUTAR et al., 2015; VURMAZ et al., 2019). Existem estudos quanto ao efeito antiproliferativo, genotóxico/antigenotóxico e antiapoptótico/pró-apoptótico sobre diversos cânceres, porém estes trabalhos possuem limitações

consideráveis ou mesmo resultados conflitantes, tanto para piperina quanto para a capsaicina (FATTORI et al., 2016; SINGH et al., 2009).

Embora existam estudos sobre as propriedades antioxidantes/pró-oxidante e mutagênica/antimutagênica dos bioativos piperina e capsaicina, estudos que mostram seus efeitos diretamente no DNA utilizando as alterações cromossômicas como biomarcadores citogenéticos são incipientes. Também não há relatos sobre os efeitos biológicos da piperina e da capsaicina puras sobre sistema teste vegetal.

O sistema teste de alterações cromossômicas em *Allium cepa* L. é amplamente citado na literatura como bioindicador ideal de avaliação de citogenotoxicidade de compostos químicos, pois possui rápida multiplicação celular e apresenta ainda cromossomos grandes e em número reduzido, o que permite melhor análise de alterações estruturais e numéricas (BONCIU et al., 2018; LEME; MARIN-MORALES, 2009; MAURO et al., 2014). Além disso, apresenta boa correlação com ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* ou *in vivo* (EREN et al., 2014; ROCHA et al., 2016; SÁ et al., 2019).

Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar diferentes concentrações de piperina e capsaicina, para potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, além do potencial antígenotóxico frente aos danos causados pelo Metilmetanossulfonato (MMS), usando método citogenético de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância Sócio-Econômica das Pimentas

As pimentas são especiarias que desde tempos longínquos acrescentaram riquezas às culturas alimentares e farmacêuticas dos mais variados povos (BRACHT et al., 2011). Por séculos foram até mesmo moeda valiosa de troca praticada em transações comerciais e ainda hoje movimentam setores importante da economia (GHODKI; GOSWAMI, 2016; MELO; ALVES, 2019).

Na indústria, são utilizados como matéria-prima para várias aplicações alimentares, na forma de pó, ou líquida (leorresinas e óleo essencial), podem ser usadas como agente aromatizante ou de sabor, incorporado nas misturas de pó de especiaria seca (curry em pó), misturas de bebidas e pratos (cozidos ou não cozidos) (GHODKI; GOSWAMI, 2016; GIUFFRIDA et al., 2013). As pimentas, juntamente com o sal, representam os condimentos mais consumidos pelos seres humanos (FATTORI et al., 2016). Além disso, o consumo destas especiarias é um traço cultural, muito comum em países do sudeste asiático, e relativamente menor no restante do mundo, ainda assim sendo muito frequente (SINGLETERY, 2010).

O valor dos frutos das pimenteiras foi atribuído principalmente a característica pungente (picante/quente) encontrada nestes, dessa forma explorou-se o gradiente de pungência que existe entre as pimentas e foram domesticadas diversas espécies, que são cultivadas em várias regiões do mundo como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e pimenta longa (*P. longum* L.), e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.), dedo-de-moça (*C. baccatum* L.) e pimentão (*C. annuum* L.) (JEONG et al., 2010; SALAZAR et al., 2016). Compostos alcaloides presentes nessas espécies, a piperina e capsaicina são os principais responsáveis pela pungência nos frutos de *Piper sp.* e *Capsicum*, respectivamente (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013; ZHENG et al., 2016).

As pimentas têm um grande potencial para o melhoramento devido a características como: altos teores de vitaminas A e C; teor de pungência; matérias-primas para indústria farmacêutica; plantas ornamentais (RÊGO et al., 2011). Neste cenário, o Brasil figura como um dos principais centros para a coleta de germoplasma de *Capsicum*, dentre os países da América Latina (LIMA et al., 2019; MOREIRA et al., 2018). É importante também pela grande diversidade que apresenta o gênero *Piper*,

distribuído por todo o país, com recursos genéticos fundamentais principalmente na região amazônica (BFG, 2015).

## 2.2 Aspectos botânicos do gênero *Piper*

O termo pimenta compreende alguns grupos de plantas de *Piper* e *Capsicum*, das famílias Piperaceae e Solanaceae, respectivamente (BONTEMPO, 2007; JEONG et al., 2010; SALAZAR et al., 2016). Uma visão sobre a posição filogenética da família Piperaceae está entre um conjunto diversificado de dicotiledôneas que se assemelham a monocotiledôneas em certas características vegetativas (JARAMILLO; MANOS, 2001).

O gênero *Piper* é um dos maiores dentre as angiospermas, possui cerca de 2.000 espécies e distribuição pantropical, com expressivos centros de diversidade na região Neotropical (MELO; ALVES, 2019). São plantas perenes, tomam a forma de arbustos, ervas e cipós, comuns em florestas úmidas de terras com baixas altitudes (JARAMILLO; MANOS, 2001). Este grupo de plantas é amplamente distribuído no Brasil e apresenta um grande número de espécies, sendo o quinto gênero mais diverso no país, com 291 espécies (BFG, 2015).

As espécies de *Piper* são cultivadas principalmente pelo potencial de seus frutos e folhas, ricos em fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, esteroides, flavonoides, que os tornam comuns na medicina tradicional, além disso têm um aspecto pungente que coloca estas plantas dentre as principais especiarias exploradas em todo mundo (MGBEAHURUIKE, et al., 2017).

A pimenta-do-reino (*P. nigrum*) é o principal representante do gênero, são plantas trepadeiras (Figura 1), arbustífera perene, são autógamas com pequena porcentagem de polinização cruzada, apresentam propagação vegetativa, apesar de suas sementes serem férteis (AHMAD et al., 2012; MENEZES, et al., 2009).

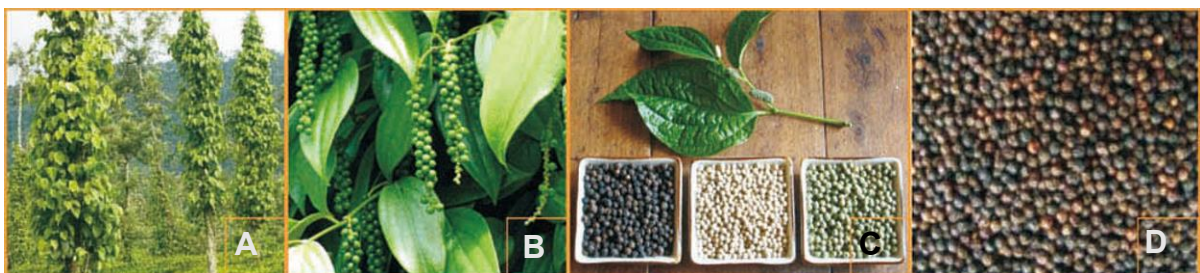


Figura 1. (A) Videira de escalada de *P. nigrum*; (B) espigas verdes de *P. nigrum*; (C) frutos pretos, brancos e verdes *P. nigrum* (D) pimenta processada (AHMAD et al., 2012).



As folhas da pimenta-do-reino são verdes, brilhantes, ovais e com cerca de 20 cm de comprimento com espigas contendo as sementes em caules opostos às folhas (ABDULAZEEZ et al. 2016).

### **2.3 Aspecto botânicos do gênero *Capsicum***

O gênero *Capsicum* possui 38 espécies descritas, classificadas em domesticadas, semidomesticadas e silvestres, com as principais culturas sendo pimenta malagueta (*C. frutescens* L.), dedo-de-moça (*C. baccatum* L.) e pimentão (*C. annuum* L.), cultivadas em todo mundo (SALAZAR et al., 2016; SWEAT et al., 2016). São nativas das Américas e cultivadas para serem utilizadas como parte da dieta local desde 7500 A.C. (PERRY et al., 2007). A popularidade das pimentas *Capsicum* se deu por esta mostrar uma ampla combinação de características, como cor, sabor e pungência (SRICHAROEN et al., 2017).

As plantas *Capsicum*, em geral, são autógamas, embora a polinização cruzada também ocorra entre indivíduos dentro da mesma espécie e entre espécies do gênero (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008). Na natureza os pássaros são o principal meio de dispersão das sementes, ao se alimentarem dos frutos promovem a disseminação por meio das fezes, e ainda se acredita que a passagem pelo sistema digestivo das aves melhore a germinação de sementes, notadamente daquelas com dormência (TEWKSBURY et al., 2006).

As plantas de *Capsicum* variam e alguns aspectos vegetativos, mas principalmente quanto a cores e forma de seus frutos, bem evidente em variedades ornamentais de *C. annuum* (Figura 2). Duas espécies que são endêmicas do Brasil, *C. baccatum*, conhecida popularmente pelo nome de cumari, produz os menores frutos do gênero, arredondados, ovalados ou elipsoides, enquanto variedades *C. chinense* de formato arredondado, com um centímetro de diâmetro, em média (NAVES et al., 2019; SANTOS et al., 2013).



Figura 2 - Variação da morfologia de plantas e frutos no gênero *Capsicum*. Acessos de *Capsicum annuum* (A-M). Barra de escala, 10 cm (NAVES, et al., 2019).

#### 2.4 As pimentas e suas atividades biológicas

As pimentas são tidas como alimentos funcionais, que são aqueles que fazem parte de um grupo de elite dos nutrientes (ANTONIO, et al., 2018; RATHER; BHAGAT, 2018). São assim classificados pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no Brasil como alimentos que, além de possuir nutrientes, contêm também componentes de ação protetora, medicinal, terapêutica e curativa especial (BONTEMPO, 2007).

Em dietas que buscam potenciais quimiopreventivos e/ou fitoquímicos quimioterápicos, se incluem algumas espécies de pimentas, que contêm muitos metabólitos biologicamente ativos (LUO et al., 2011; OKWUTE; EGHAREVBA, 2013).

Metabólitos secundários de plantas como: alcaloides, fenois, taninos, terpenoides e outros, têm sido utilizados para a preparação de medicamentos ou como precursores de modificações estruturais e funcionais na célula, onde sua atuação pode ser por interação direta com as membranas ou com receptores nucleares, além disso, apresentam a capacidade de modular a atividade das principais

enzimas envolvidas na sinalização celular e nas respostas antioxidantes (LEE et al., 2011; VIRGILI; MARINO, 2008).

No entanto há uma preocupação quanto a alguns riscos. Dessa forma agências reguladoras adotaram ações apropriadas para a maioria dos alcaloides, e estabeleceram limites para a presença de alguns compostos em rações, alimentos e bebidas, tentando definir limites superiores seguras (KOLEVA et al., 2012).

#### 2.4.1 Piperina o principal bioativo das pimentas *Piper*

A piperina (1-piperilpiperidina) (Figura 3) é um composto alcaloide isolado principalmente de *P. nigrum*, conhecida como pimenta-do-reino ou pimenta preta, mas também pode ser encontrada em outros representantes da família Piperaceae (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013).

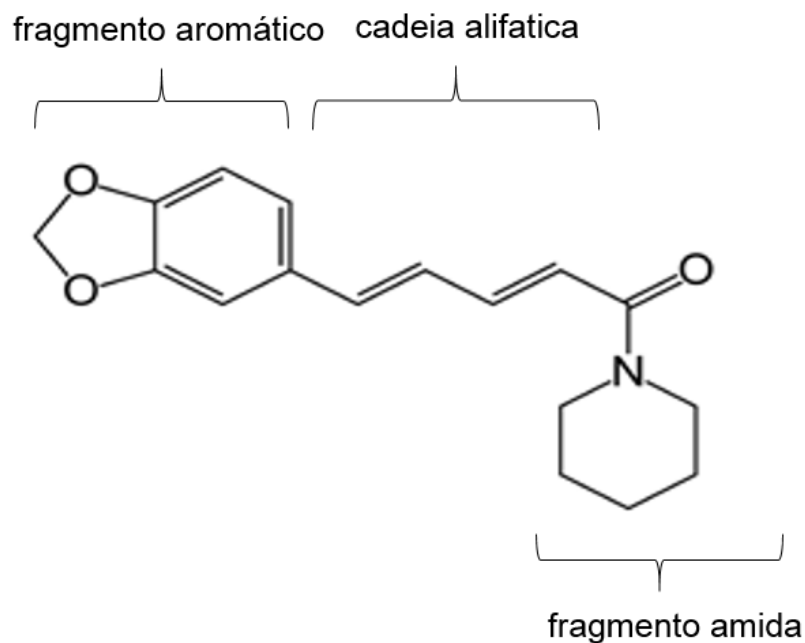


Figura 3 - Estrutura da piperina (CID:638024), disponível em PubChem

Esta molécula trata-se de um metabólito secundário e é o principal responsável pela pungência dos frutos de *P. nigrum*, constituindo cerca de 98% do total de alcaloides presentes, e, assim, o conteúdo de piperina pode ser tomado como uma medida de pungência total destas pimentas (CHOPRA et al., 2017). Esta característica pungente fez deste vegetal uma das principais especiarias apreciadas em todo mundo (GORGANI et al., 2017). O conteúdo de piperina é cerca de 7% do peso seco do fruto pimenta-do-reino (OKWUTE; EGHAREVBA, 2013).

O alcaloide piperina é distribuído em toda a estrutura do fruto e a sua extração é realizada através solventes orgânicos voláteis (éter, benzeno, acetona, dicloroetano ou acetato de etilo), por causa da hidrofobicidade devido ao seu caráter lipofílico (GORGANI et al., 2017).

As características estruturais, um anel aromático com uma ponte de metilenodioxí, um sistema de dienona conjugado e um anel de piperidina que constitui uma ligação amida, são considerados importantes para a molécula apresentar um conjunto de bioatividades (SINGH; CHOUDHARY, 2015; QU et al., 2015), que mostram efeitos fundamentais sobre outras moléculas como glicoproteínas e muitos sistemas enzimáticos, levando a efeitos biotransformativos. Desta forma, aplicações terapêuticas e medicinais são relatadas, como por exemplo: quimioprevenção (GREENSHIELDS et al., 2015; LI et al., 2018), detoxificação (NASEEMA et al., 2018; VURMAZ et al., 2019), e a melhoria da absorção e biodisponibilidade de medicamentos convencionais e à base de plantas (DI et al., 2015; WANG et al., 2019).

A piperina teve seu potencial citotóxico testado para diversas culturas celulares de linhagem tumoral, afim de avaliar seus efeitos na angiogênese de cânceres de próstata, mama, retal e melanomas dentre outros, onde atuou muitas vezes seletivamente nestas células com efeitos antiproliferativo através da parada do ciclo celular ou mesmo induzindo apoptose (FOFARIA et al., 2014; LAI et al., 2012; OUYANG et al., 2013; YAFFE et al., 2013).

Os efeitos genotóxicos da piperina foram testadas em culturas de células (*in vitro*) e em camundongos, e apresentou basicamente baixa genotoxicidade nesses sistemas (BALAKRISHNAN et al., 2008; THIEL et al., 2014). Visto que a piperina apresenta interação com muitas drogas, avaliou-se seu potencial antigenotóxico principalmente sobre modelos de camundongos para diversos agentes mutagênicos como benzo(a)pireno, ciclofosfamida, aflatoxinas, doxorubicina, com resultados satisfatórios para a maioria dos ensaios (CARDOSO et al., 2016; SINGH; DUGGAL, 2009; WONGPA et al., 2007).

Levantamento dos principais mecanismos quimiopreventivos de ação da piperina incluem ativação de cascatas de sinalização apoptótica, inibição da proliferação celular, parada do ciclo celular, modulação do estresse de radicais livres e autofagia, inibição da angiogênese, indução de enzimas de desintoxicação e

sensibilização de tumores a radioterapia e quimioterapia (MANAYI et al., 2017; RATHER; BHAGAT, 2018).

Os efeitos da piperina podem se estender bastante quando é utilizada como precursors de moléculas sintéticas, chamadas de análogos, com variações no número de insaturações, no padrão de substituição no anel aromático e no grupo amídico (MARQUES et al., 2010; SINGH; CHOUDHARY, 2015). A ancoragem molecular (produzida principalmente por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals) que ocorre entre a piperina e outros bioativos como a curcumina ou com fármacos e até mesmo moléculas pertencentes a célula como a survivina e albumina, podem interferir na função que estes executam nas células (PATIL et al., 2016; SATTARINEZHAD et al., 2015; YEGGONI et al., 2015).

#### 2.4.2 Capsaicina principal bioativo das pimentas *Capsicum*

A capsaicina (8-Metil-N-Vanilil-6-Nonenamida) (Figura 4) é um composto alcaloide/amida encontrado nos frutos de plantas do gênero *Capsicum* (família Solanaceae), sua quantidade pode representar até 1% da massa das pimentas (FATTORI et al., 2016).

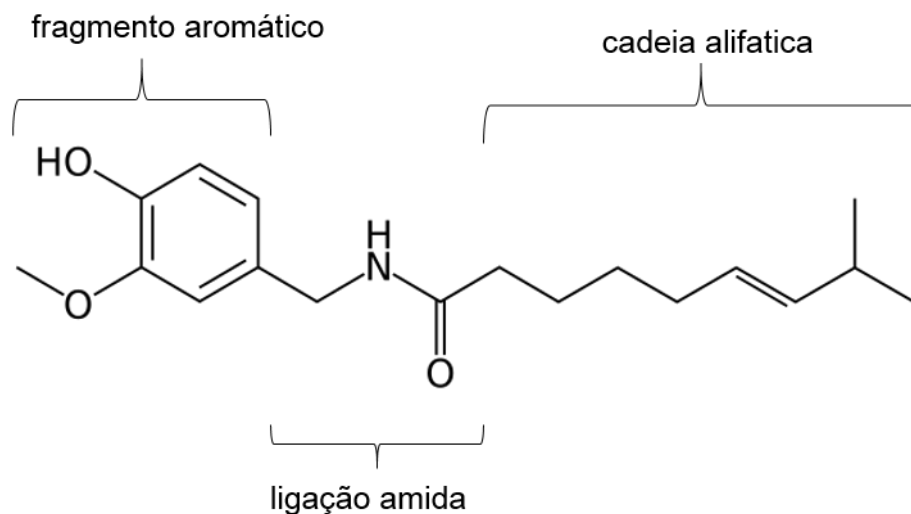


Figura 4 - Estrutura da capsaicina (CID:154894), disponível em PubChem.

A capsaicina representa cerca de 70% dos capsaicinoides responsáveis pela pungência das pimentas (ZHANG et al., 2016), isso faz dela principal composto para pungência das pimentas *Capsicum*, e sua quantificação pode ser utilizada com parâmetro para medir se a pimenta é mais ou menos picante (SRICHAROEN et al., 2017).

A anatomia do fruto de pimenta consiste principalmente do pericarpo que inclui o exocarpo (pele), mesocarpo e endocarpo e sementes que são fixadas à placenta (SANDOVAL-CASTRO et al., 2017). Os capsaicinoides são sintetizados e acumulados no tecido epidérmico da placenta durante o desenvolvimento do fruto (cerca de 60%), mas também são encontrados em outras partes do fruto, como o pericarpo e a semente, cerca de 30% (ANANTHAN; SUBHASH; LONGVAH, 2018).

Principalmente os frutos são utilizados para a extração da capsaicina, que por essa ter caráter lipofílico necessita de alguns solvente orgânicos voláteis como álcool, éter, benzeno, acetona e alguns óleos vegetais (BARBERO et al., 2016; CHANTHAI et al., 2012; LU et al., 2017). Vários trabalhos descrevem em detalhe as variações modulares da estrutura da capsaicina que foi convenientemente decomposta em três partes: a região aromática, a região da ligação amida, e a cadeia alifática hidrofóbica, possibilitando que os perfis de estrutura de atividade fossem investigados isoladamente (CHO et al., 2017; HUANG et al. 2013; REYES-ESCOGIDO et al., 2011).

Em relação à estrutura-atividade da capsaicina se tem um panorama relacionado as regiões da molécula: região aromática, responsável pela maior parte da atividade antioxidante; região da ligação amida, responsável pelo efeito de analgesia e atividade antinociceptiva; a cadeia alifática, relacionada à atividade analgésica, mas tem papel crucial na polaridade total da molécula, dando a esta caráter hidrofóbico (HUANG et al., 2013). A estrutura da capsaicina pode ainda servir para produção de análogos sintéticos, além de tanto capsaicina quanto seus análogos poderem ser sintetizados industrialmente usando ácidos graxos clorados e aminas em temperaturas entre 140 e 170 ° C sob pressão moderada (ASNIN; PARK, 2015; CHANDA et al., 2004; REYES-ESCOGIDO et al., 2011).

Além do consumo na culinária, frutos de *Capsicum* também têm papel significativo nas aplicações farmacêuticas devido à bioatividade reconhecida dos seus fitoquímicos, onde destaca-se o bioativo capsaicina, com aplicação antioxidante verificada sobre sistemas enzimáticos e/ou celulares (CHO et al., 2017; HASSAN et al., 2012;), interação e aumento da biodisponibilidade de outros compostos (PATOWARY et al., 2017; WANG et al., 2017) e também o potencial anti-inflamatório (GHIASI et al., 2019; PERSSON et al., 2018).

É frequente o emprego da capsaicina em diversos estudos para avaliação do seu potencial citotóxico, genotóxico e antígenotóxico em ensaios *in vitro* e também *in*

*vivo*, com testes em diferentes concentrações e tempos de exposição (BROWN et al., 2010; LEWINSKA et al., 2015; QIAN et al., 2016). Os resultados por vezes são conflitantes sobre seus efeitos genotóxicos e antigenotóxicos, tanto em linhagens celulares, assim como para teste *in vivo*. Os organismos teste são principalmente camundongos, mas também são relatados trabalhos com microorganismo (PROUDLOCK et al., 2004; TOYODA-HOKAIWADO et al., 2011), e invertebrados (FERNÁNDEZ-BEDMAR; ALONSO-MORAGA, 2016; KHANAM et al., 2017).

Os efeitos causados pela capsaicina são principalmente a diminuição da atividade metabólica e proliferação celular, e as alterações no ciclo celular. Estes efeitos são dependentes das concentrações utilizadas e ao tempo de exposição (BLEY et al., 2012). Algumas interações da capsaicina sobre o material genético diretamente, foram mostrados com ensaios micronúcleo e alterações cromossômicas em células de camundongos e houveram resultados positivos tanto para efeitos genotóxicos quanto antigenotóxicos (CAETANO et al., 2018; MARQUES et al., 2002).

## **2.5 Sistema teste de alterações cromossômicas em *Allium cepa***

O tecido meristemático de raízes de *A. cepa* possui características que o torna uma ferramenta teste eficiente para o *screnning* preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade de compostos químicos (BIANCHI et al., 2016; HERRERO et al., 2012; SILVA et al., 2015). Este sistema testa a genotoxicidade usando cromossomos. Desta forma, lida com mutações genômicas que causam alterações morfológicas nos cromossomos (BONCIU et al., 2018). A eficiência desse bioensaio se dá principalmente em razão de *A. cepa* apresentar número cromossômico reduzido ( $2n=16$ ), o que permite a detecção de distúrbios no índice de proliferação celular e alterações cromossômicas e celulares (FISKESJO, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O ensaio de alterações cromossômicas em *A. cepa* já testou as mais variadas substâncias orgânicas, como por exemplo substâncias provenientes de plantas com potencial farmacêutico e quimiopreventivo. Das plantas estudadas são produzidos extratos, óleos essenciais, e outros derivados, ou mesmo extraídos compostos isolados, para avaliação de efeitos genotóxicos, antigenotóxicos ou ambos (DIAS et al., 2019; LIMAN et al., 2018; PRAJITHA; THOPPIL, 2016). Além disso, plantas condimentares e aditivos alimentares e seus principais compostos são rotineiramente

submetidos a esse teste para avaliar seu potencial genotóxico/antigenotóxico (PANDEY et al., 2014; SHARMA et al., 2011; SILVA et al., 2018). Este protocolo também tem ampla utilização na área da toxicologia ambiental, com diversos trabalhos aplicados em ambientes poluídos (ar, solo ou água), contaminados por metais pesados, rejeitos industriais e outras ações antrópicas (DUTTA et al., 2018; PALMIERI et al., 2016; RAGAZZO et al., 2017).

Uma extensa variedade de defensivos agrícolas como herbicidas, pesticidas e demais químicos foram submetidos a protocolos de genotoxicidade em *A. cepa*, sendo reportados resultados positivos, o que chamou a atenção para a utilização destes agroquímicos e seu impacto no meio ambiente (DATTA et al., 2018; FELISBINO et al., 2018; KARASMAILIOGLU, 2017).

O sistema *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), apresentado como instrumento eficiente para o monitoramento *in vivo* da genotoxicidade de substâncias químicas (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999). Este sistema teste apresenta baixo custo, confiabilidade e equivalência com os mais conceituados testes de citogenotoxicidade, sem as preocupações éticas que afetam o uso de animais em testes e que exigem diretrizes de reprodução complexas (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

Por ser uma ótima ferramenta para investigação de danos causados ao material genético, pode ser submetido a estresses com substâncias conhecidamente danosas ao DNA, como compostos clastogênicos e/ou aneugênicos (FERNANDES et al., 2009; VENTURA-CAMARGO et al., 2011). A ação clastogênica é confirmada pela presença de micronúcleos derivados da quebra cromossômica durante a divisão celular (MAZZEO et al. 2011). Por outro lado, a ação aneugênica é uma consequência da inativação das fibras do fuso mitótico, que leva a perdas de cromossomos inteiros, deixando estes de fazer parte do núcleo celular principal (FERNANDES et al., 2007).

Pode-se ainda ser verificado se outras substâncias podem apresentar alguma atividade moduladora danos induzidos ao material genético das células de *A. cepa* (FELICIDADE et al., 2014; MAURO et al., 2014). Desta forma, este bioensaio pode utilizado também em estudos para avaliação de antigenotoxicidade.



## 2.6 Metilmetanosulfonato (MMS) como agente indutor de danos ao DNA

O Metilmetanosulfonato (MMS) é um agente alquilante monofuncional, induz diferentes tipos de adutos no DNA por reação com seus centros nucleofílicos, como os átomos de oxigênio e nitrogênio das bases (WYATT; PITTMAN et al., 2006). Cada tipo de aduto pode, em princípio, contribuir para os efeitos biológicos do agente alquilante pelo qual é induzido, mas alguns adutos desempenham um papel mais dominante na citotoxicidade, enquanto outros são mais mutagênicos ( CHATTERJEE; WALKER, 2017; VELD et al., 1998).

Como controle positivo em ensaios com *A. cepa*, de modo geral, o MMS induz diversos danos ao material genético incluindo: quebras cromossômicas, formação de micronúcleo, ponte cromossômica, aderência cromossômica, dentre outros, resultando no aumento da frequência de alterações cromossômicas (ALMEIDA et al., 2015; ANACLETO et al., 2017; LIMAN et al., 2019). A frequência dessas alterações serve como parâmetro e são comparadas aos tratamentos no experimento, portanto, o MMS representa um ótimo agente para controle positivo em ensaios de genotoxicidade/mutagenicidade em culturas de células e organismos teste (ALARABY et al., 2015; BIANCHI et al., 2016; FAGUNDES et al., 2017; ROBERTO et al., 2016).

O emprego do MMS torna-se mais aplicável nesses testes por apresentar alta genotoxicidade em pequenas concentrações, contudo baixa citotoxicidade, permitindo que as células continuem no ciclo celular e as alterações provocadas possam ser vista em diferentes fases da divisão celular (BIANCHI et al., 2015; RANK; NIELSEN, 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Compostos testados, período e local

A piperina  $\geq 97\%$  CAS (94-62-2) e a capsaicina  $\geq 95\%$  CAS (404-86-4) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes utilizados (solvente, corantes, fixadores, etc.) são todos de grau analítico. Sementes de cebola (cv. Vale Ouro IPA-11) foram utilizadas nos protocolos propostos.

A etapas laboratoriais desse estudo ocorreram de julho a dezembro de 2018, e foram realizadas no Laboratório de Genética (LABGENE) do Centro de Ciências da Natureza (CCN) da UESPI e no Laboratório de Análises do Solo (LASO) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) UFPI, Teresina-PI.

#### 3.2 Bioensaio *Allium cepa*

Cem sementes de *A. cepa* por placas de Petri foram germinadas com água destilada em incubadora (BOD SL - 224®) com fotoperíodo de 12h e temperatura de 25° C por dois dias. Após a germinação, as sementes com raízes entre (1-2 cm) foram submetidas a diferentes tratamentos para avaliar a citogenotoxicidade e antigenotoxicidade dos bioativos piperina e capsaicina segundo Rocha et al. (2016) e Mauro et al. (2014), com modificações.

No ensaio de genotoxicidade, as sementes foram transferidas para o controle negativo (CN) (Dimetilsulfóxido - DMSO a 2% em água destilada), controle do solvente (CS) (água destilada), controle positivo MMS I (Metilmetanosulfonato 10 µg/mL dissolvido em DMSO a 2%) e MMS II (dissolvido apenas em água destilada). Foram colocados também nos tratamentos com os isolados piperina ou capsaicina, em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 µM), valores iguais à alíquotas de fármacos e comuns em ensaios de quimioterápicos (GREENSHIELDS, et al., 2015; LEWISKA et al., 2015; SIDDIQUI et al. 2017), dissolvidas em DMSO a 2%, uma placa por concentração com 30 sementes em cada um e exposição de 48h.

Já a avaliação da antigenotoxicidade (efeito protetor) foi realizada pela exposição do extrato vegetal antes, simultaneamente ou após a exposição do MMS, representando os tratamentos pré, simultâneo e pós, respectivamente (ROCHA et al., 2016). O pré-tratamento avalia ação desmutagênica, o simultâneo avalia a atividade desmutagênica e bioantimutagênica e o pós indica ação bioantimutagênica (FEDELMIYASATO et al., 2014; FELICIDADE et al., 2014).

Para avaliar o efeito protetor, os tratamentos e protocolos foram realizados de acordo com Mauro et al. (2014), porém com algumas modificações. No pré-tratamento, as sementes foram expostas às soluções com piperina ou capsaicina por 24h e por mais 24h no MMS. No tratamento simultâneo, as sementes foram germinadas em água destilada durante 24h e depois em piperina ou capsaicina e MMS, adicionados simultaneamente, por mais 24h. No pós-tratamento, as sementes foram germinadas em MMS durante 24h e por 24h adicionais nos tratamentos com piperina ou capsaicina nas concentrações supracitadas.

Após os tratamentos realizados, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 etanol:1 ácido acético) por 6-8h e estocadas a -20°C até o momento de preparo da lâminas. Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada por 5 min cada e hidrolisadas a 60 °C por 10 min em HCl 1N. Depois da hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff, onde permaneceram em local escuro, por 2h. As raízes foram então lavadas, até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas, onde foram esmagadas em uma gota de carmim acético a 2% e montadas com Entellan® (Almeida et al., 2016).

A citotoxicidade, genotoxicidade e antígenotoxicidade foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas por tratamento (500 células/ lâminas, com um total de 10 lâminas analisadas por tratamento) em microscópio de luz (Zeiss Primo Star com câmera AxioCam 105 color) com aumento de 400x.

Foram avaliados para cada tratamento o índice mitótico (IM, citotoxicidade) e frequência de alterações cromossômicas (AC, genotoxicidade), resultantes de ação aneugênica (metáfase com aderência cromossômica, C-metáfase, perda cromossômica, anáfase multipolar, células binucleadas, metáfase poliploides, entre outras) e/ou de ação clastogênica (fragmentos cromossômicos em metáfase ou anáfase, pontes cromossômicas e outras alterações).

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

$$\text{AC} = \frac{\text{Total de alterações cromossômicas}}{\text{Total de células observadas}} \times 500$$

O efeito protetor foi avaliado pela análise da porcentagem de redução de danos (%RD) para cada tratamento com piperina ou capsaicina, de acordo com a seguinte fórmula:  $\%RD = [(a - b) / (a - c)] \times 100$  (onde: a = média das alterações cromossômicas do CP; b = média das alterações cromossômicas em cada tratamento e c = média das alterações cromossômicas no CN) (Waters et al., 1990).

### **3.3 Análise dos dados**

Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), no programa BioEstat 5.3 (Ayres et al., 2007), para realizar a comparação entre as médias dos controles e grupos tratados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisas têm se concentrado na identificação de fitoquímicos e compostos isolados, que exerçam efeitos benéficos, e na elucidação de mecanismos que estejam relacionados com o efeito protetor desses compostos na célula (QIAN et al., 2016; SHARMA et al., 2012; ZHANG et al., 2015). A proteção contra danos ao DNA pode ser resultante da interação de compostos bioativos com agentes mutagênicos no meio intracelular e/ou extracelular (desmutagênicos) e no processo de reparo de danos (bioantimutagênicos) (ANDRADE et al., 2016; ASITA; HEISI; TJALE, 2015; SANTOS et al., 2012). Geralmente, a ação quimiopreventiva está associada com o potencial antioxidante de vários compostos isolados (BANERJEE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2018) que foram estudados no modelo *A. cepa* (CELIK; ASLANTURK, 2006; LIMAN; HAKK; GÖKÇE, 2017; SHETTY et al., 2017). Considerando a importância da piperina e capsaicina como especiarias utilizadas na gastronomia e na medicina popular (BLEY et al., 2012; KOLEVA et al., 2012; MUHAMMAD et al., 2018) e a necessidade de realizar mais estudos toxicogênicos, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito citogenotóxico e antigenotóxico dessas moléculas nas células meristemáticas de *A. cepa*.

### 4.1 Citotoxicidade e efeito modulador de danos celulares da piperina e capsaicina

O Dimetilsulfóxido (DMSO a 2%) utilizado como controle negativo (CN) não apresentou efeito citogenotóxico, pois não houve diferença significativa em relação a água destilada (controle do solvente). Os controles positivos, MMS I (Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 2%) e o MMS II (dissolvido em água destilada) também não apresentaram diferença significativa quando comparados um ao outro. Os resultados mostraram que o DMSO a 2% não teve efeito sobre a ação dos agentes testados (piperina ou capsaicina) e sobre o MMS. Desta forma, os resultados usando água destilada e MMS II são omitidos nas tabelas (Tabelas 1 a 5). Resultados similares foram observados em outros estudos com *A. cepa* utilizando o DMSO como solvente (ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017; BIANCHI et al., 2016; DIAS et al. 2019).

A piperina e a capsaicina foram citotóxicas nas concentrações 50 a 200  $\mu\text{M}$  (Tabela 1), pois houve redução significativa do índice mitótico (IM) das células

Tabela 1 - Efeito citotóxico da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de *Allium cepa* em diferentes concentrações.

Tratamento	Concentração	Fases da mitose (%) (Média ± DP)				Índice Mitótico (%) (Média ± DP)	Células em Processo de Morte (%) (Média ± DP)
		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase		
<b>CN</b>	DMSO 2%	15,93 ± 0,87	1,33 ± 0,75	1,62 ± 0,60	0,98 ± 0,34	19,86 ± 1,16	0,04 ± 0,12
<b>MMS I</b>	10 µg/mL	10,57 ± 1,50**	1,16 ± 0,51	1,09 ± 0,46	0,67 ± 0,50	14,09 ± 1,96**	0,77 ± 1,80
<b>Piperina</b>	25 µM	15,38 ± 0,84	1,36 ± 0,46	0,97 ± 0,39	1,21 ± 0,45	18,93 ± 1,21	0,08 ± 0,24
	50 µM	14,13 ± 1,05*	1,46 ± 0,49	1,44 ± 0,33	1,08 ± 0,46	18,11 ± 1,06*	0,51 ± 1,29
	100 µM	12,90 ± 1,42**	1,31 ± 0,79	1,01 ± 0,52	1,01 ± 0,52	16,22 ± 1,94**	0,27 ± 0,60
	200 µM	14,27 ± 0,84*	1,23 ± 0,51	1,26 ± 0,59	1,10 ± 0,67	17,85 ± 0,81*	0,47 ± 1,03
<b>Capsaicina</b>	25 µM	14,39 ± 0,61	1,24 ± 0,38	1,02 ± 0,42*	1,43 ± 0,64	18,08 ± 0,97	0,13 ± 0,40
	50 µM	13,00 ± 0,91*	1,05 ± 0,39	0,99 ± 0,37*	1,39 ± 0,37	16,42 ± 1,38*	0,02 ± 0,06
	100 µM	9,37 ± 1,85**	0,93 ± 0,41	0,81 ± 0,47**	0,79 ± 0,49	11,90 ± 2,12**	0,00 ± 0,00
	200 µM	4,64 ± 2,55**	0,15 ± 0,22**	0,17 ± 0,25**	0,24 ± 0,33**	5,21 ± 3,05**	1,74 ± 2,30

**CN:** Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - DMSO a 2% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 2%, **DP:** Desvio-padrão.

\*Significativo no teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Student-Newman-Keuls (\* p < 0,05; \*\*p < 0,01) quando comparado ao **CN**. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento após 48h de exposição aos agentes testados.

meristemáticas de *A. cepa* em relação ao CN, sendo dose dependente quando expostas a capsaicina.

A capsaicina apresentou IM menor em todas as concentrações, principalmente na maior (200  $\mu\text{M}$ ), quando comparados à piperina. O efeito citotóxico (IM) pode ser resultante do aumento de células em processo de morte (CPM) e da redução das fases da divisão celular (BIANCHI et al., 2010; LIMAN et al., 2019).

O aumento da porcentagem das células de *A. cepa* em processo de morte nas maiores concentrações (50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) da piperina e na menor (25  $\mu\text{M}$ ) e maior (200  $\mu\text{M}$ ) concentração da capsaicina pode ter contribuído para o efeito citotóxico, mesmo não sendo significativas quando comparadas ao CN (Tabela 1). Resultados similares foram observados em células de adenocarcinoma humano tratadas com a piperina (10-150  $\mu\text{M}$ ), que inibiu a progressão do ciclo celular e provocou apoptose nestas células, atribuída ao estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pela piperina nas concentrações 100 e 150  $\mu\text{M}$  (YAFFE et al., 2013).

Enquanto a capsaicina também induziu a apoptose e inibiu a proliferação de células tumorais de câncer de pulmão e bexiga, *in vitro*, e de camundongos *in vivo*, com a inibição da NADH-oxidoreductase, que estimula a atividade celular e proliferação. Além disso, a capsaicina também promoveu nessas células a ruptura da permeabilidade da membrana mitocondrial, geração de EROs e espécies reativas de nitrogênio (BROWN et al., 2010; CHO; LEE; CHOI, 2017; PRAMANIK et al., 2011; QIAN et al., 2016). No entanto a capsaicina não provocou apoptose em linhagens de câncer humano de pulmão A549 e próstata DU145, mesmo quando utilizada em concentrações de até 250  $\mu\text{M}$  (LEWINSKA et al., 2015). Assim como nos trabalhos citados, a liberação de radicais livres pela capsaicina e piperina pode ter sido um dos fatores que provocou o aumento das CPM em *A. cepa*.

Em relação às fases da mitose, foi observado uma redução significativa somente das prófases nas concentrações de 50 a 200  $\mu\text{M}$  de piperina quando comparadas com o CN. Já a capsaicina provocou reduções em todas as fases do ciclo celular, sendo significativas para a prófase (50 a 200  $\mu\text{M}$ ), metáfase (200  $\mu\text{M}$ ), anáfase (todas as concentrações) e telófase (200  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 1). Sendo assim, o efeito citotóxico observado no presente estudo está relacionado principalmente com a redução significativa das prófases para as duas moléculas citadas, que provoca a desaceleração da taxa de progressão celular como observado por PING et al. (2012).

A redução do IM pode também estar associada com a interferência da piperina ou capsaicina no processo de síntese de DNA (AHMED et al., 2017), estresse oxidativo (KAUR et al., 2014; SHETTY et al., 2017) e na inibição de proteínas específicas que estão envolvidas com os pontos de checagem em G1/S e/ou G2/M nas células meristemáticas de *A. cepa*, diminuindo o processo de divisão celular (GHOSH et al., 2015; TURKOGLU, 2012). Este resultado é reforçado em estudos prévios que evidenciaram a citotoxicidade da piperina em concentrações similares às do presente estudo, que promoveram a parada de células cancerígenas de melanoma, cólon humano e câncer de próstata em G1 (FOFARIA et al., 2014; OUYANG et al., 2013; YAFFE et al., 2015) e células de câncer bucal e retal em G2/M (SIDDIQUI et al., 2017; YAFFE et al., 2013). Resultados similares também foram observados em câncer de mama e osteosarcoma, onde a piperina provocou a parada do ciclo celular em G2/M associada à diminuição da expressão da ciclina B1 (DOUCETTE et al., 2013; GREENSHIELDS et al., 2015; ZHANG et al., 2015) nas mesmas concentrações do presente estudo (25-200  $\mu\text{M}$ ).

Em células cancerígenas, a capsaicina também induziu estresse oxidativo, diminuição na atividade metabólica, proliferação celular e alterações no ciclo celular nas maiores concentrações ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) (LEWINSKA et al., 2015). Em linhagens de carcinoma humano, a capsaicina promoveu a parada do ciclo celular (150-250  $\mu\text{M}$ ), principalmente em G2/M (LIN et al., 2013). Em células de carcinoma da bexiga, a capsaicina induziu parada do ciclo celular em G1 ao inibir as quinases dependentes de ciclina (CDK2, CDK4 e CDK6) (CHEN et al., 2012). A citotoxicidade da capsaicina na faixa micromolar foi reportado para uma série de linhagens celulares cancerígenas, e acredita-se que o pico da atividade antiproliferativa seja entre 200 e 300  $\mu\text{M}$  (BLEY et al., 2012).

Quanto ao efeito citoprotetor, não houve diferença significativa do IM nos três protocolos (pré, simultâneo e pós-tratamento) no tratamento com a piperina em relação ao MMS I. Quanto à capsaicina, observou-se reduções significativas em relação ao MMS no pré-tratamento (100 e 200  $\mu\text{M}$ ), no simultâneo (25 e 100  $\mu\text{M}$ ) e no pós-tratamento (200  $\mu\text{M}$ ). Enquanto nas outras concentrações dos protocolos citados, além de não ocorrer efeito protetor ainda houve uma diminuição do IM quando comparado com o MMS I (Tabela 2).



Tabela 2 - Efeito citoprotetor da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de *Allium cepa* em diferentes concentrações.

Tratamento	Concentração	Fases da mitose (%) (Média ± DP)				Índice Mitótico (%) (Média ± DP)	Células em Processo de Morte (%) (Média ± DP)
		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase		
<b>CN</b>	DMSO 2%	15,93 ± 0,87 <sup>++</sup>	1,33 ± 0,75	1,62 ± 0,60	0,98 ± 0,34	19,86 ± 1,16 <sup>++</sup>	0,04 ± 0,12
<b>MMS I</b>	10 µg/mL	10,57 ± 1,50	1,16 ± 0,51	1,09 ± 0,46	0,67 ± 0,50	14,09 ± 1,96	0,77 ± 1,80
<b>Piperina</b>	25 µM	11,60 ± 1,08	1,10 ± 0,47	1,00 ± 0,28	1,00 ± 0,44	14,70 ± 1,66	1,03 ± 1,42
	50 µM	11,24 ± 1,06	0,75 ± 0,31 <sup>+</sup>	0,77 ± 0,40	1,01 ± 0,45	13,78 ± 1,33	0,02 ± 0,06
<b>Pré- tratamento</b>	100 µM	10,80 ± 0,49	1,18 ± 0,48	0,77 ± 0,28	0,85 ± 0,43	13,60 ± 0,88	0,24 ± 0,43
	200 µM	10,42 ± 0,85	0,90 ± 0,39	0,66 ± 0,36 <sup>+</sup>	0,56 ± 0,32	12,53 ± 1,06	0,45 ± 0,84
<b>Tratamento Simultâneo</b>	25 µM	9,12 ± 2,36	0,13 ± 0,40	1,03 ± 0,38	0,66 ± 0,32	11,93 ± 2,27	0,22 ± 0,70
	50 µM	8,14 ± 2,63	1,15 ± 0,47	0,56 ± 0,39 <sup>+</sup>	0,91 ± 0,38	10,77 ± 3,21	0,43 ± 0,70
	100 µM	9,23 ± 1,40	1,24 ± 0,65	0,62 ± 0,33 <sup>+</sup>	0,90 ± 0,37	11,99 ± 1,60	0,00 ± 0,00
	200 µM	8,13 ± 2,12	0,78 ± 0,38	0,69 ± 0,38	0,85 ± 0,63	10,62 ± 2,28	0,00 ± 0,00
<b>Pós- tratamento</b>	25 µM	8,79 ± 1,29	1,27 ± 0,55	1,22 ± 0,39	0,97 ± 0,47	12,25 ± 2,04	0,24 ± 0,77
	50 µM	10,40 ± 0,97	1,47 ± 0,55	1,20 ± 0,50	1,21 ± 0,61	14,26 ± 1,32	0,52 ± 1,10
	100 µM	9,55 ± 1,04	1,13 ± 0,34	1,12 ± 0,45	1,24 ± 0,51	13,03 ± 1,55	0,00 ± 0,00
	200 µM	9,35 ± 1,02	1,36 ± 0,59	0,96 ± 0,50	0,93 ± 0,36	12,59 ± 1,41	0,26 ± 0,82
<b>Capsaicina</b>	25 µM	12,21 ± 1,36	0,82 ± 0,43	0,54 ± 0,33 <sup>+</sup>	0,41 ± 0,29	13,97 ± 1,84	0,00 ± 0,00
	50 µM	9,58 ± 1,60	0,46 ± 0,28 <sup>++</sup>	0,39 ± 0,25 <sup>++</sup>	0,39 ± 0,25	10,83 ± 1,91	0,25 ± 0,55
<b>Pré- tratamento</b>	100 µM	6,15 ± 1,49 <sup>+</sup>	0,37 ± 0,39 <sup>++</sup>	0,24 ± 0,29 <sup>++</sup>	0,40 ± 0,28	7,71 ± 2,10 <sup>++</sup>	0,08 ± 0,19
	200 µM	5,48 ± 1,72 <sup>++</sup>	0,44 ± 0,28 <sup>++</sup>	0,27 ± 0,24 <sup>++</sup>	0,34 ± 0,29	6,54 ± 2,10 <sup>++</sup>	1,01 ± 1,58
<b>Tratamento Simultâneo</b>	25 µM	8,16 ± 1,91 <sup>+</sup>	0,82 ± 0,61	0,34 ± 0,19 <sup>++</sup>	0,37 ± 0,29	9,69 ± 1,96 <sup>+</sup>	0,00 ± 0,00
	50 µM	9,87 ± 1,61	0,90 ± 0,38	0,42 ± 0,25 <sup>+</sup>	0,82 ± 0,36	12,00 ± 1,23	0,00 ± 0,00
	100 µM	8,71 ± 1,99	0,71 ± 0,28 <sup>+</sup>	0,24 ± 0,15 <sup>++</sup>	0,47 ± 0,12	10,19 ± 2,02 <sup>+</sup>	0,00 ± 0,00
	200 µM	8,95 ± 1,91	0,79 ± 0,28	0,39 ± 0,31 <sup>++</sup>	0,40 ± 0,21	10,53 ± 1,95	0,52 ± 1,63
<b>Pós- tratamento</b>	25 µM	9,09 ± 1,68	1,50 ± 0,49	0,68 ± 0,24	0,81 ± 0,44	12,09 ± 2,10	0,40 ± 0,86
	50 µM	8,76 ± 1,54	1,20 ± 0,48	0,84 ± 0,39	0,81 ± 0,36	11,61 ± 1,80	0,00 ± 0,00
	100 µM	8,19 ± 1,03	1,27 ± 0,37	0,85 ± 0,43	0,16 ± 0,55 <sup>+</sup>	11,49 ± 1,76	0,46 ± 0,82
	200 µM	4,45 ± 1,54 <sup>++</sup>	0,46 ± 0,54 <sup>+</sup>	0,21 ± 0,28 <sup>++</sup>	0,27 ± 0,28	5,38 ± 2,39 <sup>++</sup>	1,64 ± 3,02

**CN:** Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - DMSO a 2% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 2%. **Pré-tratamento:** raízes expostas a piperina ou capsaicina (24h) e depois ao MMS (24h). **Tratamento Simultâneo:** raízes em água destilada (24h) e depois na piperina ou capsaicina e MMS (24h), adicionados simultaneamente. **Pós-tratamento:** raízes expostas ao MMS (24h) e por mais 24h na piperina ou capsaicina. **DP:** Desvio-padrão. <sup>+</sup>Significativo no teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Student-Newman-Keuls (<sup>+</sup> p < 0,05; <sup>++</sup> p < 0,01) quando comparado ao **MMS I**. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

Em todas as concentrações avaliadas com a piperina ou capsaicina, também não houve diferença significativa das CPM em todos os protocolos (pré, simultâneo e pós-tratamento) em relação ao MMS I (Tabela 2).

Nas células de *A. cepa* expostas à piperina, não foi observada diferença significativa das fases da mitose em praticamente todas as concentrações do pré, simultâneo e pós-tratamento em relação ao MMS, reforçando a ausência do efeito citoprotetor. Já o tratamento com a capsaicina apresentou reduções significativas da prófase, metáfase e anáfase (pré, simultâneo e pós-tratamento) e da telófase apenas no pós-tratamento nas fases da mitose (Tabela 2).

Os resultados observados mostram que a piperina ou capsaicina não foram capazes de neutralizar ação citotóxica do MMS. As duas moléculas são alcaloides, que apresentam tanto ação antioxidante quanto pró-oxidante (capazes de gerar radicais livres) dependendo da dose e do grupo de células tratadas (GUTIERREZ et al., 2013; MACAKOVA et al., 2019; RATHER; BHAGAT, 2018). Provavelmente, ambas as moléculas atuaram gerando radicais livres assim como nos trabalhos citados previamente com cultura de células.

A ação pró-oxidante dessas moléculas pode ter atuado de forma sinérgica com o MMS, potencializando ação citotóxica do mesmo, principalmente para a capsaicina, que promoveu reduções significativas do IM. Este resultado é reforçado pelo fato de que os agentes alquilantes, como o MMS, reduzem rapidamente os níveis de glutathione-S-transferases (GST) em células de mamíferos, causando estresse oxidativo (LIU et al., 1996) e podem ter atuado de forma semelhante nas células meristemáticas de *A. cepa*, que têm altos níveis de GST (HOSSAIN et al., 2007).

Sendo assim, a redução dos níveis de GST tanto pelo MMS como pelas moléculas do presente estudo podem resultar na diminuição das defesas antioxidantes das células do presente estudo e no conseqüente acúmulo de EROs. Estes compostos podem estar associados à diminuição do IM observado nas células meristemáticas de *A. cepa*, pois causam peroxidação de lipídios, alterações na fluidez da membrana e danos no DNA como observados em *A. cepa* por Bianchi et al. (2016). Em resposta a estes danos, geralmente ocorre um atraso no ciclo mitótico, principalmente nas fases G1 e G2, para permitir que as células reparem o dano induzido antes de replicar seu DNA e começar a mitose (FENG et al., 2010).

## 4.2 Genotoxicidade da piperina e capsaicina

Alterações cromossômicas em *A. cepa* podem ser observadas em qualquer fase do ciclo celular e são consideradas evidências de efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos induzidos por agentes clastogênicos ou aneugênicos (FERNANDES et al., 2009; TEDESCO et al., 2012). Fitoterápicos na forma de extratos (aquoso, etanólico, dentre outros solventes), óleos essenciais, infusões, ou mesmo compostos bioativos isolados são rotineiramente submetidos a ensaios de citogenotoxicidade (LIMAN et al., 2018; MOHAMMED et al., 2015; SPONCHIADO et al., 2016; OYEYEMI; BAKARE, 2013).

A piperina provocou aumento significativo na média total das alterações cromossômicas (efeito genotóxico) nas maiores concentrações (50 a 200  $\mu\text{M}$ ) das células meristemáticas de *A. cepa* quando comparadas ao CN. Para capsaicina, o efeito genotóxico foi dose-dependente com aumento significativo para todas as concentrações (Tabela 3). Além disso, foi verificado que a média total das alterações cromossômicas resultantes da ação da capsaicina foram maiores do que a da piperina. Provavelmente, a ação pró-oxidante das duas moléculas em estudo pode ter resultado no efeito genotóxico observado, pois as EROs aumentam o risco de danos no DNA, incluindo a divisão de células com danos não reparados ou mal reparados, levando a mutações (KEHRER e KLOTZ, 2015).

Tabela 3 - Efeito genotóxico da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de *Allium cepa* em diferentes concentrações.

Tratamento	Concentração	Total de Alterações Cromossômicas (Média $\pm$ DP)
<b>CN</b>	DMSO 2%	4,13 $\pm$ 2,28
<b>MMS I</b>	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	59,52 $\pm$ 13,34**
<b>Piperina</b>	25 $\mu\text{M}$	6,63 $\pm$ 3,23
	50 $\mu\text{M}$	11,93 $\pm$ 2,69**
	100 $\mu\text{M}$	11,63 $\pm$ 6,44*
	200 $\mu\text{M}$	15,05 $\pm$ 3,79**
<b>Capsaicina</b>	25 $\mu\text{M}$	13,31 $\pm$ 9,71*
	50 $\mu\text{M}$	14,55 $\pm$ 3,46**
	100 $\mu\text{M}$	15,36 $\pm$ 4,94**
	200 $\mu\text{M}$	16,78 $\pm$ 6,73**

**CN:** Controle Negativo (Dimetilsulfóxido – DMSO a 2% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 2%, **DP:** Desvio-padrão. \*Significativo no teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Student-Newman-Keuls (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) quando comparado ao **CN**. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento após 48h de exposição aos agentes testados.

Resultados similares quanto às induções de danos ao DNA também foram observados em células de melanoma humano tratadas com a piperina, que resultou em EROs e reduziu drasticamente a expressão da DNA polimerase  $\beta$  (enzima que desempenha papel importante no reparo de quebras da cadeia de DNA), o que sugere que a piperina (100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) causou danos ao DNA e ainda impediu o reparo (FOFARIA et al., 2014). Contudo, outros sistemas testes (AMES, Micronúcleo *in vivo* e *in vitro*) mostram que baixas concentrações da piperina isolada foram predominantemente não genotóxicas (BALAKRISHNAN et al., 2008; KAREKAR et al., 1996; THIEL et al., 2014).

Para a capsaicina, a ação genotóxica (100 e 200  $\mu\text{M}$ ) também foi observada em células humanas no ensaio de Micronúcleos e no teste de Troca de Cromátides Irmãs (MARQUES et al., 2002). A capsaicina, em concentrações a partir de 100  $\mu\text{M}$ , estimulou tanto as rupturas da cadeia dupla do DNA como a produção de micronúcleos em células de câncer de próstata e pulmão (LEWINSKA et al., 2015). Além disso, resultados com baixo potencial genotóxico são mostrados no teste de AMES, teste de Mutação de Células de Linfoma de camundongo, teste de Micronúcleos da medula óssea *in vivo* e Alterações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico (CHANDA et al., 2004; PROUDLOCK et al., 2004).

A piperina e a capsaicina provocaram diferentes tipos de alterações cromossômicas quando analisadas individualmente nas células de *A. cepa*, como: micronúcleo (MN), broto nuclear (BN), quebra cromossômica (QC), célula binucleada (CB), aderência cromossômica (AC), C-metáfase (CM), perda cromossômica (PC), ponte cromossômica (PT), anáfase multipolar (AM) e alteração nuclear (AN) (Figura 5).

Na piperina, apenas os MNs foram significativos (200  $\mu\text{M}$ ) quando comparados ao CN. Já capsaicina causou aumento significativo dos MNs (todas as concentrações), BNs (50 a 200  $\mu\text{M}$ ) e ACs (50 e 100  $\mu\text{M}$ ). De forma geral, tanto a piperina quanto a capsaicina provocaram aumento das alterações cromossômicas em relação ao CN na maioria das concentrações, o que reforça o efeito genotóxico das moléculas analisadas (Tabela 4).

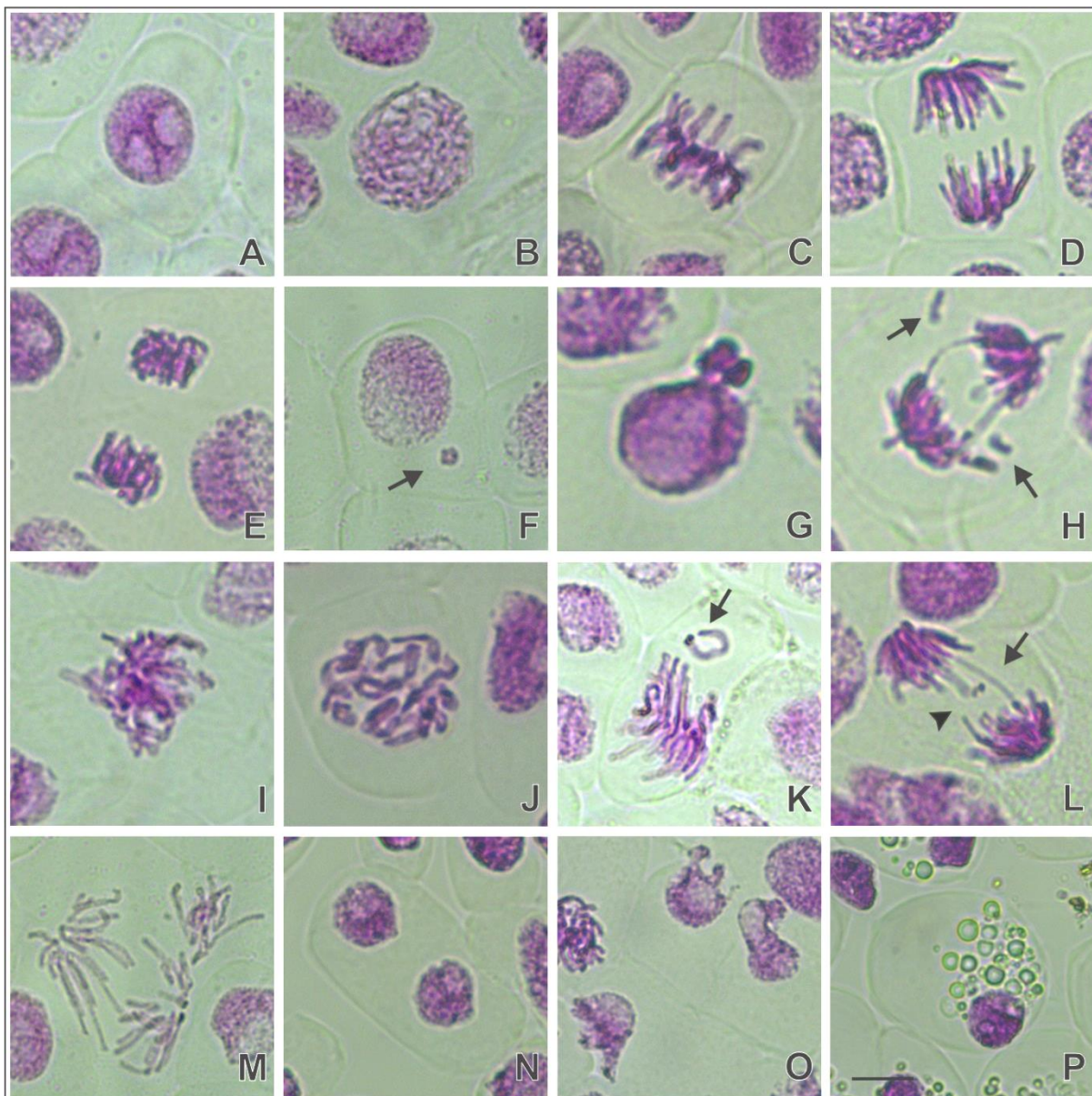


Figura 5 - Alterações cromossômicas e nucleares observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. A: interfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D: anáfase normal; E: telófase normal; F: micronúcleo (seta); G: interfase com broto nuclear; H: quebras cromossômicas (seta); I: aderência cromossômica; J: C-metáfase; K: perda cromossômica (seta); L: ponte cromossômica (seta) e quebra cromossômica (cabeça de seta); M: anáfase multipolar; N: célula binucleada; O: alterações nucleares; P: célula em processo de morte (núcleo heteropícnótico e deslocado para a periferia celular; vacuolização e polimerização do citoplasma). Barra: 10µm (para todas as imagens).

Os MNs observados no presente estudo podem ser decorrentes de danos clastogênicos e/ou aneugênicos não reparados ou reparados erroneamente, nas células parentais, sendo facilmente observados nas células-filhas como estrutura semelhante ao núcleo principal, porém em tamanho reduzido (FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; YADAV et al., 2019).

Tabela 4 - Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* após exposição a piperina e capsaicina em diferentes concentrações.

Tratamento	Concentração	Alterações Cromossômicas (Média ± DP)									
		MN	BN	QC	CB	AC	Cm	PC	PT	AM	AN
<b>CN</b>	DMSO 2%	0,84 ± 1,08	2,82 ± 1,62	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,10 ± 0,30	0,19 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00
<b>MMS I</b>	10 µg/mL	33,56 ± 7,66**	23,43 ± 5,80**	0,46 ± 0,64	0,28 ± 0,64	0,38 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,84 ± 1,01	0,28 ± 0,45	0,10 ± 0,31	0,19 ± 0,39
<b>Piperina</b>	25 µM	3,04 ± 1,74	2,54 ± 2,39	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,38 ± 0,50	0,09 ± 0,29	0,29 ± 0,65	0,10 ± 0,30	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00
	50 µM	3,81 ± 3,22	7,55 ± 4,78	0,18 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,30	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	100 µM	3,48 ± 4,48	6,77 ± 5,21	0,09 ± 0,30	0,00 ± 0,00	0,36 ± 0,47	0,09 ± 0,30	0,37 ± 0,47	0,09 ± 0,30	0,09 ± 0,30	0,19 ± 0,40
	200 µM	6,98 ± 2,64**	6,65 ± 3,72	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00	0,48 ± 0,68	0,09 ± 0,29	0,28 ± 0,45	0,19 ± 0,40	0,29 ± 0,46	0,00 ± 0,00
<b>Capsaicina</b>	25 µM	6,80 ± 6,53*	4,88 ± 3,82	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,07 ± 1,63	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	0,19 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,39
	50 µM	5,53 ± 2,57*	6,74 ± 6,53*	0,09 ± 0,30	0,20 ± 0,63	1,60 ± 1,41*	0,10 ± 0,31	0,10 ± 0,31	0,19 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31
	100 µM	6,58 ± 2,74**	6,74 ± 2,88*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,55 ± 1,43*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,49	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,30
	200 µM	7,69 ± 3,86**	7,69 ± 3,86*	0,00 ± 0,00	0,36 ± 0,75	1,27 ± 1,58	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,30	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,28

**CN:** Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - DMSO a 2% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 2%. **MN:** Micronúcleo. **BN:** Broto Nuclear. **QC:** Quebra Cromossômica. **CB:** Célula Binucleada. **AC:** Aderência Cromossômica. **Cm:** C-metáfase. **PC:** Perda Cromossômica. **PT:** Ponte Cromossômica. **AM:** Anáfase Multipolar. **AN:** Alteração Nuclear. **DP:** Desvio-padrão. \*Significativo no teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Student-Newman-Keuls (\* p < 0,05; \*\*p < 0,01) quando comparado ao **CN**. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento após 48h de exposição aos agentes testados.

Os BNs podem ser relacionados ao processo inicial de formação de MN, através da eliminação do material genético extra no núcleo principal da célula, ou pode ser devido a agregação de um cromossomo atrasado pelo envelope nuclear, antes de ser totalmente reincorporado ao núcleo principal (BIANCHI et al., 2015). As ACs são um tipo de anormalidade que envolve a proteína na matriz da cromatina e não necessariamente o próprio DNA; esta pode ainda ser irreversível e levar à morte celular (FERNANDES; MARIN-MORALES, 2009).

A presença das alterações cromossômicas significativas (MN e BN) no presente estudo mostram que a piperina ou capsaicina estão interagindo com a molécula de DNA, como foi observado por estudos de espectroscopia de absorção e fluorescência UV-visível, a interação da piperina com sulco menor do DNA, exibindo uma especificidade para sequências ricas em AT (HARIS et al., 2015). O mecanismo de interação da capsaicina com o DNA é de ligação não intercalada com o sulco menor, e se encontra principalmente em regiões que predominam as bases nitrogenadas GC (QAIS et al., 2017). Apesar de não realizar forte interação intercalar, a exposição a capsaicina diminuiu a interação entre o DNA e o brometo de etídio (agente intercalante), possivelmente removendo o brometo de etídio e ligando-se ao DNA (YILMAZ et al., 2017).

#### **4.3 Antigenotoxicidade da piperina e capsaicina**

A piperina e a capsaicina são potenciais antimutagênicos e anticarcinogênicos (ABO-ZEID; FARGHALY, 2009; FERNANDEZ-BEDMAR; ALONSO-MORAGA, 2016). Desta forma, buscou-se avaliar a atividade antigenotóxica de ambas as moléculas sobre danos induzidos pelo MMS (10 µg/mL) com os protocolos pré, simultâneo e pós tratamento, que são utilizados como modelos padrão (FEDEL-MIYASATO et al., 2014; FELICIDADE et al., 2014; MAURO et al., 2014).

A redução significativa da média total das alterações cromossômicas de *A. cepa* quando expostas à piperina foi observada no pré (50 a 200 µM), simultâneo (todas as concentrações) e no pós-tratamento (todas as concentrações) em relação ao MMS I (Tabela 5). A porcentagem de redução de danos (%RD) variou de 57,93 a 85,66%, de 58,71 a 74,07% e de 54,38 a 64,16% no pré, simultâneo e pós- tratamento, respectivamente. O pré-tratamento destacou-se pelas maiores %RD em relação aos outros protocolos.

Tabela 5 - Efeito antígeno-tóxico da piperina e capsaicina nas células meristemáticas de *Allium cepa* em diferentes concentrações.

Tratamento	Concentração	Total de Alterações Cromossômicas (Média ± DP)	Porcentagem de Redução de Danos (%RD)
<b>CN</b>	DMSO a 2%	4,13 ± 2,28 <sup>++</sup>	-
<b>MMS I</b>	10 µg/mL	59,52 ± 13,34	-
<b>Piperina</b>			
<b>Pré-tratamento</b>	25 µM	27,43 ± 5,29	57,93
	50 µM	15,06 ± 5,44 <sup>++</sup>	80,27
	100 µM	13,39 ± 4,33 <sup>++</sup>	83,28
	200 µM	12,07 ± 2,83 <sup>++</sup>	85,66
<b>Tratamento Simultâneo</b>	25 µM	18,49 ± 5,68 <sup>++</sup>	74,07
	50 µM	19,64 ± 22,09 <sup>++</sup>	72,00
	100 µM	22,09 ± 6,65 <sup>++</sup>	67,57
	200 µM	27,00 ± 8,19 <sup>+</sup>	58,71
<b>Pós-tratamento</b>	25 µM	23,98 ± 7,96 <sup>++</sup>	64,16
	50 µM	25,04 ± 6,39 <sup>++</sup>	62,25
	100 µM	28,49 ± 8,27 <sup>++</sup>	56,02
	200 µM	29,40 ± 7,05 <sup>++</sup>	54,38
<b>Capsaicina</b>			
<b>Pré-tratamento</b>	25 µM	11,77 ± 4,95 <sup>++</sup>	86,21
	50 µM	18,66 ± 4,05 <sup>++</sup>	73,77
	100 µM	20,53 ± 8,21 <sup>++</sup>	70,39
	200 µM	18,64 ± 6,71 <sup>++</sup>	73,80
<b>Tratamento Simultâneo</b>	25 µM	39,38 ± 6,93 <sup>+</sup>	36,36
	50 µM	35,01 ± 15,16 <sup>++</sup>	44,24
	100 µM	30,78 ± 7,63 <sup>++</sup>	51,89
	200 µM	37,07 ± 11,46 <sup>+</sup>	40,53
<b>Pós-tratamento</b>	25 µM	50,18 ± 11,64	16,86
	50 µM	61,60 ± 13,31	-3,75
	100 µM	57,46 ± 9,74	3,72
	200 µM	39,67 ± 14,23 <sup>+</sup>	35,84

**CN:** Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - DMSO a 2% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 2%. **Pré-tratamento:** raízes expostas à piperina e capsaicina (24h) e depois ao MMS (24h). **Tratamento Simultâneo:** raízes em água destilada (24h) e depois com (piperina ou capsaicina) e MMS (24h), adicionados simultaneamente. **Pós-tratamento:** raízes expostas ao MMS (24h) e por mais 24h na (piperina ou capsaicina). **DP:** Desvio-padrão. <sup>+</sup>Significativo no teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Student-Newman-Keuls (\* p < 0,05; <sup>++</sup> p < 0,01), quando comparado ao MMS I. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

Resultado similar quanto ao efeito protetor também foi observado para a capsaicina, principalmente no pré e no simultâneo (todas as concentrações), enquanto no pós-tratamento apenas a maior concentração (200 µM) teve efeito protetor (Tabela 5). A %RD variou de 73,80 a 86,21%, 36,36 a 40,53% e de -3,75 a 35,84%, no pré, simultâneo e pós- tratamento, respectivamente. Assim como na piperina, a capsaicina também apresentou melhor %RD no pré-tratamento. Além disso, comparando as duas moléculas, foi verificado que a piperina apresentou maior %RD em todas as concentrações de todos os protocolos utilizados, exceto na menor concentração do pré-tratamento.



De forma geral, os compostos testados promoveram o efeito protetor contra ação genotóxica e mutagênica provocada pelo MMS. No pré-tratamento, o composto isolado (piperina ou capsaicina) entrou em contato com a célula antes do agente indutor de danos (MMS) e interagiu com o MMS no meio intracelular, podendo ser no citoplasma ou mesmo no núcleo celular. Dois mecanismos nos quais a piperina ou a capsaicina podem atuar para alterar os efeitos do MMS foram sugeridos: (I) os isolados podem interagir diretamente com o MMS, impedindo a sua ação mutagênica, e, conseqüentemente teria uma atividade desmutagênica e/ou (II) os isolados poderiam modular previamente o sistema enzimático, melhorando a capacidade de reparo dos danos induzidos pelo MMS. Os dois mecanismos foram previamente propostos por Felicidade et al. (2014) para o efeito protetor do extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. em células meristemáticas de *A. cepa*.

Para o tratamento simultâneo em que são administrados o isolado (piperina ou capsaicina) e o MMS, simultaneamente, a redução nos danos à célula pode ser resultado tanto da ação desmutagênica quanto da bioantimutagênica pelos bioativos testados, como observados no composto inulina (MAURO et al., 2014) e no extrato aquoso de folhas de *Amaranthus spinosus* L. (PRAJITHA; THOPPIL; 2015). No pós-tratamento, a piperina e capsaicina promoveram também a redução dos danos induzidos pelo MMS pela ação bioantimutagênica, que atua em mecanismos de reparo do DNA, induzindo a reversão do efeito mutagênico e impedindo a fixação de mutações (DAMETTO et al., 2017; FEDEL-MIYASATO et al., 2014).

A piperina e capsaicina apresentaram genotoxicidade e efeito protetor (para os três protocolos) na maioria das concentrações. Resultado similar quanto ao duplo efeito também foi observado no extrato aquoso das folhas de *Amaranthus spinosus* L. em células meristemáticas de *A. cepa* (PRAJITHA; THOPPIL, 2015), sendo referido como efeito "Janus" (ZEIGER, 2003). O efeito Janus é relatado para uma variedade de fitoquímicos, principalmente do grupo dos alcaloides, polifenóis, taninos, dentre outros (PÉREZ-CARREÓN et al., 2002; PRAJITHA; THOPPIL; 2015; SHETTY et al., 2017). Além disso, outros trabalhos reforçam o efeito Janus observado no presente estudo, pois a piperina e capsaicina são alcaloides que apresentam tanto a ação antioxidante quanto pró-oxidante (capazes de gerar radicais livres) dependendo da dose e do grupo de células tratadas (GUTIERREZ et al., 2013; MACAKOVA et al., 2019; RATHER; BHAGAT, 2018).

O MMS foi utilizado no presente estudo como indutor de danos ao DNA no ensaio *A. cepa*. Há dois mecanismos principais que esse composto pode atuar. O primeiro é a sua conhecida capacidade de alquilação e metilação, que pode causar quebras na cadeia dupla do DNA e inibição da forquilha de replicação (CHATTERJEE; WALKER, 2017; PITTMAN et al., 2006). O segundo é a sua indução de altos níveis de estresse oxidativo, que pode levar à apoptose, morte celular e danos no DNA (LACKINGER et al., 2001, JIANG et al., 2016). Muitos estudos demonstram a capacidade de depleção dos níveis de Glutathione-S-transferase pelo MMS (LIU et al., 1996) e da Glutathione (SIDDIQUE et al., 2019), que compromete as defesas antioxidantes celulares e leva ao acúmulo de EROs geradas como subprodutos da função celular normal (RAZA et al., 2011).

Provavelmente, a piperina e a capsaicina atuaram neutralizando a ação do MMS pelos dois mecanismos citados, uma vez que a ação mutagênica direta do MMS foi impedida (Tabela 5), assim como a maioria das alterações cromossômicas (analisadas individualmente) de *A. cepa* quando comparadas ao MMS I (Tabela 6).

Nas células expostas à piperina, os MNs e BNs apresentaram redução significativa nas mesmas concentrações dos três protocolos (pré, simultâneo e pós-tratamento) em relação ao MMS I. As PCs também tiveram redução significativa no tratamento simultâneo (25 e 50  $\mu\text{M}$ ).

Em relação a capsaicina, os MNs apresentaram reduções significativas no pré (todas as concentrações) e no simultâneo (50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Os BNs também foram significativos no pré (todas as concentrações), simultâneo (25 a 100  $\mu\text{M}$ ) e no pós-tratamento (200  $\mu\text{M}$ ). Esses resultados reforçam que os isolados impediram a atuação aneugênica e/ou clastogênica do MMS nas células meristemáticas de *A. cepa* (Tabela 6).

Além disso, a piperina ou a capsaicina também podem ter atuado minimizando o estresse oxidativo, no qual as moléculas isoladas teriam neutralizado as EROs resultantes da ação do MMS, uma vez que os isolados são alcaloides e apresentam atividades antioxidantes, devido à sua capacidade de neutralizar a ação de radicais

Tabela 6 - Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* após exposição à piperina ou capsaicina para avaliar a antigenotoxicidade em diferentes concentrações.

Tratamento	Concentração	Alterações Cromossômicas (Média ± DP)									
		MN	BN	QC	CB	AC	Cm	PC	PT	AM	AN
CN	DMSO 2%	0,84 ± 1,08 <sup>++</sup>	2,82 ± 1,62 <sup>++</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,10 ± 0,30	0,19 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00
MMS I	10 µg/mL	33,56 ± 7,66	23,43 ± 5,80	0,46 ± 0,64	0,28 ± 0,64	0,38 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,84 ± 1,01	0,28 ± 0,45	0,10 ± 0,31	0,19 ± 0,39
Piperina	25 µM	13,31 ± 4,31	12,23 ± 2,88	0,38 ± 0,67	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00	0,85 ± 0,54	0,29 ± 0,46	0,18 ± 0,39	0,10 ± 0,31
	50 µM	6,09 ± 3,58 <sup>++</sup>	7,41 ± 4,83 <sup>++</sup>	0,74 ± 0,74	0,09 ± 0,29	0,18 ± 0,38	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,27	0,46 ± 0,66	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Pré-tratamento	100 µM	4,69 ± 3,05 <sup>++</sup>	7,56 ± 2,94 <sup>++</sup>	0,39 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,65	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	0,19 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	200 µM	4,48 ± 2,39 <sup>++</sup>	6,47 ± 2,92 <sup>++</sup>	0,48 ± 0,81	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,30	0,38 ± 0,67	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tratamento Simultâneo	25 µM	11,09 ± 4,40 <sup>++</sup>	6,65 ± 4,38 <sup>++</sup>	0,19 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,38	0,10 ± 0,30	0,00 ± 0,00 <sup>+</sup>	0,18 ± 0,39	0,10 ± 0,30	0,00 ± 0,00
	50 µM	8,95 ± 4,71 <sup>++</sup>	9,87 ± 3,57 <sup>++</sup>	0,28 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,36 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 <sup>+</sup>	0,18 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	100 µM	10,55 ± 4,75 <sup>++</sup>	10,03 ± 2,76 <sup>++</sup>	0,19 ± 0,41	0,00 ± 0,00	0,65 ± 0,77	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,39	0,48 ± 0,82	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	200 µM	12,61 ± 7,05 <sup>++</sup>	13,54 ± 3,76	0,28 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	0,28 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,29
Pós-tratamento	25 µM	13,86 ± 6,05 <sup>++</sup>	8,91 ± 3,56 <sup>+</sup>	0,09 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	50 µM	13,32 ± 2,82 <sup>++</sup>	11,05 ± 4,62 <sup>+</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,70	0,08 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	100 µM	15,88 ± 6,56 <sup>++</sup>	11,67 ± 3,96 <sup>++</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,57 ± 0,67	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,28 ± 0,44	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	200 µM	16,24 ± 6,20 <sup>++</sup>	12,63 ± 6,20 <sup>++</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,35 ± 0,83	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Capsaicina	25 µM	5,67 ± 2,22 <sup>++</sup>	5,45 ± 3,63 <sup>++</sup>	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,29	0,19 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31
	50 µM	9,76 ± 3,16 <sup>+</sup>	7,79 ± 2,61 <sup>++</sup>	0,19 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,73 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Pré-tratamento	100 µM	8,13 ± 5,64 <sup>++</sup>	10,22 ± 5,78 <sup>+</sup>	0,59 ± 1,88	0,00 ± 0,00	0,75 ± 1,08	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,62	0,37 ± 0,48	0,10 ± 0,31	0,09 ± 0,29
	200 µM	8,01 ± 3,30 <sup>++</sup>	9,60 ± 4,30 <sup>+</sup>	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,28	0,46 ± 0,68	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,31	0,10 ± 0,31	0,09 ± 0,29	0,10 ± 0,31
Tratamento Simultâneo	25 µM	25,47 ± 4,44	12,31 ± 3,84 <sup>+</sup>	0,19 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,65	0,10 ± 0,31	0,37 ± 0,90	0,09 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40
	50 µM	20,64 ± 8,54 <sup>+</sup>	11,89 ± 6,63 <sup>+</sup>	0,68 ± 0,65	0,09 ± 0,29	0,76 ± 0,89	0,27 ± 0,86	0,39 ± 0,81	0,29 ± 0,46	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	100 µM	19,07 ± 5,80 <sup>++</sup>	10,50 ± 4,24 <sup>++</sup>	0,45 ± 0,65	0,00 ± 0,00	0,46 ± 0,65	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,60	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,30
	200 µM	20,59 ± 8,21	14,84 ± 4,86	0,39 ± 0,69	0,10 ± 0,32	0,86 ± 1,05	0,10 ± 0,31	0,10 ± 0,31	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Pós-tratamento	25 µM	31,53 ± 8,44	17,16 ± 4,47	0,10 ± 0,58	0,09 ± 0,30	0,74 ± 0,84	0,20 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,38	0,09 ± 0,30	0,00 ± 0,00
	50 µM	42,56 ± 11,74	16,50 ± 5,00	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00	0,81 ± 0,67	0,09 ± 0,28	0,91 ± 1,03	0,37 ± 0,48	0,09 ± 0,28	0,17 ± 0,36
	100 µM	37,85 ± 7,86	17,35 ± 2,11	0,10 ± 0,31	0,10 ± 0,32	0,86 ± 0,83	0,18 ± 0,38	0,48 ± 0,69	0,55 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	200 µM	26,70 ± 10,25	11,82 ± 6,16 <sup>++</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,46	0,29 ± 0,66	0,28 ± 0,64	0,19 ± 0,41	0,10 ± 0,31	0,00 ± 0,00

**CN:** Controle Negativo (Dimetilsulfóxido – DMSO a 2% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 2%. **MN:** Micronúcleo. **BN:** Broto Nuclear. **QC:** Quebra Cromossômica. **CB:** Célula Binucleada. **AC:** Aderência Cromossômica. **Cm:** C-metáfase. **PC:** Perda Cromossômica. **PT:** Ponte Cromossômica. **AM:** Anáfase Multipolar. **AN:** Alteração Nuclear. **Pré-tratamento:** raízes expostas a piperina ou capsaicina (24h) e depois ao MMS (24h). **Tratamento Simultâneo:** raízes em água destilada (24h) e depois na piperina ou capsaicina e MMS (24h), adicionados simultaneamente. **Pós-tratamento:** raízes expostas ao MMS (24h) e por mais 24h na piperina ou capsaicina. **DP:** Desvio-padrão. <sup>+</sup>Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (\* p < 0,05; <sup>++</sup> p < 0,01) quando comparado ao MMS I. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

livres, atividade quelante de metais ou capacidade de doação de elétrons ou hidrogênio (KAUR; ARORA, 2015; TSOI et al., 2015). O potencial antioxidante dos alcaloides é apontado como dos principais fatores que contribuem para sua ação antimutagênica e antigênotoxicidade (MAURO et al., 2007).

Outros trabalhos também apresentaram resultados satisfatórios quanto a antigenotoxicidade da piperina, como no teste de Alterações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos induzidas pela ciclofosfamida e mitocinina C (ABO-ZEID; FARGHALY, 2009; WONGPA et al., 2007). A piperina diminuiu o efeito genotóxico induzido por aflatoxinas em frangos pela redução de danos ao DNA nas células do sangue periférico (ensaio cometa) e micronúcleos (CARDOSO et al., 2016).

Já o efeito protetor da capsaicina foi satisfatório sobre o carcinogênico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em câncer do cólon pelo ensaio cometa em leucócitos de camundongos e ensaios enzimáticos (CAETANO et al., 2018). A capsaicina reduziu os efeitos tóxicos e genotóxicos induzidos pelo MMS e por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* no teste SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) e ensaio cometa em células de drosófilas (FERNANDEZ-BEDMAR; ALONSO-MORAGA, 2016; KHANAM et al., 2017).

## 5 CONCLUSÕES

A piperina e a capsaicina nas maiores concentrações testadas interferiram na progressão do ciclo celular (efeito citotóxico) das células meristemáticas de *A. cepa*, provocando a redução significativa, principalmente, das prófases e conseqüentemente diminuindo a progressão do ciclo celular. O efeito citoprotetor não foi observado nas células de *A. cepa* quando expostos a piperina ou capsaicina em nenhum dos protocolos (pré, simultâneo e pós), o que evidencia que os compostos isolados não foram capazes de neutralizar a ação citotóxica do MMS.

A piperina e a capsaicina provocaram efeito genotóxico (média total das alterações cromossômicas) na maioria das concentrações analisadas, destacando-se a presença de micronúcleos, brotos nucleares, perdas cromossômicas e aderências cromossômicas significativas, evidenciando a ação clastogênica e/ou aneugênica dos compostos isolados.

Os compostos isolados (piperina ou capsaicina) apresentaram efeito protetor na maioria das concentrações dos protocolos pré, simultâneo e pós contra ação genotóxica e/ou mutagênica do MMS, pois foi observado um efeito modulador dos danos induzidos pelo MMS no material genético de *A. cepa*. De forma geral, a porcentagem de redução de danos foi maior no pré-tratamento para as duas moléculas em estudo, o que reforça a ação desmutagênica como principal mecanismo relacionado com o efeito protetor. A redução da maioria das alterações cromossômicas das células meristemáticas de *A. cepa* quando comparadas com o MMS reforça o efeito protetor exercido por essas duas moléculas. Outro ponto observado foi o efeito genotóxico e antígenotóxico na maioria das concentrações avaliadas para as duas moléculas em estudo, conhecido como efeito "Janus".

Mesmo apresentado efeito citogenotóxico, a piperina e a capsaicina também demonstraram importante atividade quimiopreventiva, que está indiretamente correlacionada com a prevenção e/ou tratamento de doenças genéticas, como o câncer. Nossos resultados indicam ainda que os isolados podem prevenir e/ou reparar os danos ao DNA causado pela desmutagênese e biomutagênese e, portanto, podem ter aplicações terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ABDULAZEEZ et al. Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Oils. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, p. 277-285, 2016.
- ABO-ZEID, M. A. M.; Farghaly, A. A. The Anti-mutagenic Activity of Piperine against Mitomycine C induced Sister Chromatid Exchanges and Chromosomal Aberrations in Mice. **Nature and Science**, v. 7, n.12, p.72-78, 2009.
- AHMAD, N. et al. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 1945-1953, 2012.
- AHMED, B. et al. Mitochondrial and Chromosomal Damage Induced by Oxidative Stress in Zn<sup>2+</sup> Ions, ZnO-Bulk and ZnO-NPs treated *Allium cepa* roots. **Scientific reports**, v. 7, p. 1-14, 2017.
- ALARABY, M. et al. Antioxidant and antigenotoxic properties of CeO<sub>2</sub> NPs and cerium sulphate: Studies with *Drosophila melanogaster* as a promising *in vivo* model. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 6, p. 749-759, 2015.
- ALMEIDA, P. M. et al. Genotoxic potential of the latex from cotton-leaf physicnut (*Jatropha gossypifolia* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 100, p. 93-100, 2015.
- ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.
- ANANTHAN, R.; SUBHASH, K.; LONGVAH, T. Capsaicinoids, amino acid and fatty acid profiles in different fruit components of the world hottest Naga king chilli (*Capsicum chinense* Jacq). **Food Chemistry**, v. 238, p. 51-57, 2018.
- ANDRADE, A. F. et al. *In vitro* cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity assessment of Solanum lycocarpum hydroalcoholic extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2786-2790, 2016.
- ANTONIO, A. S., et al. The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. **Royal Society Chemistry**, v. 8, p. 25767–25784, 2018.
- ASITA, O.; HEISI, D. H; TJALE, T. Modulation of Mutagen-Induced Genotoxicity by two Lesotho Medicinal Plants in *Allium cepa* L. **Environment and Natural Resources Research**, v. 5, n. 3, p. 37-55, 2015.
- ASNIN, L.; PARK, S. W. Isolation and analysis of bioactive compounds in *Capsicum* peppers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 254-289, 2015.
- AYRES M. et al. **BioEstat 5.3 - aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 5 ed., Sociedade Civil Mamirauá, 2007, 364p.
- BAE, H. et al. Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. **Food Chemistry**. v.134, p. 1912–1918, 2012.

BALAKRISHNAN, S. et al. Antigenotoxic Effects of Curcumin and Piperine Alone or in Combination Against 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene Induced Genotoxicity in Bone Marrow of Golden Syrian Hamsters. **Toxicology Mechanisms and Methods**. v.18, p. 691-696, 2008.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134-139, 2008.

BARBERO, G. F. et al. Capsaicinoid Contents in Peppers and Pepper-Related Spicy Foods. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 3, p. 485-493, 2016.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BHAT, S. A. et al. Genotoxicity monitoring of industrial wastes using plant bioassays and management through vermitechnology: A review. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 5, p. 325-337, 2017.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v.144, p.475-483, 2016.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.

BLEY, K. et al. A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 6, p. 847-873, 2012.

BONCIU, E. et al. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.

BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Editora Alaúde, 2007. 110p.

BRACHT, F; CONCEIÇÃO, G. C.; SANTOS, C. F. M. A América conquista o mundo: uma história da disseminação das especiarias americanas a partir das viagens marítimas do século XVI. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, n. 1, p. 11-16, 2011.

BROWN, K. C. et al. Capsaicin Displays Anti-Proliferative Activity against Human Small Cell Lung Cancer in Cell Culture and Nude Mice Models via the E2F Pathway. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p.1-5, 2010.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

CAETANO, B. F. R. et al. Capsaicin reduces genotoxicity, colonic cell proliferation and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**., v. 338, p. 93-102, 2018.

CARDOSO, V. DA S. et al. Antigenotoxic Effect of Piperine in Broiler Chickens Intoxicated with Aflatoxin B1. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 1-14, 2016.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 39-54. 2008.

ÇELIK, T. A.; ASLANTÜRK Ö. S. Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. **Biologia - Cellular and Molecular Biology**, v.61, n. 6, p. 693-697, 2006.

CHANTHAI, S. et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some chilli varieties using accelerated solvent extraction associated with solid-phase extraction methods and RP-HPLC-fluorescence. **E-Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 1550-1561, 2012.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235-263, 2017.

CHEN, D. et al. Capsaicin induces cycle arrest by inhibiting cyclin-dependent-kinase in bladder carcinoma cells. **International Journal of Urology**, v.19, n. 7, p. 662-668, 2012.

CHO, S. C.; LEE, H.; CHOI, B. Y. An updated review on molecular mechanisms underlying the anticancer effects of capsaicin. **Food Sci. Biotechnol.** v. 26, n. 1, p. 1-13, 2017.

CHOPRA, B. et al. Piperine and Its Various Physicochemical and Biological Aspects: A Review. **Open Chemistry Journal**, v. 3, n. 1, p. 75-96, 2017.

DAMETTO, A. C. et al. Chemical composition and *in vitro* chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) fruits and leaves. **Journal of Functional Foods**, v.36, p. 490-502, 2017.

DATTA, S. et al. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. **Sustainable Environment Research**, v. 28, n. 4, p. 171-178, 2018.

DI, X. et al., Effect of piperine on the bioavailability and pharmacokinetics of emodin in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 144-149, 2015.

DIAS, W. L. F. et al. Cytogenotoxic effect, phytochemical screening and antioxidant potential of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill leaves. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 30-35, 2019.

DOUCETTE, C. D. et al. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 231-239, 2013.

DUTTA, J.; AHMAD, A.; SINGH, J. Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. **Caryologia**, v. 71, n. 2, p. 139-145, 2018.



EREN, Y.; ÖZATA, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. **Rev. bras. Farmacogn.**, v.24, n.1, p.51-59, 2014.

FAGUNDES, G. E. et al. Effect of green juice and their bioactive compounds on genotoxicity induced by alkylating agents in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 80, n. 13-15, p. 756-766, 2017.

FATTORI, V. et al. Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 1-33, 2016.

FEDEL-MIYASATO L. E. S. et al. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: A comparative study. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 3411-3425, 2014.

FELICIDADE, I. et al. Mutagenic And Antimutagenic Effects Of Crude Hydroalcoholic Extract Of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) On Cultured. **Phytome**, v. 2, n. 1, 2014.

FELISBINO, K. et al. Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 83-88, 2018.

FENG, B. et al. 2-epi-2-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, p. 142-153, 2010.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. P. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1680-1686, 2009.

FERNANDEZ-BEDMAR, Z.; ALONSO-MORAGA, A. *In vivo* and *in vitro* evaluation for nutraceutical purposes of capsaicin, capsanthin, lutein and four pepper varieties. **Food and Chemical Toxicology**. v. 98, p. 89-99, 2016.

FISKESJO, G. *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

GHIASI, Z. et al. Enhancing analgesic and anti-inflammatory effects of capsaicin when loaded into olive oil nanoemulsion: an in-vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, p. 341-347, 2019.

GHODKI, B. M.; GOSWAMI, T.K. Effect of grinding temperatures on particle and physicochemical characteristics of black pepper powder. **Powder Technology**, v. 299, p. 168-177, 2016.

GHOSH, M. et al. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation. **Mutation Research**, v. 774, p. 49-58, 2015.

GIUFFRIDA, D. et al. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v.140, p.794-802, 2013.

GORGANI, L. et al. Piperine - The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p. 124-140, 2017.

GREENSHIELDS, A. L. et al. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 129-140, 2015.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from Piper: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 163-193, 2013.

HARIS, P. et al. Energetics, Thermodynamics, and Molecular Recognition of Piperine with DNA. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, p. 2644-2656, 2015.

HASSAN, M. H. et al. Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 5, p. 428-438, 2012.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, n. 1-2, p. 20-24, 2012.

HOSSAIN, M. D.; ROHMAN M.M.; FUJITA, M. Comparative investigation of glutathione S-transferases, glyoxalase-I and alliinase activities in different vegetable crops. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 10, p. 21-28, 2007.

HUANG, X. F. J. et al. Capsaicin and Its Analogues: Structure-Activity Relationship Study. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2661-2672, 2013.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706–716. 2001.

JEONG, H. J. et al. Identification of *Capsicum* species using SNP markers based on high resolution melting analysis. **Genome**, v. 53, n. 12, p. 1029-1040, 2010.

JIANG, Y. et al. Methyl methanesulfonate induces necroptosis in human lung adenoma A549 cells through the PIG-3-reactive oxygen species pathway. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 3785-3795.

KARAISSMAILOGLU, M. C. Assessments on the potential genotoxic effects of fipronil insecticide on *Allium cepa* somatic cells. **Caryologia**, v. 70, n. 4, p. 378-384, 2017.

KAUR, G. et al. Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involves DNA damage and disruption of oxidative metabolism. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 7, p. 1292-1304, 2014.

KAUR, R.; ARORA, S. Alkaloids-important therapeutic secondary metabolites of plant origin **Journal Critical Reviews**, v. 2, n. 3, p.1-8, 2015.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 45, p. 765–798, 2015.

KHANAM, S. et al. Protective effect of capsaicin against methyl methanesulphonate induced toxicity in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 4, p. 271-280, 2017.

KOLEVA, I. I. et al. Alkaloids in the human food chain – Natural occurrence and possible adverse effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.56 p.30-52, 2012.

KUMAR et al. Antiparasitic efficacy of piperine against *Argulus spp.* on *Carassius auratus* (Linn. 1758): *in vitro* and *in vivo* study. **Parasitology Research**, v.111, p.2071-2076, 2012.

LACKINGER, D.; EICHHORN, U.; KAINA, B. Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-Fos, p53 or both. **Mutagenesis**, v. 16, n. 3, p. 233-241, 2001.

LAI, L. et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. **Nature Publishing Group**, p. 523-530, 2012.

LEE, K. W.; BODE, A. M.; DONG, Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. **NATURE REVIEW, CANCER**, v. 11, p. 211-218, 2011.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEWINSKA, A. et al. Capsaicin-induced genotoxic stress does not promote apoptosis in A549 human lung and DU145 prostate cancer cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 779, p. 23-34, 2015.

LI, H. et al. Capsaicin and piperine can overcome multidrug resistance in cancer cells to doxorubicin. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 1-11, 2018.

LIMAN, R.; ACIKBAS, Y.; CIĞERCI, İ. H. Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by *Allium* and Comet tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 168, p. 408-414, 2019.

LIMAN, R.; HAKK, İ.; GÖKÇE, S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, n. April, p. 444-449, 2018.

LIN, C. H. et al. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 46, p. 1-9, 2013.

LIU, H.; LIGHTFOOT R.; STEVENS, J. L. Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidant of protein thiols. **Journal Biological Chemistry**, v. 271, p. 4805-4812, 1996.

LU, M. et al. Extraction, bioavailability, and bioefficacy of capsaicinoids. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 27-36, 2017.

LUO, X. J. et al. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **Europe Journal Pharmacology**. v. 650, p. 1-7. 2011.

MACÁKOVÁ, K. et al. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 134, p. 429-444, 2019

MANAYI, A. et al. Piperine as a Potential Anti-cancer Agent: A Review on Preclinical Studies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 37, p. 4918-4928, 2017.

MARQUES, J. V. Antifungal Activity of Natural and Synthetic Amides from *Piper* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.10, p.1807-1813, 2010.

MARQUES, S. et al. Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes. **Mutation Research**, v.517, p.39-46, 2002.

MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of carrageenan fiber in cultured meristematic cells of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9523–9532, 2014.

MAZZEO, D. E. C. et al. MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011

MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T. K. *Piper nigrum* and piperine: An update. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1121-1130, 2013.

MELO, A.; ALVES, M. Novos registros de espécies de *Piper* L. (Piperaceae) em estados da Amazônia brasileira. **Biota Amazônia**, v.9, n.1, p.26-30, 2019.

MENEZES, I. C. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae). **Conservation Genetics Resources**, v. 1, p. 209-212, 2009.

MGBEAHURUIKE, E. E. et al. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany** v.112, p. 54–69, 2017.

MUHAMMAD, A. et al. Spices with Breast Cancer Chemopreventive and Therapeutic Potentials: A Functional Foods Based-Review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 182-194, 2018.

NASEEMA, U. et al. Chemotherapeutic effect of piperine solid lipid nanoparticles against benzo (a) pyrene: Induced lung cancer in mice. **The Pharma journal Innovation**, v. 7, n. 2, p. 198-201, 2018.

NAVES, E. R., et al. Capsaicinoids: Pungency beyond *Capsicum*. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 2, p. 109-120, 2019.

OKWUTE, S. K.; EGHAREVBA, H. O. Piperine-Type Amides: Review of the Chemical and Biological Characteristics. **International Journal of Chemistry**. v. 5, n. 3, p. 99-122, 2013.

OUYANG, D. et al. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 424-430, 2013.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 5, 2016.

PANDA, B. B.; ACHARY, V. M. M. Mitogen-activated protein kinase signal transduction and DNA repair network are involved in aluminum-induced DNA damage and adaptive response in root cells of *Allium cepa* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 6, p. 1-10, 2014.

PANDEY, H.; KUMAR, V.; ROY, B. K. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 300-308, 2014.

PATIL, V. M.; DAS, S.; BALASUBRAMANIAN, K. Quantum Chemical and Docking Insights into Bioavailability Enhancement of Curcumin by Piperine in Pepper. **Journal of Physical Chemistry A**. v. 120, p. 3643-3653, 2016.

PATOWARY, P. et al. Research progress of capsaicin responses to various pharmacological challenges. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, n. 8, p. 1501-1512, 2017.

PÉREZ-CARREÓNA, J. I. et al. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. **Toxicology in vitro**. v. 16, p. 253-258, 2002.

PERRY, L. et al. Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Science**, v. 315, n. 5814, p. 986-988, 2007.

PERSSON, M. S. M. et al. The relative efficacy of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs and capsaicin in osteoarthritis: a network meta-analysis of randomised controlled trials. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 26, n. 12, p. 1575-1582, 2018.

PING, K. Y. et al. Genotoxicity of euphorbia hirta: An *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782-7791, 2012.

PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 18-25, 2016.

PROUDLOCK, R.; THOMPSON, C.; LONGSTAFF, E. Examination of the potential genotoxicity of pure capsaicin in bacterial mutation, chromosome aberration, and rodent micronucleus tests. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 5, p. 441-447, 2004.

QAIS, F. A. et al. Interaction of capsaicin with calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular modelling study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 392-402, 2017.

QIAN, K. et al. Capsaicin Suppresses Cell Proliferation, Induces Cell Cycle Arrest and ROS Production in Bladder Cancer Cells through FOXO3a-Mediated Pathways. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1-15, 2016.

QU, H. et al., Piperine: Bioactivities and Structural Modifications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 145-156, 2015.

RAGAZZO, P. et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. **Water Research**, v. 116, p. 44-52, 2017.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 390, n. 1-2, p. 121-127, 1997.

RATHER, R. A.; BHAGAT, M. Cancer chemoprevention and piperine: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, p.1-12, 2018.

RAZA, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. **The FEBS journal**, v. 278, n. 22, p. 4243-4251, 2011.

RÊGO, E. R. et al. **Produção, genética e melhoramento de pimentas (Capsicum spp.)**. Recife: Editora Imprima, 2011. 223p.

REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 576, p. 49-60, 2015.

REYES-ESCOGIDO, M. L. et al. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. **Molecules**, v. 16, p. 1253-1270, 2011.

RIBEIRO, D. et al. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**. v. 120, p.681-699, 2018.

ROBERTO, M. M. et al. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by *in vitro* study with HTC cells. **Toxicology in vitro**, v. 33, p. 9-15, 2016.

ROCHA et al. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical Biology**. v.54, n.1, p.35-47, 2016.

SÁ et al., *In vitro* and *in vivo* evaluation of enzymatic and antioxidant activity, cytotoxicity and genotoxicity of curcumin-loaded solid dispersions. **Food and Chemical Toxicology**. v.125, p.29-37, 2019.

SALAZAR, D. et al. Chemical similarity and local community assembly in the species rich tropical genus Piper. **Ecology**, v. 97, n. 11, p. 3176-3183, 2016.

SANDOVAL-CASTRO, C. J., et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in scalded Jalapenõ pepper industrial by product (*Capsicum annum*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 1-12, 2017.

SANTOS, C. F. M. et al. Das virtudes da ardência: uso e disseminação dos frutos de *Capsicum* nos séculos XVI e XVII. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciência Humana**, v. 8, n. 1, p. 59-75, 2013.

SANTOS, F. J. B. et al. Genotoxic and mutagenic properties of Bauhinia platypetala extract, a traditional Brazilian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**. v.144, n.3, p.474-482, 2012.

SATTARINEZHAD, E. et al. Piperine derivatives as potential inhibitors of Survivin: An in silico molecular docking. **Computers in Biology and Medicine**. v.63, p.219-227, 2015.

SHARMA, A.; et al. *Cuminum cyminum* Linn. and *Coriandrum sativum* Linn. extracts modulate Chromium genotoxicity in *Allium cepa* chromosomal aberration assay. **Nucleus**, v. 54, p. 99-105, 2011.

SHETTY, A. et al. Plant physiology and biochemistry exploration of acute genotoxic effects and antigenotoxic potential of gambogic acid using *Allium cepa* assay. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 118, p. 643-652, 2017.

SIDDIQUE, Y. H. et al. Protective effect of Luteolin against methyl methanesulfonate-induced toxicity. **Toxin Reviews**, p. 1-12. 2019.

SIDDIQUI, S. et al. Piperine triggers apoptosis of human oral squamous carcinoma through cell cycle arrest and mitochondrial oxidative stress. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 5, p. 791-799, 2017.

SILVA, F. D. B. et al. Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia ferrea* Mart. e *Caesalpinia pulcherrima* Sw. **Revista Brasileira Biociências**, v.13, n.2, p. 101-109, 2015.

SILVA, L. P. et al. Genotoxicity and antioxidant activity of spices and herbs used in brazilian cuisine. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 3, p. 727-743, 2018.

SINGH, A.; DUGGAL, S. Piperine- Review of Advances in Pharmacology Apoptosis inhibition. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 2, n. 3, p. 615-620, 2009.

SINGH, I. P.; CHOUDHARY, A. Piperine and Derivatives: Trends in Structure-Activity Relationships. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1722-1734, 2015.

SINGLETARY, K. Black pepper. **Farm and Forestry Production**, v. 45, n. 1, p. 43-47, 2010.

SOUTAR, D. A. et al. Piperine, a pungent alkaloid from black pepper, inhibits B lymphocyte activation and effector functions. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 466-474, 2017.

SRICHAROEN, P. et al. Phytochemicals in *Capsicum* oleoresin from different varieties of hot chilli peppers with their antidiabetic and antioxidant activities due to some phenolic compounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 629-639, 2017.

SWEAT, K. G, et al. Variability in capsaicinoid content and Scoville heat ratings of commercially grown Jalapeño, Habanero and Bhut Jolokia peppers. **Food Chemistry**, v. 210, p. 606-612, 2016.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Contamination**, 2012.

TEWKSBUURY, J. J. et al. Where did the chili gets its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, n.3, p.547-564, 2006.

THIEL, A. et al. Black pepper constituent piperine: Genotoxicity studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 350-357, 2014.

TOYODA-HOKAIWADO, N. et al. Modulatory Effects of Capsaicin on N-diethylnitrosamine (DEN)-induced Mutagenesis in Salmonella typhimurium YG7108 and DEN-induced Hepatocarcinogenesis in gpt Delta Transgenic Rats. **Genes and Environment**, v. 33, n. 4, p. 160-166, 2011.

TSOI, B. et al. Comparing antioxidant capacity of purine alkaloids: A new, efficient trio for screening and discovering potential antioxidants *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**. v.176, p.411-419, 2015.

TURKOGLU, S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 3, p. 224-230, 2012.

VELD, C. W. et al. Methyl methanesulfonate-induced hprt mutation spectra in the Chinese hamster cell line CHO9 and its xrcc1-deficient derivative EM-C11. **Mutation Research**, v. 398, n. 1-2, p. 83-92, 1998.

VENTURA-CAMARGO, B. C. et al. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells. **Environmental & Analytical Toxicology**. v. 1, n. 3, p. 1-12, 2011



VIRGILI, F.; MARINO, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**. v.45, p.1205-1216, 2008.

VURMAZ, A. et al. Antioxidant effects of piperine in in-vivo chick embryo cataract model induced by steroids. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 1-26, 2019.

WANG, R. et al. Involvement of metabolism-permeability in enhancing the oral bioavailability of curcumin in excipient-free solid dispersions co-formed with piperine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 561, p. 9-18, 2019.

WANG, X. R. et al. Capsaicin-loaded nanolipoidal carriers for topical application: Design, characterization, and *in vitro/in vivo* evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3881-3898, 2017.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

WONGPA, S. et al. Antimutagenic effects of piperine on cyclophosphamide induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 8, n. 4, p. 623-627, 2007.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks, **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 12, p.1580-1594, 2006.

YAFFE, P. B. et al. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 1, p. 109-114, 2013.

YEGGONI, D. P. et al. Cytotoxicity and Comparative Binding Mechanism of Piperine with Human Serum Albumin and  $\alpha$ -1-Acid Glycoprotein. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**. v. 15 n. 17, 2015.

YILMAZ, N. et al. Electrochemical detection of interaction between capsaicin and nucleic acids in comparison to agarose gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 56-62, 2017.

ZEIGER, E. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. **Mutation Research**, v. 543, p. 191-194, 2003.

ZHANG, J. et al. International Immunopharmacology Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2 / -9 expression. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 50-58, 2015.

ZHANG, Z. X. et al. Discovery of putative capsaicin biosynthetic genes by RNA-Seq and digital gene expression analysis of pepper. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

ZHENG, J. et al. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 1-35, 2016.