

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Efeitos da Piperina em Frangos de corte**  
**(*Gallus gallus*) com Intoxicação Experimental por**  
**Aflatoxinas**

**Verônica da Silva Cardoso**

**2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**VETERINÁRIA**

**EFEITOS DA PIPERINA EM FRANGOS DE CORTE**  
*(Gallus gallus)* **COM INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR**  
**AFLATOXINAS**

**VERÔNICA DA SILVA CARDOSO**

*Sob a Orientação da professora*

**Dra. Gloria Maria Direito**

*e Co-orientação da professora*

**Dra. Maria das Graças Danelli**

**Dissertação submetida como**  
**requisito parcial para obtenção do**  
**grau de Mestre em Ciências em**  
**Microbiologia Veterinária.**

**2007**

636.513

C268

T

Cardoso, Verônica da Silva, 1978-

**Efeitos da piperina em frangos de corte (*Gallus gallus*) com intoxicação experimental por aflatoxinas / Verônica da Silva Cardoso. – 2007.**

47 f. : il.

Orientadora: Glória Maria  
Direito.

Dissertação (mestrado) –  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Instituto de  
Veterinária.

Bibliografia: f. 35-41.

1. Frango de corte - Teses. 2.  
Aflotoxina - Teses. 3. Toxicologia  
experimental - Teses. I. Direito,  
Glória Maria, 1961. II.  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Instituto de  
Veterinária. III. Título.

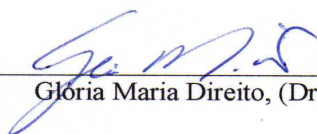


**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
VETERINÁRIA**

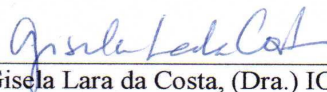
**VERÔNICA DA SILVA CARDOSO**

Dissertação submetida ao curso de Pós- graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, em 5 de março de 2007.

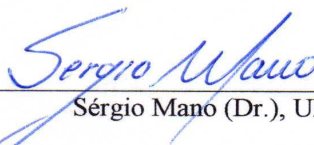
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/03/2007



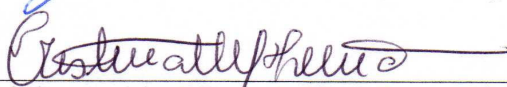
Glória Maria Direito, (Dra.) UFRRJ



Gisela Lara da Costa, (Dra.) IOC, FIOCRUZ



Sérgio Mano (Dr.), UFF



Cristina Amorim Ribeiro de Lima (Dra.), UFRRJ

## DEDICATÓRIA

“Aos meus grandes amores,  
minha filha **Juliana Cardoso de  
Carvalho** e meu esposo **André  
de Carvalho** por todo amor,  
incentivo e compreensão. Amo  
muito vocês !!!”

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais queridos **Luzia da Silva Cardoso** e **Sebastião Junqueira Cardoso**, por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio sentimental e por estarem sempre disponíveis a ajudar, por acreditarem em suas filhas e investirem na educação, acreditando que o maior bem que poderiam deixar seria o conhecimento.

À minha irmã **Carolina da Silva Cardoso** e Cunhado **Cid Pinheiro Junior** que compartilharam comigo momentos difíceis e divertidos.

A minha grande amada tia **Maria Pereira Ribeiro** por toda ajuda e afeto, aos meus primos queridos **Marta Pereira Ribeiro** e **Leonardo Tadeu Machado**, por sempre estarem presentes em minha vida e por todo apoio depositado para realização deste projeto.

Aos meus avós maternos **Lourdes Pereira da Silva** e **José Coelho da Silva** que sempre estiveram junto a mim em pensamento e oração. Agradeço por todas as conversas e pelo grande carinho e amor com que sempre me trataram.

A minha sogra **Nilza Matioli de Carvalho**, ao meu sogro **Celso Rossi de Carvalho**, meu cunhado **Celso Rossi de Carvalho Junior** por me ajudarem com mais esta etapa em minha vida, por todo apoio e incentivo.

As minhas queridas orientadoras **Gloria Maria Direito**, **Maria das Graças Danelli**, **Cristina Amorim Ribeiro Lima** as quais possuo profunda admiração e respeito, pelo grande incentivo, paciência, pelos ensinamentos, confiança e carinho, ao qual devo todo meu aprendizado.

Ao meu eterno orientador professor **Walter Lilenbaun**, por quem tenho imensa gratidão e admiração, pelo grande incentivo em continuar na vida acadêmica.

As amigas e companheiras de mestrado **Antônia Regina Sessa da Silva**, **Cléia Maria Monteiro da Cunha**, **Geisi Ferreira Marine**, **Lidiane de Castro Soares** e **Thalita Gagini Braga**.

Aos amigos aqui conquistados **Raquel Silva Lisbôa**, **Vanessa de Almeida Raia**, **Daniel da Silva Guedes Junior**, **Ingrid Annes Pereira**, **Fabiana de Albuquerque Agrello**, **Isabela Silva de Castro**, **Robson Ernesto da Silva**, **Rodrigo Alcântara de Carvalho**.

Aos professores **Carlos Mazur e Sierberth do Nascimento Brito** pela convivência agradável no Laboratório.

Ao professor **Marcelo Elias Fraga** pelas conversas produtivas e pelo incentivo na realização de deste projeto.

Ao professor **Walter Leira Teixeira Filho e Carlos Wilson Gomes Lopes** pela grande ajuda e incentivo imprescindíveis na realização de uma das etapas do projeto para realização deste projeto.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, pelos ensinamentos transmitidos e profissionalismo.

Aos funcionários e amigos do Projeto Sanidade Animal e do Instituto de Veterinária, **Joselita Teodora de Jesus, Luís Jorge Soares, Adevaldo José Gonçalves, Joel Teodosio de Oliveira, Marli Balbino de Oliveira, Valcir de Oliveira Pires**, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto.

Ao Departamento de Produção Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial ao **Setor de Avicultura** pela colaboração e constante incentivo.

À **CAPES** pela concessão de bolsa durante o período de Mestrado.



## **BIOGRAFIA**

**Verônica da Silva Cardoso**, filha de Sebastião Junqueira Cardoso e Luzia da Silva Cardoso, nascida em 14 de dezembro de 1978, em Campo Grande, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário, ensino fundamental e ensino médio no Colégio Belisário dos Santos em Campo Grande.

No ano de 1998 ingressou no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Fluminense (UFF), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 2003.

Durante o período acadêmico foi Monitora de Bacteriologia no Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, UFF em 2001 e posteriormente Bolsista de Iniciação Científica do Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) no período agosto 2001 a julho de 2003 sob a orientação do professor Dr. Walter Lilenbaum, onde pode desenvolver projetos na área de Bacteriologia.

Em 2005 foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária desta Instituição, sob a orientação da Professora Dra. Gloria Maria Direito e co-orientação da Professora Dra. Maria das Graças Miranda Danelli, onde foi bolsista de pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de março de 2005 até o presente momento.

Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 01.** Estrutura molecular das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (HUSSEIN; BRASEL, 2001). 04
- Figura 02.** Estrutura molecular da piperina (BAJAD et al., 2002). 09
- Figura 03.** Registro fotográfico, A- Interior do galpão 3 (Setor de Avicultura do IZ/UFRRJ); B- Chegada dos pintos, com 1 dia de idade, C- Interior da fábrica de ração (IZ/UFRRJ); D- Interior da fábrica de ração (IZ/UFRRJ); E- Pintos com 3 dias de idade, dentro do círculo de proteção com uma campânula central, segundo ensaio; F- Procedimento de administração oral das substâncias utilizadas no experimento, pintos com 8 dias de idade. 18
- Figura 04.** Efeito da piperina sobre a leucopenia induzida através da intoxicação de frangos de corte com aflatoxinas. 28
- Figura 05.** Efeito da piperina (2,25 mg kg<sup>-1</sup>) nos valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos 29

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 01.</b> Delineamento experimental do ensaio de avaliação dos efeitos da associação piperina e aflatoxinas.	15
<b>Quadro 02.</b> Escores de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão apresentado.	17

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b>	Médias e desvios padrões da influência da administração oral de diferentes concentrações de piperina, em frangos de corte, sobre o ganho médio de peso, consumo médio de ração, conversão alimentar, peso médio do fígado/ kg de peso vivo aos 21 dias de idade.	19
<b>Tabela 02.</b>	Médias e desvios padrões dos valores médios do hemograma avaliados em função das diferentes doses de piperina após 14 dias do primeiro ensaio.	21
<b>Tabela 03.</b>	Valores médios e desvios padrões do leucograma avaliados em função das diferentes doses de piperina após 14 dias de experimentação.	22
<b>Tabela 04.</b>	Médias e desvios padrões da influência sobre o ganho médio de peso, consumo médio de ração, conversão alimentar e peso médio do fígado (g/kg de peso vivo) da administração oral de piperina na intoxicação prolongada de aflatoxinas, em frangos de corte.	23
<b>Tabela 05.</b>	Escores das lesões histopatológicas observadas no fígado(F), proventrículo (PV), duodeno (D) da administração oral de piperina em uma intoxicação prolongada de aflatoxinas (por 13 dias consecutivos), em frangos de corte.	24
<b>Tabela 06.</b>	Médias e desvios padrões da influência da administração oral de piperina em frangos de corte intoxicados com aflatoxinas, sobre o hemograma.	26
<b>Tabela 07.</b>	Médias e desvios padrões do leucograma avaliados em função da associação de aflatoxinas com piperina.	27

## RESUMO

CARDOSO, Verônica da Silva. **Efeitos da piperina em frangos de corte (*Gallus gallus*) com intoxicação experimental por aflatoxinas.** 2007. 47p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Este trabalho teve como objetivo analisar a interferência da administração da piperina em frangos de corte com intoxicação prolongada por aflatoxinas. O experimento foi realizado em duas fases: (i) os frangos foram separados em quatro grupos teste (n=15 aves/ grupo), que receberam diferentes concentrações de piperina (1,12; 2,25 e 4,5mg/kg por via oral/14 dias), e um grupo controle, que foi inoculado apenas com o veículo; (ii) os frangos foram separados em 3 grupos (n=15 aves/grupo), um grupo que recebeu apenas piperina (2,25 mg/kg), um grupo que recebeu apenas aflatoxinas (2,0 mg/kg) e outro grupo recebeu piperina (2,25 mg/kg) em associação com aflatoxinas (2,0 mg/kg), todos por via oral/ 14 dias. Ao final do experimento, os frangos foram abatidos e avaliados quanto aos índices de produtividade, parâmetros hematológicos e parâmetros histopatológicos de todo trato digestório. Os resultados obtidos na primeira fase mostraram que a piperina, nas doses empregadas, não interferiu nos índices de produtividade ou nos valores de hematócrito, hemoglobina, fibrinogênio e número de hemácias, com exceção das doses mais elevadas de piperina, as quais foram capazes de promover um aumento na contagem total de leucócitos. A dose de 2,25 mg/kg de piperina não foi tóxica ou imunossupressora e as lesões histopatológicas observadas foram dose dependente. Na segunda fase do experimento, observou-se que de acordo com os índices de produtividade, o grupo que recebeu piperina em associação com aflatoxinas obteve melhor desempenho comparativamente com aqueles que receberam apenas aflatoxinas. A piperina na concentração de 2,25 mg/kg reduziu de forma significativa à imunossupressão e as lesões histopatológicas causada pelas aflatoxinas. Desta forma, pode-se sugerir que a piperina interfere de forma positiva na intoxicação de frangos de corte por aflatoxinas, diminuindo seus efeitos tóxicos.

**Palavras chave:** Aflatoxinas, Piperina, Frangos de corte.

## ABSTRACT

CARDOSO, Verônica da Silva. **Effects of the piperine in broiler chickens (*Gallus gallus*) with experimental aflatoxins intoxication.** 2007. 47p. Dissertation (Master's degree in Veterinary Microbiology). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The aim of the present study was to analyze the interference of the administration of piperine in broiler chickens with prolonged aflatoxins intoxication. The experiment was accomplished in two phases: (i) the chickens were separate in four groups test (n=15 broilers / I group), that received different piperine concentrations (1.12, 2.25 and 4.5mg/kg orally/14 days), and a control group, that was only inoculated with the vehicle; (ii) chickens were separate in 3 groups (n=15 broilers/group), a group that received only piperine (2.25 mg/kg), a group that received aflatoxins only (2.0 mg/kg) and another group that received an association of piperine (2.25 mg/kg) and aflatoxins (2.0 mg/kg), all orally / 14 days. At the end of the experiment, the chickens were slaughtered and productivity indexes, hematological parameters and histopathological parameters of every digesting tract were evaluated. The results obtained in the first phase showed that the piperine, in the employed doses, didn't interfere in the productivity indexes nor in the result of the values of hematocrit, hemoglobin concentration, fibrinogen and erythrocyte counts, except for the highest doses of piperine, which were capable to promote an increase in the total counting of the white blood cells. The dose of 2.25 piperine mg/kg was not toxic or had and the histopathological lesions observed were dose-dependent. In the second phase of the experiment, it was observed that the productivity indexes in the group that received the association piperine and aflatoxins obtained better performing comparatively with those that just received aflatoxins. The piperine in the concentration of 2.25 mg/kg reduced in a significant way the immunosuppressor activity and the histopathological lesions caused by the aflatoxins. It can be suggested that piperine interferes in a positive way, reducing the toxic effects of the aflatoxins intoxication in broiler chickens.

Keywords: Aflatoxins, Piperine, Broiler Chickens.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. OBJETIVOS.</b>	02
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	03
3.1. Micotoxicoses	03
3.1.1. Ocorrência das micotoxinas.	03
3.1.2. Aflatoxinas	04
3.1.3. Propriedades físicas e químicas das aflatoxinas	05
3.1.4. Absorção e biotransformação das aflatoxinas.	05
3.1.5. Efeitos biológicos e toxidez das aflatoxinas	05
3.1.6. Hematologia aviária e aflatoxicoses	08
3.2. Piperina	09
3.2.1. Biotransformação e excreção da piperina	09
3.2.2. Mecanismo de ação da piperina	10
3.2.3. Biodisponibilidade promovida pela piperina	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	12
4.1. Aves e Manejo	12
4.2. Padrões de Aflatoxinas	13
4.3. Obtenção e Preparação das Soluções de Piperina	13
4.4. Obtenção e Preparo das Soluções das Aflatoxinas	13
4.5. Material Biológico para Análise	14
4.6. Delineamento Experimental	14
4.6.1. Ensaio com diferentes concentrações de piperina	14
4.6.2. Ensaio para avaliação dos efeitos da piperina na toxidez das aflatoxinas	14

4.7. Metodologia de Avaliação dos Experimentos	15
4.7.1. Índices de produtividade	15
4.7.2. Análises hematológicas	15
4.7.3. Coleta dos órgãos e anatomopatologia	16
4.7.4. Processamento histológico	16
4.8. Análise Estatística	17
<b>5. RESULTADOS</b>	17
5.1. Ensaio de Avaliação dos Efeitos de Diferentes Concentrações de Piperina	19
5.1.1. Índices de produtividade	19
5.1.2. Avaliação histológica	20
5.1.3. Análises hematológicas	20
5.2. Avaliação da Ação da Piperina na Toxidez das Aflatoxinas	23
5.2.1. Índices de produtividade	23
5.2.2. Avaliação histológica	23
5.2.3. Análises hematológicas	25
<b>6. DISCUSSÃO</b>	28
<b>7. CONCLUSÕES</b>	34
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	35
<b>ANEXOS</b>	42



## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira vem evoluindo nos últimos anos, com técnicas de criação e manejo que proporciona o abate das aves em menos tempo, com maior peso e menor custo. O nível tecnológico alcançado pela avicultura industrial nacional colocou a atividade em posição privilegiada em relação a outras no cenário da pecuária brasileira, com um nível de produtividade que vem permitindo ao país se manter como um dos maiores produtores e exportadores mundiais de carne de frango no ano de 2006. Entretanto, perdas com micotoxicoses, pela contaminação das rações para aves, e o processo crônico de intoxicação têm sido identificados, onde as aflatoxicoses são responsáveis por enormes prejuízos econômicos decorrentes da utilização de alimentos contaminados por estas substâncias tóxicas. Os aspectos econômicos estão diretamente relacionados à piora na conversão alimentar, no ganho de peso, elevadas taxas de morbidade e mortalidade.

Considerando que todo o desequilíbrio no mecanismo imunológico pode conduzir a uma patologia, a exposição a substâncias que interferem no sistema imune são sempre de grande interesse para a comunidade científica. Deste modo, estudos com produtos naturais potencialmente imunomodulatórios vêm sendo estabelecidos. Há um grande interesse no emprego de substâncias naturais na produção animal, principalmente se tais substâncias não produzem resíduos detectáveis em seus derivados (carne, ovos, leite). A idéia é utilizar substâncias naturais como componente nas rações, visando aumentar a resistência do organismo animal contra diversas doenças, intoxicações e adversidades ambientais.

Desta forma, a piperina tem sido alvo de pesquisas, por ser um produto natural facilmente isolado, em grande quantidade, a partir da pimenta do reino preta (*Piper nigrum* Linn.), por apresentar efeitos biológicos relevantes e ser rapidamente eliminada. Estudos desenvolvidos em mamíferos comprovaram suas atividades biológicas, como sua ação inibidora sobre os efeitos tóxicos da aflatoxina, que contribuíram para o crescente interesse do estudo sobre esta substância. A capacidade da piperina em diminuir significativamente a imunossupressão, poderia melhorar a resposta imunológica das aves (frangos de corte), sabidamente prejudicada por ação das aflatoxinas.

A introdução da piperina na ração de frangos de corte em experimentos futuros poderia proporcionar melhorias na produtividade das aves ao diminuir os efeitos prejudiciais da intoxicação por aflatoxinas.

A possibilidade da utilização da piperina na produção de aves, como um agente protetor contra aflatoxicoses desperta grande expectativa, principalmente pelos resultados significativos demonstrados em outras espécies.

## **2 OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo verificar se a administração de piperina em frangos de corte diminui os efeitos de uma intoxicação prolongada por aflatoxinas, e contribuir para o conhecimento da atividade modulatória da piperina sobre a intoxicação de frangos de corte, na fase inicial de crescimento com aflatoxinas. Desta forma buscou-se:

1. Determinar a ação de diferentes doses de piperina sobre os parâmetros hematológicos de frangos de corte;
2. Analisar os efeitos das diferentes doses de piperina através de exames histopatológicos;
3. Avaliar a influência da piperina sobre o efeito tóxico das aflatoxinas em frangos de corte.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Micotoxicoses**

Micotoxicose é o nome dado às doenças causadas pela ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos (micotoxinas) que afeta tanto os animais quanto o homem. Existem algumas centenas de tipos de micotoxinas, sendo a toxidez, a frequência de ocorrência e os órgãos alvos, consideravelmente variados em relação a cada toxina (HOERR, 1991; MOSS, 1996).

A natureza tóxica das micotoxinas para aves foi primeiramente observada em 1960, na Inglaterra, quando ocorreu a morte de mais de cem mil perus (BLOUNT, 1961). Estudos revelaram que o agente causal era uma micotoxina presente na farinha de amendoim que fazia parte da ração das aves (ALCROFT et al., 1961).

As micotoxinas são geralmente encontradas em concentrações baixas em grãos contaminados por fungos toxígenos e poucas vezes são observados índices muito elevados. Por isso os casos agudos que apresentam sintomatologias e alterações anatomopatológicas evidentes são menos frequentes, predominando os efeitos crônicos que não despertam a atenção do clínico. Menos evidentes, porém mais significativos do ponto de vista econômico, são as perdas devido às intoxicações subagudas causadas por baixos níveis da toxina, que mesmo em baixos níveis interferem na resposta imunológica (CRUZ, 1995; SANTURIO, 2000).

#### **3.1.1 Ocorrência das micotoxinas**

A presença de micotoxinas em grãos é frequente, sendo extremamente difícil impedir totalmente esta ocorrência (WOOD, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002). Além disso, determinam prejuízos à saúde animal e à economia em relação a animais de produção, e normalmente não são correlacionados com a ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas (CRUZ, 1995; SANTURIO, 2000).

As principais condições que favorecem o desenvolvimento de fungos no armazenamento tanto de grãos quanto de alimentos são: temperatura, umidade dos grãos, pH, taxa de oxigenação, período prolongado de armazenamento, grau de contaminação, condições físicas dos grãos (LILLEHOJ, 1973).

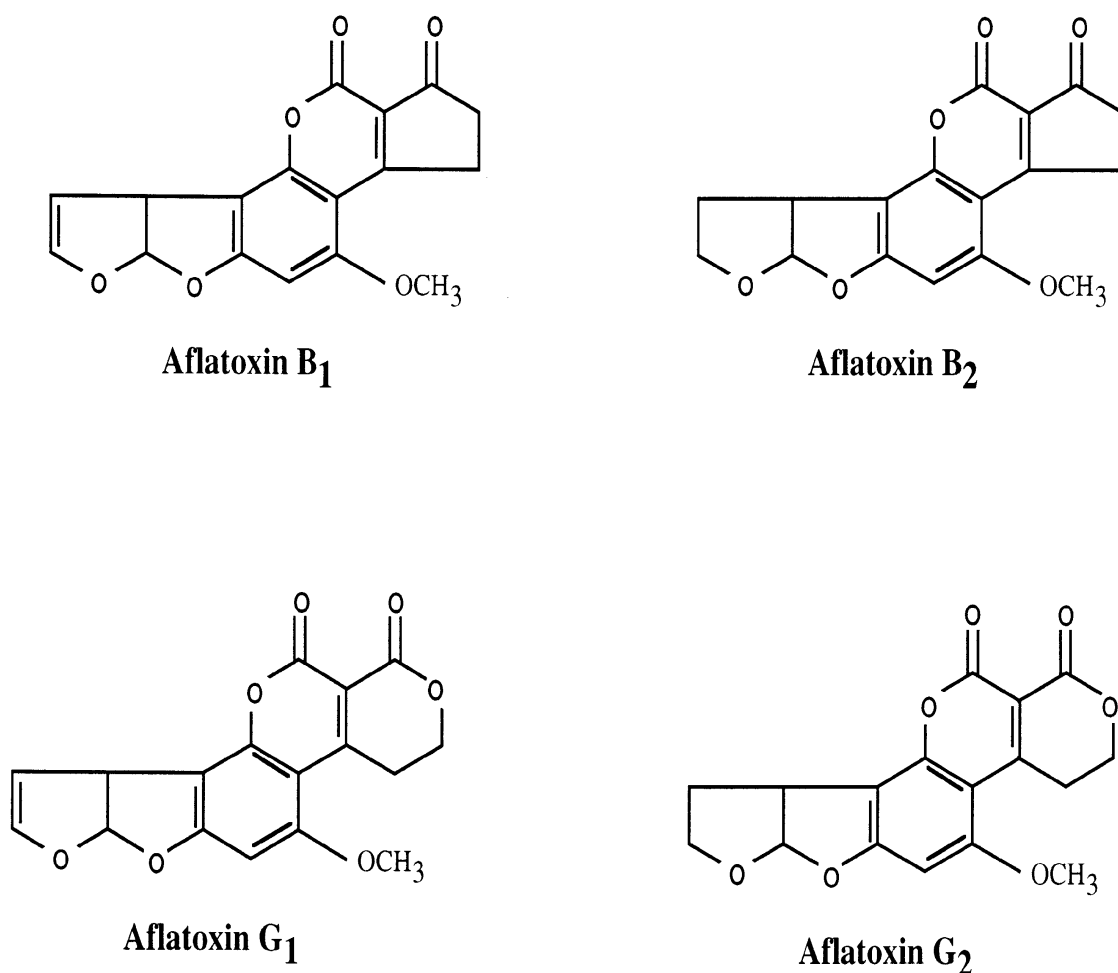
Dentre as micotoxinas de maior importância destacam-se as aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), por serem as mais tóxicas e por serem produzidas em grãos e alimentos (MORAES, 2004).

Constantemente são divulgados dados que confirmam a presença frequente de aflatoxinas em alimentos, para consumo humano e em rações animais, com concentrações variadas e eventualmente elevadas. Entretanto em muitos destes levantamentos foram detectadas concentrações baixas, que acarretam quadros sub-clínicos (SABINO, 1980, 1990; BALDISSERA et al., 1992; RIBEIRO et al., 2000; SANTURIO, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

### 3.1.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (MOSS, 1996). A ocorrência e produção de aflatoxinas estão associadas à presença e crescimento de fungos toxígenos, comuns em países de clima tropical e subtropical, principalmente quando produtos agrícolas tais como milho, amendoim, castanha, amêndoa, noz, pistache e constituintes de ração são armazenados em condições inadequadas de umidade e temperatura (SABINO, 1980; POHLAND; WOOD, 1987).

Cerca de 18 compostos similares são classificados como aflatoxina, porém, somente as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 1) apresentam importância toxigênica conhecida (OMS, 1983). Várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido (HUSSEIN; BRASEL, 2001).



**Figura 01.** Estrutura molecular das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

### **3.1.3. Propriedades físicas e químicas das aflatoxinas**

Biossinteticamente as aflatoxinas são bisfuranocumarinas, derivadas de decacetídeos (SMITH; ROSS, 1991). Essas micotoxinas são moléculas de baixo peso molecular, com grande similaridade estrutural, recebem a designação B ou G devido à propriedade de emitirem coloração azul (blue= B) ou verde-azulada (green= G) sob luz ultravioleta (ASAO et al., 1963). Do ponto de vista químico, são cumarinas termorresistentes, pouco solúveis em água, e bastantes solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares como clorofórmio, metanol, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO), e quando secas apresentam ponto de fusão de 269°C. As aflatoxinas quando dissolvidas em solventes polares, são instáveis à ação de luz ultravioleta, agentes oxidantes, ou a condições extremas de pH (< 3 e > 10), mas são degradadas facilmente através da reação com amônia ou hipoclorito de sódio (IARC, 1993).

### **3.1.4 Absorção e biotransformação das aflatoxinas**

Em frangos de corte, as aflatoxinas são rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal. Uma vez absorvida, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é imediatamente ligada, de forma reversível, à albumina e, em menor escala, a outras proteínas. Formas de aflatoxinas ligadas e não ligadas a proteínas séricas espalham-se pelos tecidos, especialmente o fígado (WYATT, 1991; SANTURIO, 2000).

Ao atingir o fígado são biotransformadas pelo sistema microsomal hepático por enzimas do citocromo P-450. Como parte do processo de detoxificação são formados biotransformados, como AFB<sub>2a</sub> e 8,9-epóxido AF, estes são reativos e se ligam de forma covalente, com constituintes intracelulares, incluindo DNA e RNA. Além disso, alteram a síntese de proteínas no tecido hepático, comprometendo o funcionamento do fígado. Tal fato acarreta uma profunda alteração nas propriedades funcionais e na síntese das proteínas das aves (WYATT, 1991).

A biotransformação da AFB<sub>1</sub>, particularmente, tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica. Clifford e Rees (1996) demonstraram que após uma hora da ingestão da aflatoxina, já há inibição da síntese protéica, fato que sugere que a toxina entra no núcleo do hepatócito, une-se ao DNA e deste modo inibe a síntese de DNA-polimerase e reduz a síntese de RNA-mensageiro.

Existe atualmente consenso, entre grande parte dos especialistas, de que a AFB<sub>1</sub> é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (IARC, 1993).

### **3.1.5 Efeitos biológicos e toxidez das aflatoxinas**

Patologias diversas podem decorrer da exposição às aflatoxinas, com intensidade e características dependentes de fatores como concentração e período de exposição à toxina. Em função destes, podem ser observados efeitos agudos, subagudos e crônicos (LAZZARI, 1993; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A aflatoxina B<sub>1</sub> é a que apresenta o maior poder toxígeno, seguida pela G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> (LESSON et al., 1995). As aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente a ingestão de alimentos contaminados (IARC, 1993).

Os efeitos mais comuns observados em aves nas intoxicações crônicas por aflatoxinas se manifestam por uma acentuada redução na produtividade, caracterizado por diminuição da velocidade de crescimento e da eficiência alimentar, provocados pela redução do metabolismo protéico e menor absorção de gorduras (WYATT, 1991; WEIBIKING et al., 1994; CRUZ, 1995; CLIFFORD; REES, 1996). A aflatoxicose crônica caracteriza-se microscopicamente pela degeneração dos hepatócitos com presença de figuras de mitose, a qual pode estar circundada por ductos biliares proliferados e tecido fibroso (HOERR, 1991).

As aflatoxicoses agudas e subagudas não são relatadas comumente sendo caracterizadas por desordens hepáticas, prostração, anorexia e, dependendo da dose ingerida, alta mortalidade (LEESON et al., 1995). Os achados histopatológicos da aflatoxicose aguda pode revelar degeneração gordurosa, necrose, aumento do núcleo dos hepatócitos com marginalização da cromatina e nucléolo proeminente; é comum observar-se uma rápida proliferação dos ductos biliares. Os rins apresentam lesões semelhantes à glomerulonefrite e os pulmões podem apresentar congestão (MORAES, 2004).

Ortatali et al. (2004), observaram frangos de corte intoxicados com 100µg de aflatoxinas/kg de ração ao final de 42 dias e constataram que os fígados apresentaram lesões significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparados com um grupo controle. As principais alterações encontradas foram: degeneração hidrófica e vacúolos de gordura nos hepatócitos centrolobulares.

A degeneração gordurosa hepática e proliferação dos ductos biliares causadas por aflatoxinas induzem diversas alterações séricas (FERNANDEZ et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1997).

Com relação a diferenças de susceptibilidade às aflatoxinas, em função do sexo e da idade animal em qualquer espécie, encontraram-se evidências de maior sensibilidade nos indivíduos mais jovens e que os machos apresentam maior sensibilidade à ação da toxina do que as fêmeas, aparentemente por envolvimento de fatores hormonais (GURTOO; MOTYCKA, 1976).

Ao estudarem o efeito da administração crônica de Aflatoxina B<sub>1</sub>, sobre as enzimas de biotransformação hepática de coelhos, Guerre et al. (1996), observaram a diminuição do ganho de peso destes e análises bioquímicas dos componentes do plasma revelaram hepatotoxicidade, dose dependente, caracterizada por lise celular e colestase. Os autores também evidenciaram uma maior diminuição do total de enzimas pertencentes à família do citocromo P-450 hepático no grupo que recebeu a maior dose de aflatoxina (0,10 mg/kg), que o grupo que recebeu 0,05 mg/kg de AFB<sub>1</sub>, o qual apresentou apenas a diminuição de algumas isoenzimas.

Os efeitos negativos destas micotoxinas, no desempenho de frangos de corte, foram demonstrados em um estudo onde as aves foram alimentadas com altos níveis (3.5 mg/kg de alimento) de uma mistura de aflatoxinas (79% AFB<sub>1</sub>, 16% AFG<sub>1</sub>, 4% AFB<sub>2</sub> e 1% AFG<sub>2</sub>). Resultando na redução do peso corporal e aumento dos pesos do fígado e rins destas aves (SMITH; ROSS, 1991).

Especificamente com frangos de corte, os efeitos das aflatoxinas mostraram-se notadamente maiores na fase inicial de crescimento. Os animais foram intoxicados experimentalmente, recebendo aflatoxinas apenas nos primeiros 21 dias, demonstraram perdas irreversíveis no ganho de peso até o abate, onde os efeitos na produtividade se

mantiveram, mesmo com a dieta isenta de toxinas na fase final (HUFF et al., 1986; MARIANI, 1998).

Quezada et al., (2000), avaliaram os efeitos da aflatoxina B<sub>1</sub> administrada na ração (0,5, 1,0, 2,0 µg/g de ração/dia) de frangos de corte até os 28 dias de idade das aves e observaram alterações na peso relativo e na concentração de proteínas encontradas no fígado e no rim, com severas alterações no metabolismo e na atividade secretora desse órgãos.

Entre os principais sinais clínicos e alterações patológicas observadas nas aves com aflatoxicose destacam-se uma acentuada lesão hepática, a presença de pequenas hemorragias, especialmente nos músculos do peito, anorexia, redução do ganho de peso e da produção de ovos, diminuição da velocidade de crescimento, deficiências imunológicas, carcinogênese, mutagênese e teratogênese (GROOPMAN et al., 1980; CAST, 1989; CRUZ, 1995).

Em frangos de corte, os efeitos negativos causados pelas aflatoxinas, estão intimamente relacionados à imunossupressão afetando a Bursa de Fabricius, timo, baço além da medula óssea reduzindo conseqüentemente o parênquima desses órgãos e os respectivos pesos levando a baixas respostas vacinais e ao surgimento de doenças inespecíficas. Ao alterar a Bursa de Fabricius, se alteram os fatores humorais de defesa, registrando-se, por outro lado, alterações nos padrões da resposta celular, com a involução do timo. Quando esta toxina está presente, se observa redução da atividade imunológica seja por prejudicar o sistema complemento, por diminuição da quantidade de imunoglobulinas, decréscimo da atividade fagocítica e linfocitária, ou por outras reações inespecíficas. Os efeitos da depressão imunológica tendem a ser temporários, ou seja, somente ocorrem durante o período de exposição, não existindo, portanto efeitos residuais após a retirada da dieta contaminada (BORDIN, 1995).

No sistema gastrointestinal, podem ser observadas alterações como diarréia e hemorragia intestinal, atrofia de vilosidades, necrose e fibrose. No sistema cutâneo observa-se icterícia, conseqüente a desordem hepática. No sistema cardiovascular, leva a fragilidade vascular com conseqüente hemorragia em diversos órgãos. No sistema reprodutor, podem ser observadas embriotoxicidade e teratogenia. No sistema endócrino, as alterações ocorrem nas glândulas adrenais, observando-se aumento do volume e necrose (CRUZ, 1995).

A síntese de lipídeos no fígado é gravemente afetada pela ação da AFB<sub>1</sub> devido à inibição da produção das enzimas responsáveis pela síntese e alongação de ácidos graxos no fígado. A síntese de gordura nas aves ocorre praticamente apenas no fígado; ao contrário dos mamíferos, as aves não sintetizam lipídeos no tecido adiposo. Além disso, a produção de bile aumenta, onde esta se encontra muito diluída e com baixas concentrações de sais biliares. Isso reduz sua função normal de ativar as lipases no intestino e auxiliar na digestão como redutora da tensão superficial e agente saponificador das gorduras e outras macromoléculas. Por causa disto, ocorre uma importante redução na absorção de gorduras, trazendo ainda como conseqüência, uma redução no processo de absorção de vitaminas lipossolúveis (VIEIRA, 1995).

Giacomini et al. (2006), observaram que o coração, fígado e as carcaças de frangos de corte intoxicados, apresentavam um aumento significativo de peso e dos demais órgãos como o baço, moela. As carcaças coletadas durante as análises anatomopatológicas realizadas ao final do experimento com 42 dias de idade, não apresentaram diferenças

significativas ( $p>0,05$ ) do peso da carcaça em relação ao peso vivo. Os autores também demonstraram que estas aves apresentaram diminuição de consumo de ração, ganho de peso e que apresentaram falta de uniformidade.

### **3.1.6 Hematologia aviária e aflatoxicoses**

O uso da hematologia e da química sanguínea representa uma ferramenta de grande utilidade para estabelecer um diagnóstico definitivo, permitindo orientar e aprofundar a natureza de situações fisiopatológicas que afetam as aves. Diversas enfermidades avícolas provocam alterações nos parâmetros hematológicos. Dentre estas cita-se a anemia infecciosa aviária, leucoses e micotoxicoses (KOHAYAGANA et al., 2001; CARDOSO; TESSARI, 2003).

O sistema imunológico das aves opera de acordo com os mesmos princípios do sistema imunológico dos mamíferos (SHARMA, 1984). Os monócitos, macrófagos, heterófilos e linfócitos constituem os componentes celulares das respostas imunológicas nas aves (MORGULIS, 2002).

As células do sistema imunológico das aves dividem-se de acordo como a morfologia nuclear. Os agranulócitos são constituídos por linfócitos, macrófagos, monócitos e trombócitos. Os granulócitos são constituídos por heterófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, estes não possuem especificidade para os antígenos, mas têm importante papel na fase aguda da infecção (MORGULIS, 2002).

O hemograma consta de uma série de provas que possibilitam detectar anormalidades que se apresentam em certos fenômenos fisiopatológicos importantes nos animais e no homem e que se refletem no sangue. A contagem total e diferencial de leucócitos é de extrema importância para o diagnóstico de doenças no homem e também é importante para doenças aviárias. Na maioria das espécies aviárias, o percentual de linfócitos é maior que qualquer outro elemento celular, compreendendo de 40-70% da contagem total, sendo os heterófilos o segundo grupo (NORIEGA, 2000).

Na avicultura, as aflatoxinas podem levar a condenação de todo o plantel de frangos de corte e de postura contaminados, significando um enorme prejuízo ao produtor, já que a exposição de frangos às aflatoxinas em baixas concentrações na ração, resultam num quadro de comprometimento da resposta imunológica mediada por células (WYATT, 1991; ESPADA et al., 1992).

Biachini et al. (2005), incorporaram AFB<sub>1</sub> na ração de frangos de corte, machos da linhagem Ross, durante 21 dias, com quatro diferentes doses da toxina. As aves receberam doses entre 50,0 e 2,450µg de AFB<sub>1</sub>/kg na ração, e apresentaram alterações hematológicas com características dose dependente, compatíveis com a intoxicação por aflatoxinas.

As aflatoxinas induzem uma supressão hematopoiética que afeta tanto glóbulos vermelhos quanto glóbulos brancos, o que gera anemia e leucopenia, sendo que destes sua gravidade depende de fatores como a concentração e o tempo de exposição (TUNG et al., 1975; PEROZO et al., 2003).

A avaliação da concentração de proteínas totais é o parâmetro hematológico mais relacionado com a ocorrência das aflatoxicoses e permite monitorar o grau de exposição às aflatoxinas. Isto se explica graças ao mecanismo de ação das aflatoxinas, pois uma vez biotransformadas pelo citocromo P-450 no fígado, são capazes de interagir com DNA, RNA



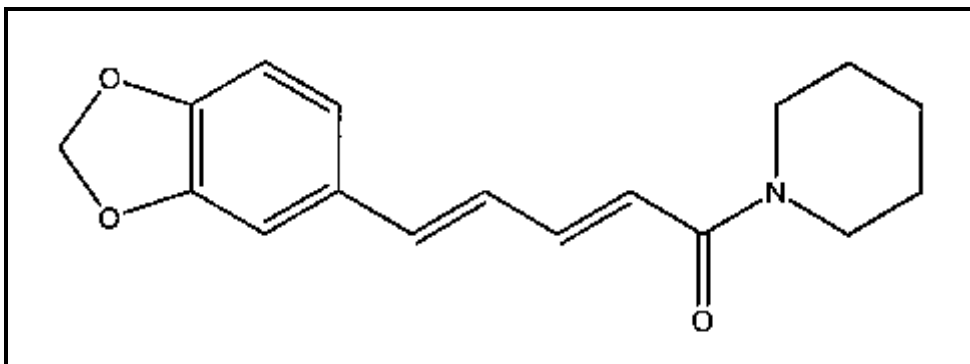
e com proteínas intracelulares inibindo a transcrição e síntese de proteínas. (LEESON et al., 1995; OGUZ et al., 2000, PEROZO et al., 2003).

Tessari et al., 2006 avaliaram os efeitos da aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e da fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) sobre o hemograma e o leucograma de frangos alimentados com ração contendo as toxinas isoladamente e em associação, nos níveis de 0, 50 e 200µg de AFB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup>, e/ou 0, 50 e 200mg de FB<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup>. Os frangos foram alimentados com as rações contaminadas do 8º até o 41º dia de vida. As aves de todos os grupos alimentados com micotoxinas apresentaram redução (P<0,05) nos valores de hematócrito, hemoglobina e número de hemácias, caracterizando um quadro de anemia, sendo que os grupos mais afetados foram os que receberam as maiores concentrações das toxinas em associação. Observou-se um menor (P<0,05) número de leucócitos em todos os tratamentos, porém esta redução foi mais intensa nos grupos tratados com 200µg kg<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>, com ou sem FB<sub>1</sub>.

Natt e Herrick (1951) descreveram um diluente estável, de fácil preparo, o qual permite rápida diferenciação de vários tipos de células sanguíneas de aves, capacitando assim a contagem direta de eritrócitos e leucócitos de uma mesma amostra de sangue.

### 3.2 Piperina

A piperina (1-piperoil piperidine) é o componente ativo presente em diversas espécies de pimenta do reino (*Piper* sp.), (Figura 2), sendo a piperina a principal amida constituinte de várias espécies de pimenta como na pimenta preta (*Piper nigrum* Linn.) e pimenta longa (*Piper longum* Linn.), que são usadas mundialmente como temperos e como ingrediente em sistemas de medicina alternativa (PARMAR et al., 1997).



**Figura 02.** Estrutura molecular da piperina (BAJAD et al., 2002).

#### 3.2.1 Biotransformação e excreção da piperina

A biotransformação dos fármacos e outros produtos como extratos naturais envolve dois tipos de reação bioquímica, conhecidos como reação de Fase I e de Fase II. Como a piperina é um composto lipofílico passa por estas duas fases. A maior parte da piperina administrada é absorvida pelo intestino e rapidamente biotransformada no fígado, pela demetilação do grupamento metileno-dióxido da piperina (BHAT; CHANDRASEKHARA, 1986).

A biotransformação é realizada, principalmente, pelo sistema microsomal do citocromo P-450 dos hepatócitos. Este sistema inclui a biotransformação por redução,

hidrólise, hidroxilação, carboxilação e demetilação, fornecendo um produto solúvel excretável. Outro processo eficaz de degradação se faz pela conjugação com o ácido glicurônico, glicina, ácido sulfúrico, glutamina, acetato, cisteína e glutatión (RANG et al., 2004).

A piperina é biotransformada totalmente e é rapidamente excretada, sem deixar resíduos detectáveis nos tecidos. Estudos realizados revelaram que nenhum resíduo detectável de piperina e seus intermediários foram observados após 24h da ingestão (BHAT; CHANDRASEKHARA, 1986).

Atualmente, o citocromo P-450 é considerado como uma família de proteínas muito semelhantes entre si (isoformas); várias centenas de membros desta família de proteínas já são conhecidas, cada uma com diferente especificidade (RANG et al., 2004).

### **3.2.2 Mecanismo de ação da piperina**

A piperina apresenta diversas atividades biológicas e farmacológicas como: antiparasitária (GHOSHAL et al., 1996), antipirética, analgésica (VIRINDIR et al., 1997); antiinflamatória (GUPTAU et al., 2000); contraceptivo e antiespermatogênico (MALINI et al., 1999); anti-oxidante (MITTAL; GUPTA, 2000).

As propriedades inseticidas de extratos da pimenta do reino são conhecidas desde 1924 (SCOOT; MCKIBBEN, 1978), sendo a piperina um dos principais constituintes responsáveis por esta atividade inseticida (PARMAR et al., 1997; ESTRELA et al., 2003).

A atividade anticarcinogênica da piperina tem sido demonstrada, em diversos estudos, inibindo a proliferação celular (ALLEMEH et al. 1992; NAKINI et al., 1998; PRADEEP; KUTTAN, 2002; SELVENDIRAN et al., 2004; SUNILA; KUTTAN, 2004).

Platel e Srinivasan (2000) relataram que a piperina incorporada na dieta de ratos proporcionou uma melhora na digestão dos alimentos fornecidos, onde esta melhora estava relacionada a um aumento nas enzimas digestivas como: lípase, amilase, tripsina e realçou a atividade da quimiotripsina pancreática.

A piperina parece inibir diferentes isoformas do citocromo P-450 assim como UDP-glicorunil transferase e arilhidrocarbono hidroxilase hepática e outras enzimas envolvidas no metabolismo de xenobiótico. Atal et al. (1985), sugerem que a piperina prejudica a biotransformação de pró-carcinógenos e, portanto a geração de seus intermediários reativos.

A atividade imunomodulatória do extrato de pimenta e da piperina pode estar relacionada à ação combinada de respostas imunes humoral e celular. Os resultados indicaram que o extrato da pimenta e a piperina isolada poderiam agir como um imunomodulador não-tóxico e que apresentariam propriedades antitumorais (SUNILA; KUTTAN, 2004).

O estudo realizado por Dogra et al. (2004), evidenciou-se um efeito imunossupressor relevante em ratos, onde a administração de diferentes doses de piperina ocasionaram a diminuição da população das células do timo e dos linfócitos periféricos.

A interferência da piperina no mecanismo de ação das aflatoxinas foi relatada por Reen et al. (1997) que demonstraram redução da citotoxicidade e a genotoxicidade da aflatoxina B<sub>1</sub> in vitro. A piperina proporcionou um potente efeito quimiopreventivo contra pró-carcinógenos ativados pelo citocromo P-450 em hepatócitos de rato, in vitro.

Os estudos sugerem que a piperina atua em mais de uma isoforma do citocromo P450; entretanto, a exata natureza das formas envolvidas ainda não é conhecida (HANDSCHIN; MEYER, 2003).

### **3.2.3 Biodisponibilidade promovida pela piperina**

A piperina é relatada em muitos artigos por aumentar a biodisponibilidade de algumas substâncias uma vez que inibe a biotransformação hepática e intestinal de certas drogas como no caso do curcumin (SHOBA et al., 1988), do propranolol e teofilina (BANO et al., 1991).

Atal et al. (1985), descreveram o aumento da biodisponibilidade de drogas e de alguns suplementos nutritivos pela piperina, por atuar inibindo o mecanismo de glicuronidação no fígado e intestino delgado.

No que se refere às drogas, a piperina suprime quadros convulsivos por estimular a liberação de 5-HT do córtex cerebral (MORI et al., 1985) e catecolamina da glândula adrenal (KAWADA et al., 1988). Em outro estudo a administração de 5,0 mg de piperina por 14 dias, em voluntários humanos, demonstrou significantes aumentos nos níveis de beta-caroteno no soro, e também aumento da biodisponibilidade de vitamina B6 e vitamina C (BADMAEV et al., 1999); a mesma dose produziu resultados similares envolvendo a coenzima Q10 (BADMAEV et al., 2000).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas: o primeiro ensaio voltado para o estabelecimento da concentração não tóxica de piperina no período de 29 de abril a 20 de maio 2006, e o segundo ensaio, para a avaliação da interferência da piperina no efeito tóxico prolongado das aflatoxinas em frangos de corte em fase de crescimento no período de 29 de julho a 19 de agosto de 2006.

### 4.1 Aves e Manejo

Pintos de um dia da linhagem de corte *Cobb Avian 48*, 200 no primeiro ensaio e 400 no segundo ensaio, cedidos pela granja Planalto-filial Pitanguí, MG, foram alojados em um galpão convencional no sistema cama, até os 21 dias de idade, no Setor de Avicultura da fazenda do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IZ/UFRRJ), localizado no município de Seropédica – RJ.

Os pintos foram mantidos na primeira semana, em um círculo sob temperatura de 32° C, num único círculo de proteção com uma campânula à central gás, cinco comedouros tipo bandeja (0,28m<sup>2</sup> cada) e quatro bebedouros tipo pressão (2,5L cada). As temperaturas ambientais (máxima e mínima) foram registradas diariamente, no período de experimentação (Anexo 1 e 2). Ao final de cada ensaio foram avaliados o ganho de peso, a conversão alimentar e o consumo de ração por grupo de aves.

As aves foram vacinadas ainda no incubatório contra a doença de Marek, não recebendo qualquer tipo de imunógeno durante o período de experimentação no galpão.

Aos sete dias de idade as aves foram sexadas sendo os machos pesados e separados para seleção dos que permaneceriam no experimento. Foram utilizados 60 pintos machos no primeiro ensaio e 45 pintos machos no segundo ensaio, sendo que o grande número inicial permitiu a seleção de pintos bastante uniformes. Os pintos foram distribuídos em quatro boxes (um grupo de 15 pintos/boxe) para a realização do primeiro ensaio e em 3 boxes (um grupo de 15 pintos/boxe) para a realização do segundo ensaio. Após o alojamento nos boxes, os bebedouros e comedouros foram substituídos por dois bebedouros pendulares automáticos e 2 comedouros tubulares por boxe. Os animais foram mantidos sob condições ambientais padrão, com luz natural e, recebendo ração balanceada e água ad libitum.

As aves receberam nos dois ensaios uma ração pré inicial de 1 a 7 dias de idade (Anexo 3) e ração inicial de 8 a 21 dias de idade (Anexo 4), sendo que as exigências nutricionais foram estabelecidas de modo a atender as recomendações de Rostagno et al. (2005). Previamente, foram realizadas análises micotológicas dos componentes das rações (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), nos quais não foram encontradas concentrações detectáveis de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona.

Ao final do experimento os frangos com 21 dias de idade foram pesados e submetidos a jejum de seis horas, foram pesados novamente e abatidos. Ao abate cada frango foi atordoado, sangrado, escaldado a 54°C por 2 minutos, depenado em máquina depenadeira e eviscerado manualmente, retirando-se ainda os órgãos selecionados para as análises.

## 4.2 Padrões de Aflatoxinas

As soluções padrões de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> – Sigma) foram preparadas segundo a metodologia da AOAC (1995).

## 4.3 Obtenção e Preparação das Soluções de Piperina

O material empregado no estudo foi purificado a partir do pó dos frutos secos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* Linn.), através de uma adaptação realizada na metodologia descrita originalmente por IKAN (1991), pelo professor Marco Edílson Freire de Lima, DQ/ICE/UFRRJ. A amida em sua forma pura foi dissolvida em 10% dimetilsulfóxido (DMSO)/etanol 95% e diluída em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2. Em seguida, a solução de piperina, nas concentrações de 1,12; 2,25 e 4,50 mg /kg vivo, foram vigorosamente misturadas (v/v) em óleo de milho no momento do uso, obtendo-se o volume final de 1mL por frango.

## 4.4 Obtenção e Preparo das Soluções das Aflatoxinas

As aflatoxinas foram obtidas a partir de cepas de *Aspergillus parasiticus* (CMDB 0336- FIOCRUZ-RJ), e cultivadas em Agar YES por 11 dias a 25 °C (Anexo 5). Após o crescimento do fungo, foram realizadas as extrações das colônias inteiras, macerando-as com 50 ml de clorofórmio. O macerado foi filtrado em filtro de papel *Whatman* n° 1, obtendo-se o extrato que foi concentrado até resíduo e, posteriormente, diluído em 1,0 ml de clorofórmio. A seguir foi analisado por cromatografia de camada delgada (CCD), em cromatofolhas de sílica gel 60 – 20 X 20 cm 0,2 mm de espessura (Merck n° 5553), previamente ativadas por 1 hora em temperatura de 120°C. A fase móvel utilizada foi composta pela mistura tolueno:clorofórmio:acetato de etila: ácido fórmico, na proporção de 35:25:25:10 (v/v/v/v) (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema de fase normal utilizando a coluna Microsorb, Vican, 4μ, 4,6x15cm. Os extratos foram eluídos com acetato de etila:n-hexano (3:2.5, v/v) com fluxo de 1,5 ml /min. A detecção foi realizada a 360nm (Detector UV-Visível L-4250, Merk-Hitachi) e o cálculo das concentrações foram realizados por comparação de áreas com os picos dos padrões. Os extratos quantificados e secos foram mantidos em freezer até o momento da administração nas aves.

As soluções de aflatoxinas administradas aos animais foram obtidas pela dissolução dos extratos secos com volume conhecido de óleo de milho, homogeneizados com ultrassom por 10 min. Destas soluções foram retiradas alíquotas na concentração estabelecida para a administração nos frangos.

## **4.5 Material Biológico para Análise**

Amostras de sangue foram coletadas no início (aves com sete dias de idade) e no momento do abate (aves com 21 dias de idade) com EDTA (ácido etilenodiamino tetracético de sódio) para a realização das análises hematológicas. Ao final dos ensaios, as vísceras (proventrículo, moela, jejuno, íleo, ceco e fígado) foram retiradas e enviadas para avaliação histopatológica.

## **4.6 Delineamento Experimental**

### **4.6.1 Ensaio com diferentes concentrações de piperina**

Frangos de corte machos, com oito dias de idade foram divididos em quatro grupos (n=15/grupo), sendo diariamente pesados e inoculados, com solução de piperina nas concentrações de 0,00; 1,12; 2,25 e 4,50 mg/kg de peso vivo (p.v.), sendo 1,0 mL administrado por via oral (gavagem)/ ave, por 14 dias. O grupo controle (0,00 mg/kg p.v.) foi inoculado apenas com o veículo utilizado para diluição da piperina. As doses empregadas foram escolhidas tendo como base o trabalho realizado por Piyachaturawat et al. (1983), as quais representam, respectivamente, 1/8, 1/4 e 1/2 das doses geralmente usadas no tratamento de humanos (9 – 13 mg/kg).

### **4.6.2 Ensaio para avaliação dos efeitos da piperina na toxidez das aflatoxinas**

De acordo com os resultados alcançados nos experimentos realizados na primeira fase, a dose de 2,25 mg de piperina por quilo peso vivo foi aparentemente segura para o modelo animal empregado e, por isso, selecionada para os experimentos de intoxicação dos frangos de corte com aflatoxinas.

A concentração de aflatoxinas empregada no estudo foi previamente estabelecida a partir de resultados descritos por Biachini et al. (2005).

Frangos de corte com oito dias de idade foram divididos em três grupos: grupo piperina (P) – 2,25 mg/kg; grupo aflatoxinas (A) – 2,0 mg/kg e grupo piperina associada a aflatoxinas (A+P), com 15 animais/grupo, sendo diariamente pesados e inoculados por via oral durante 14 dias (8° ao 21° dia de idades) (Quadro 1).

**Quadro 01.** Delineamento experimental do ensaio de avaliação dos efeitos da associação piperina e aflatoxinas.

<b>Grupo</b>	<b>Piperina<sup>1</sup></b>	<b>Aflatoxinas<sup>2</sup></b>
P	2,25 mg/ kg	0
A	0	2,0 mg/ kg
P + A	2,25 mg/ kg	2,0 mg/ kg

<sup>1</sup>. Inoculação por 14 dias consecutivos.

<sup>2</sup>. Inoculação por 13 dias, a partir do 2º dia da inoculação com piperina.

## **4.7 Metodologia de Avaliação do Experimento**

### **4.7.1 Índices de produtividade**

Foram avaliados, o consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar e o peso médio relativo do fígado, no período de 8 a 21 dias de idade. As aves foram pesadas no início e no final do período experimental para determinação do ganho de peso. Da mesma forma, o consumo de ração foi calculado considerando-se a ração fornecida, os desperdícios e as sobras de rações nos comedouros, durante o período experimental. Posteriormente calculou-se a conversão alimentar que consistiu na relação do consumo médio de ração sobre o ganho médio de peso das aves, no final de cada ensaio. Apenas o fígado foi avaliado e utilizado para o cálculo do peso relativo, que foi calculado considerando a relação do peso médio do fígado em relação ao peso médio vivo multiplicado por 100.

### **4.7.2 Análises hematológicas**

Com 7 dias de idade, antes do início de ambos os ensaios, foram coletadas amostras de sangue de cada ave por grupo, por meio de venopunção basílica (veia alar), usando-se anticoagulante (EDTA), na proporção de 25 µL para 1,0 a 1,5 mL de sangue. Este primeiro hemograma foi utilizado como valor padrão normal. Uma segunda amostra foi coletada ao término de cada ensaio após 14 dias de experimentação (aves com 21 dias de idade).

Após as coletas, realizadas sempre pela manhã, as amostras contidas nas seringas foram acondicionadas e transportadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para serem analisadas.

As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico, onde foram realizadas as seguintes provas hematológicas: concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT), determinada por meio do método de refratometria (COLES, 1984); concentração de hemoglobina (HB), dosada através do método de oxihemoglobina e centrifugação da amostra a 1.000 X g por 10 minutos para a determinação da densidade óptica no fotocolorímetro (Klett Summerson®), e correção do valor para a unidade de hemoglobina (CAMPBELL; DEIN, 1984); determinação do fibrinogênio plasmático (FP) e hematócrito (HT) efetuadas através do método do microhematócrito segundo metodologia descrita por Jain (1993); contagens de hemácias e leucócitos totais realizadas em hemocítômetro, utilizando-se a solução de Natt e Herrick (NATT; HERRICK, 1951), (Anexo 6).

A contagem de leucócitos foi realizada na diluição de 1/100 e a contagem de hemácias na diluição de 1/200. Foram contados os leucócitos do quadrante 1 mm<sup>3</sup> central (25 subdivisões do retículo melhorado da câmara de Neubauer) e; os eritrócitos foram contados neste mesmo quadrante em 1/5 de mm<sup>3</sup> (cinco subdivisões do retículo melhorado central da câmara de Neubauer). Os respectivos fatores de correção para as contagens totais de leucócitos e de eritrócitos foram o número de células contadas vezes 1.000 e 10.000, respectivamente; considerando-se área, altura da câmara e diluição.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos corados com hematoxilina-eosina (Panótico Rápido) para determinação dos valores relativos e posteriormente dos valores absolutos de linfócitos, heterófilos, monócitos eosinófilos e basófilos.

Por meio de fórmulas padronizadas os índices de Wintrobe (WINTROBE, 1933) foram calculados os seguintes índices: volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM).

#### **4.7.3 Coleta dos órgãos e anatomopatologia**

Amostras foram coletadas do proventrículo, moela, jejuno, íleo, ceco e fígado para avaliação histopatológica. As avaliações macroscópicas foram feitas no momento do abate, quando foram observadas, principalmente, alterações de tamanho e coloração dos órgãos, presença de lesões de parênquima e nas mucosas.

#### **4.7.4 Processamento histológico**

Os órgãos coletados foram fixados em formalina tamponada a 10%, acondicionados em potes de vidro e enviados para o setor de Histopatologia do Laboratório de Coccidios e Coccidioses do Instituto de Veterinária da UFRRJ, sob supervisão do Dr. Walter Leira Teixeira Filho e professor Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes. Os cortes foram feitos conforme as técnicas histológicas descritas por Luna (1968), sendo estes corados com hematoxilina e eosina. Os cortes histopatológicos dos órgãos foram observados ao microscópio óptico quanto à estimativa do grau de lesão relacionada ao órgão e a patologia apresentada. Caracterizou-se o grau de lesão conforme a escala demonstrada no quadro 2.



**Quadro 02.** Escores de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão apresentado.

Grau de Lesão	Escore
Ausência	-
Leve	+
Moderada	+(+)
Acentuada	++

#### **4.8 Análise Estatística**

Os resultados obtidos nos diferentes grupos, com distribuição normal, foram analisados através da análise de variância, com as médias comparadas por teste de Newman-Keuls; nos resultados eventualmente não normalizáveis, a análise foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, sendo as médias dos grupos comparadas pelo teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas em  $p < 0,05$ .

Algumas etapas referentes ao experimento realizadas no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro podem ser observadas na figura 3.



**Figura 03.** Registro fotográfico, A- Interior do galpão 3 (Setor de Avicultura do IZ/UFRRJ); B- Chegada dos pintos, com 1 dia de idade, C- Interior da fábrica de ração (IZ/UFRRJ); D- Interior da fábrica de ração (IZ/UFRRJ); E- Pintos com 3 dias de idade, dentro do círculo de proteção com uma campânula central, segundo ensaio; F- Procedimento de administração oral das substâncias utilizadas no experimento, pintos com 8 dias de idade.

## 5 RESULTADOS

Durante o período experimental não foram detectadas alterações clínicas no estado geral das aves. Como também os animais não apresentaram sinais clínicos de intoxicação em nenhum dos grupos inoculados. A taxa de mortalidade observada foi de 0 % para todos os tratamentos empregados.

### 5.1 Ensaio de Avaliação dos Efeitos de Diferentes Concentrações de Piperina

#### 5.1.1 Índices de produtividade

Na Tabela 1 estão listados os resultados obtidos quanto aos parâmetros: ganho médio de peso, consumo médio de ração, conversão alimentar, peso médio do fígado em relação ao peso vivo dos frangos aos 21 dias de idade.

Os resultados referentes ao ganho médio de peso e peso do fígado em relação ao peso vivo obedeceram a uma distribuição normal, não sendo observada diferença significativa ao final de 14 dias de inoculação.

**Tabela 01.** Médias e desvios padrões da influência da administração oral de diferentes concentrações de piperina, em frangos de corte, sobre o ganho médio de peso, consumo médio de ração, conversão alimentar, peso médio do fígado/ kg de peso vivo aos 21 dias de idade.

Piperina <sup>1</sup>	Ganho médio de peso (g)	Consumo médio de ração (g)	Conversão alimentar <sup>2</sup>	Peso médio relativo do fígado (g/kg p.v.) <sup>3</sup>
0,00	824 <sup>a</sup> ± 32,82	1108,67	1,345	2,35 <sup>a</sup> ± 0,195
1,12	786,9 <sup>a</sup> ± 43,62	1159,33	1,473	2,36 <sup>a</sup> ± 0,196
2,25	842,5 <sup>a</sup> ± 43,75	1100,67	1,306	2,31 <sup>a</sup> ± 0,226
4,50	789,0 <sup>a</sup> ± 34,12	1098,00	1,391	2,27 <sup>a</sup> ± 0,152

<sup>1</sup> mg/kg de peso vivo.

<sup>2</sup> consumo médio de ração/ ganho médio de peso.

<sup>3</sup> (Peso médio do fígado /peso médio vivo) × 100.

<sup>a</sup> nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).

Análise estatística por análise de variância; as médias foram comparadas segundo o teste Newman-Keuls.

### **5.1.2 Avaliação histopatológica**

Os dados obtidos na histopatologia revelaram ausência de lesões aparentes no proventrículo, duodeno, jejuno, íleo e ceco, em todas as concentrações de piperina testadas, quando comparada ao grupo controle. Todavia, a análise histopatológica do fígado revelou infiltrado de células mononucleadas em todas as concentrações de piperina, com características dose dependente. Na concentração de 4,50 mg de piperina/kg p.v., também foi observado áreas de necrose do endotélio de ductos biliares.

### **5.1.3 Análises hematológicas**

Os valores médios obtidos no hemograma e leucograma nos diferentes grupos experimentais estão demonstrados na Tabela 2 e 3, respectivamente.

No hemograma foram avaliados os seguintes parâmetros: hematimetria, hematócrito, concentração de proteínas plasmáticas totais, fibrinogênio plasmático, concentração de hemoglobina, volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média. Todos os parâmetros obedeceram a uma distribuição normal, não sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos.

Em relação a leucometria global e a leucometria diferencial, ambas obedeceram a uma distribuição normal sendo observada diferença estatística, onde se pode observar um aumento no número total de leucócitos e monocitose no grupo inoculado com 2,25 mg/kg e 4,5 mg/kg e um aumento significativo de heterófilos em todos os grupos testados com piperina. Ocorreram também, alterações no número médio de linfócitos e eosinófilos, porém não obedeceram a uma distribuição normal, sendo que o grupo inoculado com 2,25 mg/kg obteve um maior número destes tipos celulares.

**Tabela 02.** Médias e desvios padrões dos valores médios do hemograma avaliados em função das diferentes doses de piperina após 14 dias do primeiro ensaio.

Dose de piperina <sup>1</sup>	Hematimetria (x 10 <sup>6</sup> /μL)	HT <sup>2</sup> (%)	PPT <sup>3</sup> (g/dL)	FP <sup>4</sup>	HB <sup>5</sup> (g/dL)	VGM <sup>6</sup> (fL)	CHGM <sup>7</sup> (%)
0,00	2,219 <sup>a</sup> ± 0,200	31,53 <sup>a</sup> ± 2,949	2,620 <sup>a</sup> ± 0,319	153,3 <sup>a</sup> ± 83,38	7,96 <sup>a</sup> ± 0,872	142,5 <sup>a</sup> ± 11,69	25,08 <sup>a</sup> ± 1,222
1,12	2,193 <sup>a</sup> ± 0,207	32,71 <sup>a</sup> ± 2,400	2,557 <sup>a</sup> ± 0,179	150,0 <sup>a</sup> ± 51,89	8,24 <sup>a</sup> ± 0,785	149,8 <sup>a</sup> ± 10,21	25,20 <sup>a</sup> ± 1,947
2,25	2,229 <sup>a</sup> ± 0,100	32,33 <sup>a</sup> ± 1,496	2,793 <sup>a</sup> ± 0,260	166,7 <sup>a</sup> ± 81,65	8,31 <sup>a</sup> ± 0,761	147,0 <sup>a</sup> ± 7,264	25,70 <sup>a</sup> ± 2,157
4,50	2,318 <sup>a</sup> ± 0,253	32,33 <sup>a</sup> ± 2,225	2,707 <sup>a</sup> ± 0,415	146,7 <sup>a</sup> ± 83,38	7,87 <sup>a</sup> ± 0,732	139,5 <sup>a</sup> ± 16,03	24,43 <sup>a</sup> ± 2,603

<sup>1</sup>mg piperina/kg peso vivo.

<sup>2</sup> Hematócrito. <sup>3</sup> Proteínas Plasmáticas Totais. <sup>4</sup> Fibrinogênio Plasmático. <sup>5</sup> Hemoglobina. <sup>6</sup> Volume Globular Médio. <sup>7</sup> Concentração de Hemoglobina Globular Média.

<sup>a</sup> nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais.

A análise estatística para os dados com distribuição normal foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls; dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns.

**Tabela 03.** Valores médios e desvios padrões do leucograma avaliados em função das diferentes doses de piperina após 14 dias de experimentação.

Dose <sup>1</sup>	Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Contagem diferencial (n.º células x 10 <sup>3</sup> /μL)			
		Heterófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
0,00	30,07 <sup>a</sup> ± 4,079	7,64 <sup>a</sup> ± 2,395	19,50 <sup>a</sup> ± 3,907	2,688 <sup>a</sup> ± 0,993	0,083 <sup>a</sup> ± 0,185
1,12	35,00 <sup>a</sup> ± 4,899	10,24 <sup>b</sup> ± 2,184	21,22 <sup>ab</sup> ± 4,157	3,569 <sup>a</sup> ± 1,361	0,146 <sup>ab</sup> ± 0,227
2,25	46,47 <sup>b</sup> ± 11,830	12,72 <sup>b</sup> ± 4,483	27,39 <sup>c</sup> ± 7,188	5,497 <sup>b</sup> ± 2,387	0,406 <sup>b</sup> ± 0,390
4,50	42,00 <sup>b</sup> ± 9,032	11,18 <sup>b</sup> ± 2,781	24,83 <sup>bc</sup> ± 6,988	5,740 <sup>b</sup> ± 1,984	0,204 <sup>ab</sup> ± 0,292

<sup>1</sup> mg piperina/kg peso vivo.

<sup>a, b, c</sup> nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais.

Análise estatística para os dados com distribuição normal foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls; dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns.

## 5.2 Avaliação da Ação da Piperina na Toxidez das Aflatoxinas

### 5.2.1 Índices de produtividade

Os resultados do segundo ensaio, como ganho médio de peso, consumo médio de ração, conversão alimentar, peso médio do fígado em relação do peso vivo, em uma intoxicação prolongada por aflatoxinas, em frangos de corte aos 21 dias de idade, foram expressos na tabela 4.

Os resultados obedeceram a uma distribuição normal, observando-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no ganho médio de peso e no peso médio do fígado em relação ao peso vivo do grupo que foi inoculado somente com aflatoxinas ao final de 14 dias de experimentação. Esse grupo experimental, apenas como dado ilustrativo, numericamente apresentou menor consumo médio de ração e uma melhor conversão alimentar quando comparado aos demais grupos.

**Tabela 04.** Médias e desvios padrões da influência sobre o ganho médio de peso, consumo médio de ração, conversão alimentar e peso médio do fígado (g/kg de peso vivo) da administração oral de piperina na intoxicação prolongada de aflatoxinas, em frangos de corte.

Grupo	Ganho de peso (g)	Consumo médio de ração (g)	Conversão alimentar <sup>1</sup>	Peso médio relativo do fígado (g/kg p.v.) <sup>2</sup>
P <sup>3</sup>	836,7 <sup>a</sup> ± 36,39	1101,0	1,316	2,32 <sup>a</sup> ± 0,4546
A <sup>4</sup>	760,0 <sup>b</sup> ± 62,40	1090,0	1,434	2,65 <sup>b</sup> ± 0,1170
P + A <sup>5</sup>	804,0 <sup>ab</sup> ± 48,85	1102,0	1,370	2,29 <sup>a</sup> ± 0,1448

<sup>1</sup> consumo médio de ração/ ganho médio de peso.

<sup>2</sup> (Peso médio do fígado /peso médio vivo) × 100.

<sup>3</sup> Piperina (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina).

<sup>4</sup> Aflatoxinas (2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas).

<sup>5</sup> Piperina associada a aflatoxinas (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina e 2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas).

<sup>a, b</sup> nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Análise estatística por análise de variância; as médias foram comparadas segundo o teste Newman-Keuls.

### 5.2.2 Avaliação histopatológica

Os escores histológicos das lesões do fígado, proventrículo e duodeno estão apresentados na Tabela 5.

No fígado do grupo das aves inoculadas apenas com piperina, foi observado um discreto aumento de infiltrado de células mononucleares, com o endotélio dos ductos biliares apresentando aspecto normal. O mesmo não ocorreu no grupo inoculado com aflatoxinas, neste foi observado congestão e necrose do endotélio de ductos biliares, com infiltrado de células mononucleares no parênquima. Também foram evidenciadas áreas com células apoptóticas e com megalocitose, caracterizando alterações sugestivas de intoxicação. No entanto, no grupo inoculado com piperina associada à aflatoxinas apesar da presença de infiltrado de células mononucleares, os ductos biliares apresentaram-se sem

lesões aparentes e arranjo celular dentro dos padrões de normalidade. Portanto, apesar do parênquima hepático apresentar lesões, estas foram significativamente mais discretas neste grupo.

O proventrículo do grupo das aves inoculadas com aflatoxinas apresentou um acentuado aumento de infiltrado de células mononucleares e destruição dos ápices das vilosidades da mucosa, quando comparado com os dois outros grupos, que apenas apresentaram uma discreta infiltração de células mononucleares.

Com relação ao duodeno o grupo inoculado com piperina não apresentou lesões aparentes, enquanto que no grupo inoculado com aflatoxinas foram evidenciados edema e necrose das vilosidades, e que no grupo inoculado com piperina associada à aflatoxinas também foram detectadas áreas de necrose nas vilosidades, porém de menor intensidade e extensão, quando comparado ao grupo inoculado com aflatoxinas isoladamente.

**Tabela 05.** Escores das lesões histopatológicas observadas no fígado(F), proventrículo (PV), duodeno (D) da administração oral de piperina em uma intoxicação prolongada de aflatoxinas (por 13 dias consecutivos), em frangos de corte.

Tipos de Lesões	Grupos								
	P <sup>1</sup>			A <sup>2</sup>			P + A <sup>3</sup>		
	F	PV	D	F	PV	D	F	PV	D
Mitose	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Apoptose	-	-	-	++	-	++	-	-	+
Megalocitose	-	-	-	++	++	++	-	-	-
Infiltrado de células mononucleares	+	+	-	++	++	++	+(+)	+	++
Congestão	-	-	-	++	-	++	-	-	+(+)
Necrose	-	-	-	++	++	++	-	-	+(+)
Vacuolização	-	-	-	++	++	+(+)	-	-	-
Edema	-	-	-	++	++	++	-	-	-

<sup>1</sup> Piperina (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina)

<sup>2</sup> Aflatoxinas (2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas).

<sup>3</sup> Piperina associada a aflatoxinas (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina e 2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas)

- ausência; + leve; +(+) moderada; ++ acentuada



### 5.2.3 Análises hematológicas

A Tabela 6 expressa os resultados do hemograma obtido nos grupos inoculados com piperina, aflatoxinas e no grupo piperina associado à aflatoxinas.

Os valores médios obtidos na contagem do número de hemácias obedeceram a uma distribuição normal, sendo observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os três grupos. Com relação ao hematócrito e proteínas plasmáticas totais, observou-se uma diminuição significativa no grupo inoculado apenas com aflatoxinas e no grupo inoculado com piperina associado a aflatoxinas, sendo que no primeiro, houve uma diminuição mais acentuada em ambos os parâmetros analisados.

O fibrinogênio aumentou significativamente no grupo inoculado com piperina associado à aflatoxinas, não houve diferenças significativas com relação à hemoglobina entre os grupos testados. O volume globular médio apresentou maior aumento no grupo das aflatoxinas, embora as variações no grupo da piperina associado à aflatoxinas também foram significativas, enquanto que a concentração de hemoglobina globular média aumentou significativamente no grupo das aflatoxinas e no grupo da piperina associado a aflatoxinas, porém todos estes parâmetros analisados se mantiveram dentro dos valores de normalidade referentes a espécie animal utilizada para o experimento.

A Tabela 7 mostra os valores médios da leucometria global nos diferentes grupos experimentais, onde podemos verificar uma leucopenia significativa promovida pelas aflatoxinas, quando comparada ao grupo da piperina e da piperina associada à aflatoxinas (Figura 4). Na contagem diferencial dos leucócitos, observou-se linfopenia e monocitose nas aves inoculadas com aflatoxinas e linfocitose e monocitose mais acentuada no grupo inoculado apenas com piperina. Não houve diferenças significativas entre os valores médios obtidos na contagem de heterófilos e eosinófilos (Figura 5).

**Tabela 06.** Médias e desvios padrões da influência da administração oral de piperina em frangos de corte intoxicados com aflatoxinas, sobre o hemograma.

Grupo	Hematimetria (x 10 <sup>6</sup> /μL)	HT (%) <sup>1</sup>	PPT (g/dl) <sup>2</sup>	FP <sup>3</sup>	HB (g/dl) <sup>4</sup>	VGM (fl) <sup>5</sup>	CHGM (%) <sup>6</sup>
P <sup>7</sup>	2,487 <sup>a</sup> ± 0,098	30,67 <sup>a</sup> ± 1,447	3,140 <sup>a</sup> ± 0,177	186,7 <sup>a</sup> ± 83,38	7,54 <sup>a</sup> ± 0,472	123,4 <sup>a</sup> ± 5,954	24,63 <sup>a</sup> ± 1,981
A <sup>8</sup>	1,903 <sup>b</sup> ± 0,123	28,53 <sup>b</sup> ± 1,885	2,533 <sup>b</sup> ± 0,176	146,7 <sup>a</sup> ± 74,32	7,46 <sup>a</sup> ± 0,498	150,3 <sup>b</sup> ± 11,10	26,19 <sup>b</sup> ± 1,656
P + A <sup>9</sup>	2,193 <sup>c</sup> ± 0,140	29,13 <sup>b</sup> ± 1,246	2,613 <sup>b</sup> ± 0,210	380,0 <sup>b</sup> ± 67,61	7,79 <sup>a</sup> ± 0,352	133,3 <sup>c</sup> ± 9,333	26,74 <sup>b</sup> ± 1,053

Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais.

<sup>1</sup> Hematócrito. <sup>2</sup> Proteínas Plasmáticas Totais. <sup>3</sup> Fibrinogênio Plasmático. <sup>4</sup> Hemoglobina. <sup>5</sup> Volume Globular Médio. <sup>6</sup> Concentração de Hemoglobina Globular Média.

<sup>a,b,c</sup> nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

<sup>7</sup> Piperina (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina). <sup>8</sup> Aflatoxinas (2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas).

<sup>9</sup> Piperina associada a Aflatoxinas (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina e 2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas).

Análise estatística para os dados com distribuição normal foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls; dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns.

**Tabela 07.** Médias e desvios padrões do leucograma avaliados em função da associação de aflatoxinas com piperina.

Grupo	Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Contagem diferencial (n.º células x 10 <sup>3</sup> /μL)			
		Heterófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
P <sup>1</sup>	33,73 <sup>a</sup> ± 3,348	8,565 <sup>a</sup> ± 2,078	21,214 <sup>a</sup> ± 2,053	3,844 <sup>a</sup> ± 0,981	0,084 <sup>a</sup> ± 0,194
A <sup>2</sup>	19,00 <sup>b</sup> ± 2,563	7,909 <sup>a</sup> ± 1,067	7,405 <sup>b</sup> ± 1,834	3,675 <sup>a</sup> ± 0,818	0,011 <sup>a</sup> ± 0,041
P + A <sup>3</sup>	26,60 <sup>c</sup> ± 4,102	7,277 <sup>a</sup> ± 1,157	18,203 <sup>c</sup> ± 2,903	1,102 <sup>b</sup> ± 0,337	0,018 <sup>a</sup> ± 0,070

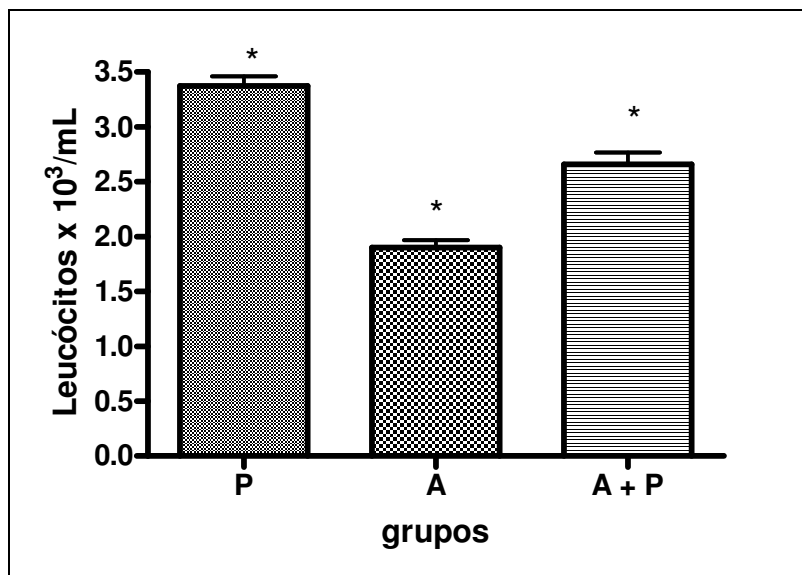
<sup>1</sup> Piperina (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina). <sup>2</sup> Aflatoxinas (2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas).

<sup>3</sup> Piperina associada a Aflatoxinas (2,25 mg kg<sup>-1</sup> de piperina e 2,0 mg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas).

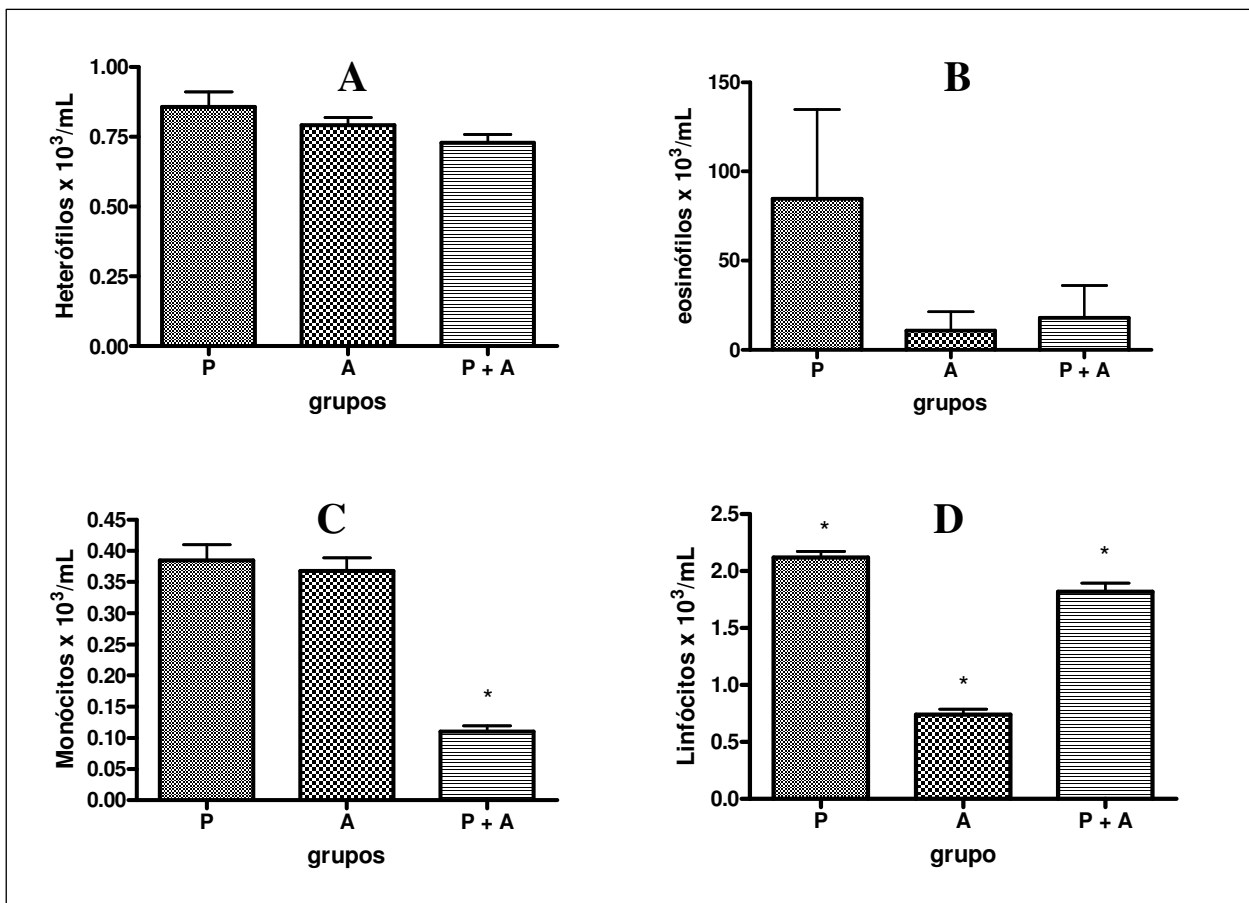
Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais.

<sup>a,b,c</sup> nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Análise estatística para os dados com distribuição normal foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls; dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns.



**Figura 04.** Efeito da piperina sobre a leucopenia induzida através da intoxicação de frangos de corte com aflatoxinas. A administração oral de piperina ( $2,25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foi iniciada 24 horas antes da intoxicação com aflatoxinas ( $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), também por via oral. Os resultados estão expressos pela média do grupo  $\pm$  desvio padrão de 15 animais. A análise estatística foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls.\* indica  $p < 0,001$ , quando o grupo aflatoxina foi comparado com os grupos piperina e piperina associados as aflatoxinas (P+A).



**Figura 05.** Efeito da piperina ( $2,25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) nos valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos. Os resultados estão expressos pela média do grupo  $\pm$  desvio padrão de 15 animais. A análise estatística para os dados com distribuição normal (A, Heterófilos; C, monócitos e D, linfócitos) foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls; dados sem distribuição normal (B, eosinófilos) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns. \* indica  $p < 0,001$ .

## 6 DISCUSSÃO

As aflatoxinas são responsáveis por alterações imunológicas, hematológicas e histopatológicas, principalmente hepáticas, em diversas espécies animais, existindo uma relação direta entre quantidade de micotoxina ingerida e intensidade dessas alterações. A capacidade da piperina em diminuir os efeitos tóxicos das aflatoxinas, sugerindo que a piperina poderia ser utilizada como um agente quimiopreventivo contra pró-carcinógenos que sejam ativados pela via do citocromo P-450, desperta grande interesse de estudo.

Com os resultados obtidos no primeiro ensaio, pode-se observar que as doses empregadas não interferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) no ganho médio de peso e no peso médio relativo do fígado dos animais após 14 dias de administração com diferentes concentrações de piperina. Além disso, pode-se verificar que as diferentes concentrações de piperina utilizadas, aparentemente, não interferiram na conversão alimentar e no consumo médio de ração dos frangos de corte neste ensaio. Estes resultados contrapõem-se aos citados por Dogra et al. (2004), onde, avaliando o tamanho de diversos órgãos para as mesmas doses em camundongos machos *Swiss*, verificaram aumento de peso do fígado nos tratamentos de 1,12 e 2,25 mg/kg, já na dose de 4,50 mg/kg, o mesmo não ocorreu, ficando próxima do grupo controle.

As diferentes concentrações de piperina também não foram capazes de alterar de forma significativa os valores médios do hemograma. Os valores de normalidade descritos no presente experimento foram baseados em resultados de hemogramas e leucogramas considerados normais em frangos de corte citados por Jain (1993); Noriega (2000); Kohayagana et al. (2001); Cardoso; Tessari, (2003); Biachini et al. (2005); Tessari et al. (2006), sugerindo assim que a piperina não interfere e/ou não age sobre os parâmetros analisados.

No primeiro ensaio, de acordo com os efeitos da piperina sobre os leucócitos, observou-se um aumento significativo no número total das células brancas do sangue. Nas maiores concentrações de piperina (2,25 e 4,50 mg/kg de peso vivo) administradas, a contagem diferencial também revelou alterações, apresentando aumentos significativos dos diferentes tipos de leucócitos.

A capacidade imunomodulatória da piperina ainda é controversa. Sunila; Kuttan (2004) verificaram um aumento no número de leucócitos de camundongos inoculados com 10 mg/dose/animal de extrato de pimenta (*Piper longum*) e de 1,14 mg/dose/animal de piperina intraperitoneal por cinco dias consecutivos; todavia, esse aumento não promoveu variação significativa dos diferentes tipos celulares. Estes dados se contrapõem aos achados de Dogra et al. (2004). Esses pesquisadores inocularam 1,12 mg/kg, 2,25 mg/kg e 4,5 mg/kg de piperina por cinco dias consecutivos em camundongos machos *Swiss*, por via oral, e observaram que doses de 2,25 e 4,5 mg/kg causaram uma redução significativa na contagem total de leucócitos. Todavia, não houve variação significativa dos diferentes tipos de leucócitos.

Os resultados obtidos no presente experimento estão de acordo com os resultados observados por Sunila; Kuttan (2004), onde foi possível observar um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da leucometria total e dos diferentes tipos de leucócitos mostrando que a piperina,

nas diferentes doses empregadas, foi capaz de estimular o sistema hematopoiético no modelo animal (frangos de corte) proposto.

As análises histopatológicas dos diferentes grupos não demonstraram lesões aparentes. Entretanto, o aumento da dose de piperina promoveu o aumento de infiltrados de células mononucleadas e pontos de necrose incipiente do endotélio do ducto biliar na dose de 4,50 mg/kg de peso vivo. Em murinos, Dogra et al. (2004), observaram alterações significativas ( $p < 0,05$ ), como megalocitose e vacuolização nos hepatócitos, nas doses de 2,25 e 4,50 mg/kg., portanto, pode-se sugerir que no experimento presente a piperina em doses mais elevadas pode causar alterações histopatológicas aparentes com característica dose dependente.

As doses de piperina utilizadas no experimento estão muito abaixo da DL50 e da dose subaguda de 514 mg/kg e 350 mg/Kg de piperina por via oral, respectivamente, observadas por Piyachaturawat et al. (1983) em diferentes espécies de roedores. Estes autores ainda ressaltam que doses mais baixas que a dose subaguda são seguras para mamíferos.

A relação dos efeitos da piperina sobre a toxidez das aflatoxinas demonstrou alterações importantes nos índices de produtividade e nos parâmetros hematológicos e histopatológicos empregados no experimento.

Os índices de produtividade avaliados nos grupos inoculados com piperina e piperina associada à aflatoxinas foram os que demonstraram melhor desempenho. A piperina influenciou positivamente o ganho médio de peso e o peso médio relativo do fígado em relação ao grupo de frangos intoxicados por aflatoxinas. A dose de aflatoxinas empregada no ensaio diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o ganho médio de peso e aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o peso médio relativo do fígado dos frangos intoxicados por aflatoxinas.

Os resultados alcançados estão de acordo com o trabalho de Quezada et al. (2000), estes autores verificaram aumento no peso relativo do fígado em frangos de corte que foram intoxicados com 2,0  $\mu$ g aflatoxina B<sub>1</sub>/g de ração por dia, a partir do 7º até o 21º dia de idade e observaram redução do ganho de peso corporal (20-30%) durante o período experimental (até 28 dia de idade dos frangos). Resultados semelhantes foram observados por Huff et al. (1986), demonstraram que os efeitos deletérios das aflatoxinas em frangos são maiores na fase inicial de criação (até os 21 dias de vida), porém o reflexo negativo sobre o ganho de peso é persistente até a fase final de criação.

Os dados obtidos relacionados ao aumento de peso significativo do fígado no grupo inoculado com aflatoxinas coincidem com os dados obtidos por Giacomini et al. (2006), ao avaliarem o peso relativo de órgãos de frangos alimentados com 3,0 mg de aflatoxinas/kg de ração por 42 dias.

Hoerr (1991); Wyllie; Morehouse (1978) e Ortatali et al. (2004) descreveram as lesões da aflatoxicose hepática aguda como sendo responsáveis pela degeneração gordurosa, necrose, aumento do núcleo dos hepatócitos com marginalização da cromatina e núcleo proeminente, bem como pela rápida proliferação dos ductos biliares. Estas características também foram observadas no presente trabalho, onde o grupo de frangos inoculado com 2,25 mg/kg de piperina apresentou no fígado uma discreta infiltração periportal de células mononucleares. No grupo inoculado apenas com aflatoxinas foram observadas lesões hepáticas compatíveis com o quadro de intoxicação, onde se pode

observar hiperplasia dos ductos biliares, infiltração periportal de células inflamatórias, necrose e vacuolização dos hepatócitos.

Pôde-se de forma clara, evidenciar o aumento no tamanho do fígado nas aves do grupo inoculado com aflatoxinas e alterações hematológicas significativas ( $p < 0,05$ ), sendo este resultado também semelhante ao obtido por Ledoux (1999).

A influência da piperina nas aves intoxicadas com aflatoxinas também foi avaliada quanto aos parâmetros hematológicos. As aves inoculadas apenas com piperina na dose de 2,25 mg/kg apresentaram todos os valores dentro das faixas de normalidade, de acordo com os dados reportados no primeiro ensaio e por Noriega (2000) e Cardoso; Tessari (2003); Biachini et al. (2005), Tessari et al. (2006). No entanto, o grupo inoculado com aflatoxinas apresentou redução na hematimetria e no hematócrito. Estes resultados indicam um quadro de anemia decorrente da intoxicação por aflatoxina B<sub>1</sub>, conforme reportado por outros autores (TUNG et al., 1975; JAVED et al., 1995).

Com relação proteínas plasmáticas totais, observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo inoculado com aflatoxinas e no grupo inoculado com piperina associado à aflatoxinas, sendo que no grupo inoculado com aflatoxinas a diminuição foi mais acentuada, porém se mantiveram de acordo com valores de normalidade descritos por Noriega (2000) e Cardoso; Tessari (2003). De acordo com as constatações de Quezada et al. (2000), as proteínas totais plasmáticas e a albumina apresentaram um significativo decréscimo ( $p < 0,01$ ) de 55% e 80% respectivamente em frangos de corte tratados com 2,0 mg/kg de aflatoxinas, observando-se um decréscimo mais acentuado com sete dias de tratamento, semelhante ao observado no segundo ensaio do presente experimento. Um dos principais efeitos dessa toxina é a inibição da síntese protéica, causando assim uma queda no nível de proteínas plasmáticas (LEESON et al., 1995; OGUZ et al., 2000; SANTIN, 2000; PEROZO et al., 2003).

Tessari et al. (2006), alimentaram aves com ração contendo níveis de 200 mg de AFB<sub>1</sub>/kg e determinam uma redução nos níveis séricos de proteínas totais após 20 dias de exposição contínua através da ração. Com os resultados obtidos no segundo ensaio deste experimento, pode-se sugerir que níveis mais baixos de aflatoxinas com exposição por um tempo prolongado, também podem levar a diminuição das proteínas plasmáticas totais.

O fibrinogênio aumentou significativamente no grupo inoculado com piperina associada a aflatoxinas. Esse aumento se manteve dentro dos padrões de normalidade em todos os grupos testados, estando de acordo com Jain, (1993). Esta elevação pode ser explicada pelo fato de que o fibrinogênio é sintetizado no fígado e durante a fase aguda da inflamação, ele é liberado pelos hepatócitos e seus níveis plasmáticos aumentam acentuadamente. Grande parte desse fibrinogênio se polimeriza no local da inflamação para formar a fibrina A deposição de fibrina também gera a trama onde proliferam as células endoteliais e os fibroblastos, levando a cicatrização (CHEVILLE, 2004).

O volume globular médio aumentou significativamente no grupo de frangos que receberam apenas aflatoxinas, enquanto que a concentração de hemoglobina corpuscular aumentou significativamente no grupo de frangos que receberam aflatoxinas e no grupo da piperina associada à aflatoxinas; porém, se mantiveram dentro dos valores de normalidade descrito por Jain (1993); Noriega (2000); Cardoso; Tessari, (2003); Tessari et al. (2006) referentes a esta espécie animal utilizada para o experimento.

Conforme Kokosharov (1998), os leucócitos têm um papel importante na resposta inflamatória, são os apresentadores da defesa a uma infecção. A diminuição na leucometria



absoluta observada no presente estudo (Figura 4) é coerente com os dados descritos por Javed et al. (1995) e Oguz et al. (2000), porém contrária aos resultados obtidos por Fernandez et al. (1995) Estes últimos autores observaram um aumento no número de leucócitos circulantes de frangos de corte tratados com 2500µg/Kg de AFB<sub>1</sub> adicionada à ração. A mesma concentração de AFB<sub>1</sub> foi utilizada por Oguz et al. (2000), o que parece ser incoerente quanto aos efeitos das aflatoxinas sobre os órgãos hematopoiéticos das aves Espada et al. (1992) relataram que a exposição de frangos as aflatoxinas em baixas concentrações na ração, resultam num quadro de comprometimento da resposta imunológica mediada por células.

Com relação ao número relativo dos tipos celulares, observamos no estudo que houve redução significativa na contagem de linfócitos das aves que receberam apenas aflatoxinas. Esses resultados sugerem que a piperina influencia na diminuição da imunossupressão causada pela aflatoxina, na dose empregada e no modelo animal proposto. Todavia, a diminuição de monócitos apenas no grupo que recebeu piperina associada a aflatoxinas foi um resultado inesperado e precisa ser melhor avaliado.

Por tratar-se de um estudo pioneiro, com este perfil, restaram muitos questionamentos, sendo assim, serão necessárias pesquisas mais aprofundadas sobre este tema.

Com o conjunto de dados apresentados no presente estudo, pode-se sugerir que a piperina no proposto experimento interferiu positivamente nos efeitos tóxicos das aflatoxinas, nos índices de produtividade, parâmetros hematológicos e histopatológicos.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que:

- A dose de 2,25 mg/kg de piperina não foi tóxica ou imunossupressora para os frangos de corte. As lesões histopatológicas observadas foram de grau discreto, podendo ter relação com fatores externos.
- A piperina, nas concentrações mais elevadas, foi capaz de promover um aumento na contagem total de leucócitos e não promoveu alterações no hemograma das aves.
- Os índices de produtividade não foram afetados pelas concentrações de piperina testadas e a associação de piperina as aflatoxinas promoveu melhor desempenho dos frangos comparativamente com aqueles expostos apenas às aflatoxinas.
- A dose de 2mg/kg de aflatoxinas foi suficiente para promover alterações negativas significativas no segundo ensaio.
- A piperina na concentração de 2,25 mg/kg reduziu ou eliminou, in vivo, as lesões histopatológicas, características de intoxicação e a imunossupressão causada pela aflatoxina (2,0 mg/kg).
- Desta forma, os resultados sugerem que a piperina pode interferir de forma positiva diminuindo a intoxicação por aflatoxinas em frangos de corte.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCROFT, R.; CARNAGHAN, R. B. A.; SARGEANT, K.; O'KELLY, J. A toxic factor in brazilian groundnut meal. **The Veterinary Record**, v.73, p.428-429, 1961.
- ALLAMEH, A.; MANJU, S.; GOPA B.; RAJ, H. G.; JASWANT S.; SRIVASTAVA N. Piperine, a plant alkaloid of the piper species, enhances the bioavailability of aflatoxin B<sub>1</sub> in rat tissues **Cancer Letter**, n.61, p.195-199, 1992.
- ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KARDER, M. M.; SHANG, S. B.; WICK, E. L.; WOGAN, G. N. Aflatoxins B and G. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 1706-1707, 1963.
- AOAC – ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST – In: **Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists**, 16<sup>a</sup> ed., Washington, 1995.
- ATAL, C. K.; DUBEY, R. K.; SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n. 232, p. 258-262, 1985.
- BADMAEV, V.; MAJEED, M.; NORKUS, E. P.; Piperine, an alkaloid derived from black pepper increases serum response of beta-carotene during 14-days of oral beta-carotene supplementation. **Nutrition Research**, n.19, p.381-388, 1999.
- BADMAEV, V.; MAJEED, M.; PRAKASH, L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q<sub>10</sub> following oral supplementation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, n.11, p. 109-113, 2000.
- BADJA, S.; JOHRI, R. K.; K.; SINGH, J.; BEDI, K. L. Simple high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of ketoconazole and piperine in rat plasma and hepatocyte culture **Journal of Chromatography A**, n. 949, p. 43-47, 2002.
- BALDISSERA, M. A.; SANTURIO, J. M.; SILVA, J. B.; ALMEIDA, C. A. A. Aflatoxinas, ocratoxina e a zearalenona em grãos e rações para consumo animal no Sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 12, n.1, p. 77-82, 1992.
- BANO, G.; RAINA, R. K.; ZUTSHI U. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, n. 41 p. 615-617, 1991.
- BHAT, B. G.; CHANDRASEKHARA, N. Studies on metabolism of piperine: absorption, tissue distribution and excretion of urinary conjugates in rats. **Toxicology**, v.40, p. 83-92, 1986.

- BIANCHI, D. M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, J. L.; GUERRA, S.; CORREA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in broiler chickens. **Poultry Science**, n. 84, p. 1835-1840, 2005.
- BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkey**, v. 9, p. 55-58, 1961.
- BORDIN, E. L. Aspectos patológicos das micotoxicoses em aves - Diagnóstico diferencial. **In: I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves**, p. 109-114, Curitiba – PR, 1995.
- CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. Avian Hematology. The Basics. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 14, n. 2, p. 223-248, 1984.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.4, p. 419-424, 2003.
- CAST, I. A. Mycotoxins. Economic and health risks. Task Force Rep, **Council for Agricultural Science and technology**, Ames, p. 116, 1989.
- CHEVILLE, N. F. **Introdução a Patologia Veterinária** 2ª edição. Editora Roca, p. 105-137, 2004.
- CLIFORD, J.I.; REES, K. R. Aflatoxin in site of action in the rat liver cell. **Nature**, v. 209, p.312-313, 1996.
- CRUZ, L. C. H. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses: Reflexos na indústria avícola. **In: I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves**, p. 1-13, Curitiba – PR, 1995.
- COLES, E. H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ª edição, Editora Manole, São Paulo, 566p, 1984.
- DOGRA, R. K.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, n. 96, v.3, p. 229-36, 2004.
- ESPADA, Y.; DOMINGO, M.; GOMEZ, J.; CALVO, M. A. Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.53, p.275-279, 1992.
- ESTRELA, J. L. V.; GUEDES, R. N. C.; MALTHA, C. R. A.; FAZOLIN, M. Toxicidade de amidas análogas à piperina a larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepdoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n.2, 2003.
- FERNANDEZ, A.; VERDE, M. T.; GOMEZ, J. G.; RAMOS, M. J. J. Changes in the prothrombin time, haematology and serum proteins uring experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. **Research in Veterinary Science**. v. 58, p. 119-122, 1995.
- GIACOMINI, L.; FICK, F. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Efeitos toxicológicos das aflatoxinas sobre o desempenho e plumagem de frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

- GHOSHAL, S.; KRISHNA, P. B.N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against entamoeba histolytica in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 50, p. 167-170, 1996.
- GUERRE, P., P. GALTIER, AND V. BURGAT. Le métabolisme: Un facteur de susceptibilité à la toxicité des aflatoxines. **Revue de Médecine Vétérinaire**, n. 147, p. 879-892, 1996.
- GROOPMAN, J. D.; BUSBY, W. F.; WOGAN, G. N. Nuclear distribution of aflatoxin B<sub>1</sub> and its interaction with histones in rat liver in vivo. **Cancer Research**, v. 40, n. 12, p. 4343-4351, 1980.
- GUPTAU, S. K.; BANSAL, P.; BHARDWAJ, R. K.; VELPANDIAN, T. Comparative anti-nociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 6, 2000.
- GURTOO, H. L.; MOTYCKA, L. Effect of sex difference on the in vitro and in vivo metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> by the rat. **Cancer Research**, n. 36, p. 4663-4671, 1976.
- HANDSCHIN, C.; MEYER, U. A. Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptors. **Pharmacological Review**, v. 55, n. 4, p. 649-673, 2003.
- HOERR, F. J. Mycotoxins. In: CALNECK, B. W. **Disease of Poultry**, Iowa: Iowa State University Press, n. 199, p. 884-915, 1991.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.
- HUFF, W. E., KUBENA, L. F., HARVEY, R. B. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, n. 65, p. 1891-1899, 1986.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - Some Naturally Occurring Substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: **IARC Monographs on the carcinogenic risks to humans**, IARC, Lyon, v.56, 1993.
- IKAN, R. In Natural Products. A Laboratory Guide 2<sup>a</sup>. ed. **New York Academic Press.**, p. 233-238, 1991.
- JAIN, N. C. **Essential of Veterinary Hematology**, Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.
- JAVED, T.; DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; RICHARD, J. L.; BENNET, G. A.; COTE, L. M.; BUCK, W. B. Serohematologic alterations in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or fumonisin B<sub>1</sub> and moniliformin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 520-526, 1995.
- KAWADA, T.; SAKABE, S.; WATANABE, T.; YAMAMOTO, M.; IWAI, K. Some pungent principles of species cause the adrenal medulla to secrete catecholamine in anesthetized rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n.188, p. 229-233, 1988.

KOHAYAGANA, A; SAUKAS, T.N.; BORETTI, L. P.; BORSA, A.; KUIBIDA, K. Valores hematológicos em frangos de corte de criação industrial no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas: FACTA. Conferência APINCO de Ciências e Tecnologia Avícola, Supl. 3, p. 82, 2001.

KOKOSHAROV, T. Changes in the white blood cells and specific phagocytosis in chicken with experimental acute fowl typhoid. **Veterinarski Arhiv**, v. 68, n. 1, p. 33-38, 1998.

LAZARRI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Editora Curitiba, 65 p., 1993.

LEDOUX, D. R; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; ALONSO-DEBOLT, M. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 78, p. 204-210, 1999.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph: **University Books**, 352 p., 1995.

LILLEHOJ, E. B. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxina, ochratoxin, fusarium toxins, and zearalenone. **J. A. V. A.**, v. 163, n. 11, p. 1281-1284, 1973.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 13. ed., New York: McGraw-hill, 258 p., 1968.

MALINI, T.; MANIMARAN, R. R. ; ARUNAKARAN, J. Effects of piperine on testis of albino rats. **Journal Ethnopharmacology**, n. 64, p. 219-225, 1999.

MARIANI, G. V. C. **Efeito de aflatoxinas sobre o desempenho produtivo de frangos de corte em diferentes períodos de desenvolvimento corporal**. Dissertação de Mestrado. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 1998.

MITTAL, R.; GUPTA, R. L. In vitro antioxidant activity of piperine. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacological**, v. 122, p. 163-167, 2000.

MORAES, L. B. **Estabelecimento de escores histopatológicos de lesão hepática e determinação dos valores normais das Enzimas aspartato aminotransferase e creatinina quinase em frangos de corte**. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**, Jaboticabal: FUNEP / UNESP, 375 p., 2002.

MORI, A.; KABUTO, H.; PEI, Y. Q. Effect of piperina on convulsions and on brain serotonin and catecholamine levels in E1 mice. **Neurochemistry Research**, n. 10, p. 1269-1275, 1985.

MOSS, M. O. Centenary Review. **Micotoxins and Mycology Research**, v. 100, n. 5, p. 513-523, 1996.

NAKINI, N.; SABITHA, K.; VISNANATHAN, P.; MENON, V.P. Spices and glycoproteins metabolism in experimental colon cancer in rats. **Medicine Science Research**, v. 26, p. 781-784, 1998.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-738, 1951.

NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematología aviar: material didático para curso de hematología aviária**. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. México, 70 p., 2000.

OGUZ, H.; RECECI, T.; BIRDANE, Y.; ONDER, F.; KURTOGW, V. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological and histological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, n. 69, v. 1, p. 89-93, 2000.

OLIVEIRA, M. A. B. **Aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em rações para frangos de corte colhidas em granjas do Estado de Goiás**. Goiânia: UFG, 1997. 68 p. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, 1997.

OLIVEIRA, G. R.; RIBEIRO, J. M.; FRAGA, M. E.; CAVAGLIERI, L. R.; DIREITO, G. M.; KELLER, K. M.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, n. 162, p. 355-362, 2006.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Criterios de salud ambiental Micotoxinas**. Cidade do México: OPS, n. 11, p. 131, 1983.

ORTATALI, M.; OĞUZ, H., HATIPOĞLU, F.; KARAMAN, M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 61-68, 2004.

PARMAR, V. S.; JAIN S. C.; BISSHT K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, J.; WENGEL, C. E.; OLSEN, E.; BOLI, P. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, n. 46, p. 597-673, 1997.

PEROZO, F.; FERRER, J.; ALVARADO, M.; RICÓN, H.; MAVAREZ, Y.; GIL, M. Valores hematológicos em pollos de engorde expuestos de forma continua a bajas dosis de aflatoxina B<sub>1</sub> em el estado Zulia, Venezuela. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. 13, n. 1, p. 59-64, 2003.

PIYACHATURAWAT, R.; GLINSUKON, T.; TOSKULKAO, C. Acute and Subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. **Toxicology Letter**, n. 16, p. 351-359, 1983.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rat. **Nutrition Research**, n. 21, p. 1309-1314, 2001.

POHLAND, A. E.; WOOD, G. E. Occurrence of mycotoxins in foods. In: **Mycotoxins in food**. London: Academic Press Inc., p. 35-64, 1987.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells in mice. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 19, p. 703-708, 2002.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A. G; REYS, J.L. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 125, p. 265-272, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, M. J.; MOORE, K. P. **Farmacologia**, 5<sup>a</sup> ed. Editora: Elsevier, p. 121-136, 2004.

REEN, K. R.; WIEBEL, J. F.; SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B<sub>1</sub>-induced cytotoxicity and and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 165-173, 1997.

RIBEIRO, J. M. M.; ROSA, C. A. R.; CURVELLO, F. A.; FRAGA, M. E. Toxigenic mycoflora and mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) in poultry feed in Rio de Janeiro, Brazil. In: **Internacional IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins**, São Paulo, p.133, 2000.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M.. Mycotoxin research in Brazil: the decada in review. **Brazilian Journal Microbiology**, v.33, p. 1-11, 2002.

ROSTAGNO H. S. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. **Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2<sup>a</sup> ed. Viçosa, Minas Gerais – Brasil, 186 p., 2005.

SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos, rações animais no período de 1971 a 1979. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 40, n. 2, p. 153-158, 1980.

SANTIN, E. Micotoxicoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: **FACTA**, p. 379-388, 2000.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.1, Campinas jan./abr., 2000.

SCOTT, W. P.; MCKIBBEN, G. H. Toxicity of black pepper extract to boole weevils. **Journal of Economic Entomology**, n. 71, p. 343 -344, 1978.

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISCKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clinic Chimica Acta**, v. 50, p. 73-78, 2004.

SHARMA, J. M. Effect of infectious bursal disease virus on protection against Marek's disease by turkey herpesvirus vaccine. **Avian Diseases**, v. 28, p. 629-640, 1984.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T. M. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medicine**, n.64, p. 353-356, 1998.

SMITH, J. E.; ROSS, I. C. The toxigenic Aspergilli. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and Animal Food**. London: CRC Press, p. 31-61, 1991.



- SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenona and sterigmatocystin in some Brazilian foods by multitoxin thin layer chromatographic method. **Journal of the Association of Analytical Chemists**, v. 72, p. 22-26, 1989.
- SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. J. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **Journal Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 339-46, 2004.
- TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA C. A. F.; CARDOSO A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B<sub>1</sub> e fumonisina B. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, Santa Maria, June, 2006.
- TUNG, H.T.; COOK, F. W.; WYATT, R. D.; HAMILTON, P. B. The anemia caused by aflatoxin. **Poultry Science**, v. 54, p. 1962-1969, 1975.
- VIEIRA, S. L. Micotoxinas e produção de ovos. In: **I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves**, p. 65 -80, Curitiba – PR, 1995.
- VIRINDER, S. P.; SUBASH, C. J.; KIRPAL, S. B.; RAJANI, J. Phytochemistry of genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.
- WEIBIKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; ROTHINGHAUS, G. G. individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub> and aflatoxina B<sub>1</sub>. **Poultry Science**, v. 73, p. 1547-1525, 1994.
- WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica. Internationales Magazin für Slutforschung**, Leipzig, v. 51, p. 31, 1933.
- WOOD, G. E. Mycotoxins in foods in the United States. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3941-3949, 1992.
- WYATT, R. D. **Effect of aflatoxin on broiler breeders**. ISA vedette Informer, v. 3, n. 1, p. 1-3., 1991.
- WYLLIE, T. D.; MOREHOUSE, L. G. Mycotoxicoses of domestic and laboratory animals, poultry, and aquatic invertebrates and vertebrates. In: Dekker, M. **Mycotoxic fungi, mycotoxins, micotoxicoses**, Nova York.,v. 2, p. 128, 1978.

## Anexo 01

**Temperatura ambiental referente ao primeiro ensaio no período de 29 de abril a 20 de maio de 2006.**

<b>Dia</b>	<b>T°</b>	<b>T° mínima</b>	<b>T° máxima</b>
29/abril	22 °C	22° C	32 °C
30/abril	24 °C	22 °C	28 °C
01/maio	24 °C	21 °C	27 °C
02/maio	25 °C	21 °C	30 °C
03/maio	25 °C	21 °C	32 °C
04/maio	22 °C	21 °C	30 °C
05/maio	20 °C	17 °C	24 °C
06/maio	21 °C	17 °C	26 °C
07/maio	20 °C	17 °C	25 °C
08/maio	21 °C	18 °C	23 °C
09/maio	23 °C	19 °C	25 °C
10/maio	22 °C	20 °C	26 °C
11/maio	21 °C	22 °C	25 °C
120/maio	21 °C	20 °C	24 °C
13/maio	21 °C	17 °C	26 °C
14/maio	22 °C	18 °C	26 °C
15/maio	20 °C	18 °C	25 °C
16/maio	20 °C	16 °C	24 °C
17/maio	20 °C	18 °C	25 °C
18/maio	20 °C	15 °C	23 °C
19/maio	25 °C	15 °C	30 °C
20/maio	19 °C	16 °C	25 °C

## Anexo 02

**Temperatura ambiental referente ao segundo ensaio no período de 29 de julho a 19 de agosto de 2006.**

<b>Dia</b>	<b>T°</b>	<b>T° mínima</b>	<b>T° máxima</b>
29/julho	22 °C	16 °C	26 °C
30/julho	21 °C	13 °C	25 °C
31/julho	22 °C	12 °C	25 °C
01/agosto	21 °C	12 °C	24 °C
02/agosto	24 °C	14 °C	25°C
03/agosto	21 °C	12 °C	22 °C
04/agosto	20 °C	12 °C	20 °C
05/agosto	23 °C	18 °C	25 °C
06/agosto	25 °C	18 °C	27 °C
07/agosto	25 °C	20 °C	30 °C
08/agosto	29 °C	19 °C	31 °C
09/agosto	30 °C	21 °C	33 °C
10/agosto	27 °C	23 °C	33 °C
11/agosto	32 °C	18 °C	35 °C
12/agosto	26 °C	19 °C	30 °C
13/agosto	30 °C	23 °C	32 °C
14/agosto	26 °C	22 °C	34 °C
15/agosto	31 °C	23 °C	35 °C
16/agosto	25 °C	22 °C	35°C
17/agosto	31 °C	27 °C	33 °C
18/agosto	22 °C	22 °C	27 °C
19/agosto	24 °C	22 °C	28 °C

### Anexo 03

#### Composição porcentual da dieta pré-inicial (0-7 dias de idade)

<b>Ingredientes</b>	<b>Composição</b>
Milho (7,46% PB) <sup>1</sup>	51,935
Farelo de Soja	41,506
Calcário Calcítico	1,190
Óleo de soja	2,392
Fosfato monobicálcico	1,803
Sal comum	0,510
DL-Metionina	0,303
Mistura Mineral-vitamínica <sup>2</sup>	0,120
Cloreto de Colina	0,042
Total %	100

<b>Nutrientes</b>	<b>Composição Calculada</b>
Proteína Bruta (%)	23,2328
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	2,9250
Sódio (%)	0,2210
Cálcio (%)	0,9310
Fósforo disponível (%)	0,4660
Metionina (%)	0,6536
Metionina+ Cistina (%)	1,0190
Lisina (%)	1,4350
Treonina (%)	0,9050
Triptofano (%)	0,2885
Ácido Linoleico	2,5825

<sup>1/</sup> Valor determinado no laboratório de Nutrição Animal da UFRRJ,

<sup>2/</sup> Níveis de garantia por kg de produto: ferro: 60000 mg; cobre:13000 mg; manganês: 120000; zinco: 100000 mg; iodo: 2500 mg; selênio: 500 mg e excipiente q.s.p.: 1000 g; Vit. A: 6000000 UI; Vit D<sub>3</sub>: 2000000 UI; Vit E: 12000 mg; Vit K<sub>3</sub>: 800 mg ; Vit B<sub>1</sub>: 1000 mg ; Vit B<sub>2</sub>: 4500 mg ; Vit B<sub>6</sub>: 1500 mg ; Vit B<sub>12</sub>: 12000 mg; niacina: 30000 mg; pantotenato de cálcio: 10000 mg; ác fólico: 550 mg; biotina: 50 g; antioxidante: 5000 mg; excipiente q.s.p.: 1000 g

## Anexo 04

### Composição porcentual da dieta inicial (8- 21 dias de idade).

<b>Ingredientes</b>	<b>Composição</b>
Milho (7,4% PB) <sup>1</sup>	57,464
Farelo de Soja (48,2%) <sup>1</sup>	36,523
Óleo de soja	2,275
Calcário Calcítico	0,839
Fosfato monobicálcico	1,818
Sal comum	0,489
DL-Metionina	0,197
Mistura Mineral <sup>2</sup>	0,100
Mistura Vitamínica <sup>3</sup>	0,100
Cloreto de Colina	0,050
Coccidiostático 2006	0,040
Promotor 2006	0,013
Total %	100
<b>Nutrientes</b>	<b>Composição Calculada</b>
Proteína Bruta (%)	21,2087
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	2.9800
Sódio (%)	0,2130
Cálcio (%)	0,8780
Fósforo disponível (%)	0,4390
Metionina (%)	0,5260
Met + Cistina (%)	0,8710
Lisina (%)	1,2270
Treonina (%)	0,8340
Triptofano (%)	0,2609
Ácido Linoleico	2,5891
Fibra Bruta (%)	3,2827

<sup>1/</sup> Valor determinado no laboratório de Nutrição Animal da UFRRJ.

<sup>2/</sup> Níveis de garantia por kg de produto: ferro: 60000 mg; cobre: 13000 mg; manganês: 120000; zinco: 100000 mg; iodo: 2500 mg; selênio: 500 mg e excipiente q.s.p.: 1000 g

<sup>3/</sup> Níveis de garantia por Kg do produto: Vit. A: 6000000 UI; Vit D<sub>3</sub>: 2000000 UI; Vit E: 12000 mg; Vit K<sub>3</sub>: 800 mg ; Vit B<sub>1</sub>: 1000 mg ; Vit B<sub>2</sub>: 4500 mg ; Vit B<sub>6</sub>: 1500 mg ; Vit B<sub>12</sub>: 12000 mg; niacina: 30000 mg; pantotenato de cálcio: 10000 mg; ác fólico: 550 mg; biotina: 50 g; antioxidante: 5000 mg; excipiente q.s.p.: 1000 g

## Anexo 05

**Composição do meio de cultura utilizado no isolamento do fungo toxigênico para produção de micotoxinas.**

<b>ÁGAR Extrato de Levedura Sacarose ( YESA)</b>	
Extrato de Levedura	20 g
Sacarose	150 g
Agar	15 g
Água destilada	1 L

## Anexo 06

### Composição da solução de Natt e Herrick (1951).

<b>Solução de Natt e Herrick</b>	
Cloreto de sódio (Na Cl)	3,88 g
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2,50 g
Fosfato dissódico 12 hidrato (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O)	2,91 g
Fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,25 g
Formalina (37%)	7,50 mL
Violeta de Metila 2B	0,10 g
<b>pH final</b>	<b>7,3</b>

Dissolver em água destilada e diluir para um volume total de 1.000 mL em um frasco volumétrico. Após ficar em repouso por 24 horas, filtrar a solução através de um filtro de papel fino (Whatman No. 2).