



UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**AÇÃO DA PIPERINA SOBRE A INTOXICAÇÃO
EXPERIMENTAL DE RATOS POR AFLATOXINAS**

THALITA GAGINI BRAGA

2007



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

DISCENTE: THALITA GAGINI BRAGA

ORIENTADORA: Dra. MARIA DAS GRAÇAS DANELLI, PROF. ASSOCIADO DMIV/IV, UFRuralRJ.

CO-ORIENTADORA: Dra. GLÓRIA MARIA DIREITO, PROF. ADJUNTO DMIV/IV UFRuralRJ.

Projeto de dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Microbiologia Veterinária, Área de Concentração em Imunologia Veterinária.

Seropédica, Rio de Janeiro

636.0896079
B813
T

Braga, Thalita Gagini, 1982-
Ação da piperina sobre a intoxicação
experimental de ratos por aflatoxinas /
Thalita Gagini Braga. - 2007.
51 f.

Orientadora: Maria das Graças Danelli.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.
Inclui bibliografia.

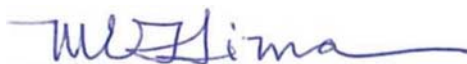
1. Imunologia veterinária - Teses. 2.
Aflatoxina - Teses. 3. Experiência com
animais - Teses. 4. Toxicologia
experimental - Teses. I. Danelli, Maria
das Graças, 1962. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Instituto de Veterinária. III. Título.

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

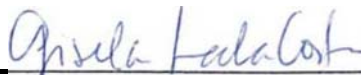
THALITA GAGINI BRAGA

Dissertação submetida a UFRRJ como requisito parcial para obtenção do grau de *Magister Scientiae* em Microbiologia Veterinária, Área de Concentração em Imunologia Veterinária.

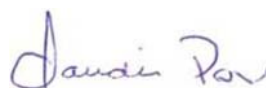
APROVADA EM 054/03/2007.



Marco Edilson Freire Lima, (Dr.) UFRRJ.



Gisela Lara da Costa, (Dra.) FIOCRUZ.



Claudia Rodrigues Pozzi, (Dra.) A.P.T.A./S.P.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Que em meus sonhos e preces sempre se fez real. Meu mais profundo e sentido agradecimento, por me dar à força e a coragem necessárias para sempre seguir em frente, sem deixar que a crítica do passado compromettesse as vitórias futuras. Obrigada pela capacidade de superar os obstáculos e me sair melhor deles.

Aos meus pais

Que me deram a vida, me ensinaram a viver com dignidade e me incentivaram todo o tempo neste desafio, estando incondicionalmente ao meu lado. A eles que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação, aplacando meus medos e inseguranças. A minha família, por compartilhar comigo meus sonhos e ideais, durante estes dois anos, e por todos os que antecederam estes, incentivando-me a prosseguir na jornada. Faltam palavras para descrever a gratidão que tenho por vocês. Os amo!

A toda equipe

A todos que trabalharam ao meu lado, em cada momento. A toda equipe de estagiários, colegas de mestrado e professores, que acompanharam o desenvolvimento do projeto, me apoiaram nos momentos mais difíceis e não faltaram nos dias mais pesados de trabalho. A todos que, quando poderiam ter sido apenas colegas, foram verdadeiros amigos. Muito obrigada pela dedicação!

Por fim agradeço a todos que, neste momento tão importante de minha vida, compartilham da felicidade e realização que estou sentindo.

RESUMO

GAGINI, Thalita Braga. **Ação da piperina sobre a intoxicação experimental de ratos por aflatoxinas**. Seropédica: UFRRJ, 2007. 51p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária)

A piperina (1-piperoil piperidina), principal amida constituinte da pimenta preta (*Piper nigrum* Linn.) e da pimenta longa (*P. longum* Linn.), apresenta diversos efeitos farmacológicos e bioquímicos, como a inibição de enzimas do metabolismo hepático, interferindo na biotransformação de xenobióticos e substâncias pró-carcinógenas ativadas pela via do citocromo P450. A literatura descreve a piperina como sendo capaz, *in vitro*, de diminuir a citotoxicidade e a genotoxicidade da aflatoxina B₁ em células de ratos, através da competição pelo citocromo P450. Devido à importância da contaminação de grãos por aflatoxinas, este trabalho teve como objetivo verificar a capacidade da piperina em diminuir, *in vivo*, os danos causados por essas toxinas. Inicialmente, grupos de ratos da linhagem LOU-M foram inoculados, via oral, com diferentes doses de piperina (1,12; 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal), visando avaliar a toxicidade dessa amida no modelo animal empregado. Parâmetros como: ganho de peso, análises anatomopatológica e histopatológica, além das alterações nos valores hematológicos foram investigados. A dose de 1,12 mg/kg de peso corporal de piperina demonstrou ser segura nos ensaios biológicos e foi empregada nos ensaios de intoxicação experimental de ratos com aflatoxinas. Três grupos de ratos foram inoculados com piperina (1,12 mg/kg de peso corporal), aflatoxinas (72 µg/100g de peso corporal) e, piperina + aflatoxinas, sendo avaliados os mesmos parâmetros acima descritos. A piperina foi capaz de interferir na toxicidade das aflatoxinas, *in vivo*, diminuindo de forma acentuada as lesões histopatológicas evidenciadas nos animais intoxicados e, revertendo de forma significativa a imunossupressão mediada pelas aflatoxinas.

Palavras chave: aflatoxinas, piperina, intoxicação experimental, ratos.

ABSTRACT

GAGINI, Thalita Braga. **Effect of piperine on experimental intoxication by aflatoxins in rats**. Seropédica: UFRRJ, 2007. 51 p. (Dissertation, Veterinary Microbiology Msc.)

Piperine (1- piperoyl piperidine) main black pepper (*Piper nigrum* Linn.) and long pepper (*Piper longum* Linn.) alkaloid presents several pharmacological and biochemical effects as enzymes inhibition from hepatic metabolism interfering on xenobiotics and pro-carcinogenic substances biotransformation activated by P-450 cytochromo cycle. According to the scientific bibliography reports, piperine has been able "*in vitro*" for decreasing cytotoxicity as well as aflatoxin B 1 genotoxicity on mice cells through the competition by P-450 cytochromo. Due to the importance of grains contamination by aflatoxinas, this survey had as proposal to verify piperine ability for decreasing "*in vivo*" some damages caused by these toxins. On first, at different piperine doses (1,12; 2,25 and 4,50 mg/Kg) Lou-M strain rats groups were inoculated by oral administrated to evaluated this amide toxicity on animal pattem. Parameters as: weight gain, anatomopathological and histopathological analyses beyond changes on hematological values have been researched. Piperine doses (1,12 mg/Kg) has showed to be appropriate as well as safe on biological assays and it has been used on rats experimental intoxication assays by aflatoxins. Three rats groups were inoculated with piperine (1,12 mg/Kg), aflatoxins (72 g/100 g) as well as piperine + aflatoxins according to the sarne parameters above described. Piperine has been able for interfering "*in vivo*" on aflatoxins toxicity, conspicuously decreasing histopathological injuries on intoxicated animais and significantly retuming immunosupression mediated by aflatoxins.

Key-words: aflatoxins, piperine, experimental intoxication, rats.

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Influência da administração oral de diferentes doses de piperina, em ratos, sobre o ganho médio de peso e peso médio do fígado, baço e timo.	16
Tabela 2	Lesões histopatológicas observadas nos grupos de animais inoculados por via oral, com diferentes doses de piperina.	17
Tabela 3	Influência da administração oral de diferentes doses de piperina em ratos, sobre os valores médios de hemácias, leucócitos e contagem diferencial de leucócitos.	18
Tabela 4	Interferência da piperina no ganho médio de peso e peso médio do fígado e rim em animais inoculados, por via oral, com piperina, aflatoxinas ou piperina + aflatoxinas.	20
Tabela 5	Lesões histopatológicas observadas no fígado de ratos inoculados com piperina, aflatoxinas e piperina + aflatoxinas	21
Tabela 6	Efeito da intoxicação de ratos com aflatoxinas na dosagem sérica das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina.	24

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	Delineamento experimental para teste de concentrações de piperina.	13
Quadro 2	Delineamento experimental para teste de intoxicação por aflatoxinas	14

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ .	3
Figura 2	Metabolismo da Aflatoxina B, (World Health Organization, 1979).	5
Figura 3	Fotos A e B. Foto A - Pimenta negra e B - Pimenta longa.	6
Figura 4	Estrutura química da piperina.	7
Figura 5	Fotos A e B - Ratos da linhagem LOU-M empregados como modelo experimental.	11
Figura 6	Fotos dos resultados do exame dos cortes histopatológicos, de 1 a 14. Alterações histopatológicas no fígado de ratos que receberam por via oral, o veículo (1 e 2), a piperina (3 e 12), a aflatoxina (4 a 9) e piperina + aflatoxina (10, 11, 13 e 14)	22
Figura 7	Efeito da piperina sobre a leucopenia induzida através da intoxicação de ratos com aflatoxinas.	25
Figura 8	Efeito da piperina (1,12 mg/kg) nos valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos.	26
Figura 9	Efeito da administração oral da piperina e/ou aflatoxinas sobre o número de leucócitos antes (barras vazias) e depois da inoculação (barras cheias).	27

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS OU SÍMBOLOS.

$\mu\text{g}/1000\text{g}$ – Micrograma por cada cem gramas de peso corporal

ad libitum – À vontade.

AFB₁ – Aflatoxina B₁

AFB₂ – Aflatoxina B₂

ALT – alanina aminotransferase

AP – fosfatase alcalina

AST – aspartato aminotransferase

B₁ – B = blue (cor da fluorescência) 1 = referente à mobilidade cromatográfica

B₂ – B = blue (cor da fluorescência) 2 = referente à mobilidade cromatográfica

CCD – cromatografia de camada delgada

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CMI – concentração mínima inibitória

CYP 4502B₁ – Citocromo P quatrocentos e cinqüenta, dois B₁ - referente a especificidade pela aflatoxina B₁

DMSO – dimetilsulfóxido

DTH – delayed-type hypersensitivity / hipersensibilidade de tipo tardio

EDTA – Ethylene Diamine Tetracetic Acid / cido etilenodiamino tetra-acético

FAO – Food and Agriculture Organization

G₁ – G = green (cor da fluorescência) 1 = referente à mobilidade cromatográfica

G₂ – G = green (cor da fluorescência) 2 = referente à mobilidade cromatográfica

IARC - International Agency for Research in Carcinogenesis (Agência Internacional para Pesquisa de Carcingenos)

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mg/kg – Miligrama por quilograma

ng/kg – Nanograma por quilograma

P450 – citocromo P quatrocentos e cinqüenta

Pf – Ponto de fusão

S.E. – Desvio padrão

TNF- α – Interferon alfa

μl – Microlitro

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1. Aflatoxinas	2
2.2. Piperina	6
3. Justificativa	9
4. Objetivos	10
5. Material e Métodos	11
5.1. Modelo biológico	11
5.2. Metodologia	12
6. Resultados	16
6.1. Análise das diferentes concentrações de piperina no modelo experimental proposto	16
6.2. Ensaio de intoxicação com aflatoxinas	19
7. Discussão	28
8. Conclusões	33
9. Referências Bibliográficas	34
10. Anexos	40

Ação da piperina sobre a intoxicação experimental de ratos por aflatoxinas

1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, os quais se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, como feijão, milho, amendoim, arroz e trigo, entre outros. São conhecidos alguns compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂. Em saúde animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido. De modo análogo, em saúde pública, as aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados. Existem evidências de que outras doenças como a síndrome de *Reye* e o *kwashiorkor*, também são associadas as aflatoxinas.

A piperina (1-piperoil piperidina) é a principal amida constituinte da pimenta preta (*Piper nigrum* Linn.) e da pimenta longa (*P. longum* Linn.), as quais são usadas mundialmente como temperos e como componentes em medicamentos empregados na medicina alternativa para o tratamento de asma e bronquite, entre outras doenças. Essa amida natural exerce diversos efeitos farmacológicos e bioquímicos, que resultam em ações: antiparasitária, inseticida, antipirética, analgésica, antiinflamatória, contraceptiva, antiespermatogênica e atua na inibição de enzimas do metabolismo hepático. Uma das funções mais investigadas é sua interferência na biotransformação de xenobióticos e substâncias pró-carcinógenas.

A interferência da piperina no mecanismo de ação das aflatoxinas ainda é pouco estudada. A pesquisa conduzida por Reen e colaboradores, em 1997, evidenciou que a piperina, *in vitro*, foi capaz de diminuir significativamente a toxidez da aflatoxina B; em hepatócitos de ratos, através da competição pelo citocromo P450.

Devido à importância da contaminação de diversos grãos por aflatoxinas e das evidências, *in vitro*, que a piperina oferece um potente efeito quimiopreventivo contra a ativação de pró-carcinogênicos, este trabalho busca verificar a capacidade da piperina em diminuir, *in vivo*, os danos causados por essas toxinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aflatoxinas

Micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos que contaminam alimentos e rações. A sua ingestão pode resultar em doença e morte em animais, e também no homem (HAYES, 1981). As doenças causadas pelas micotoxinas são chamadas micotoxicoses e geralmente são classificadas de acordo com os sintomas resultantes da ingestão (SMITH; MOSS, 1985). A micotoxicose clássica em humanos é o ergotismo, que durante os séculos IX e X causou numerosos surtos de gangrena ergótica, resultando em amputação de membros e morte. A Ordem de Santo Antonio foi estabelecida no século XI para prover hospitais para aqueles acometidos por esta condição. Apenas por volta de 1850 a doença foi associada com o consumo de cereais, especificamente centeio, contaminado com o fungo *Claviceps purpurea* (SMITH; MOSS, 1985; BENY, 1988).

Através dos anos, tem havido numerosos surtos de diferentes micotoxicoses em humanos e animais que tendem a ser endêmicas em certas áreas. Exemplos incluem a doença do arroz amarelo no Japão e o eczema facial de ovelha na Nova Zelândia.

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 freqüentes; predominam os efeitos crônicos que não despertam a atenção do clínico. Menos evidentes, porém mais significativas do ponto de vista econômico, são as perdas devido às intoxicações subagudas causadas por baixos níveis da toxina. Mesmo em baixos níveis as aflatoxinas interferem na resposta imunológica, tornando os animais mais suscetíveis às doenças infecciosas e parasitárias e diminuindo a competência imunológica às vacinações (CRUZ, 1995).

Embora 20 compostos, todos designados como aflatoxinas, tenham sido isolados, o termo, usualmente refere-se a quatro metabólitos deste grupo de bifuranocumarinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, entre outros. Elas foram nomeadas B₁, B₂, G₁, G₂, todas de ocorrência natural. Estes quatro compostos são distinguíveis pela cor de sua fluorescência, sob luz ultravioleta (B = blue ou azul e G = green ou verde), com o número subscrito relacionado à sua mobilidade cromatográfica. A aflatoxina B, é encontrada em maior concentração. *Aspergillus flavus* produz apenas AFB₁ e AFB₂, enquanto *Aspergillus parasiticus* produz além destes, compostos adicionais.

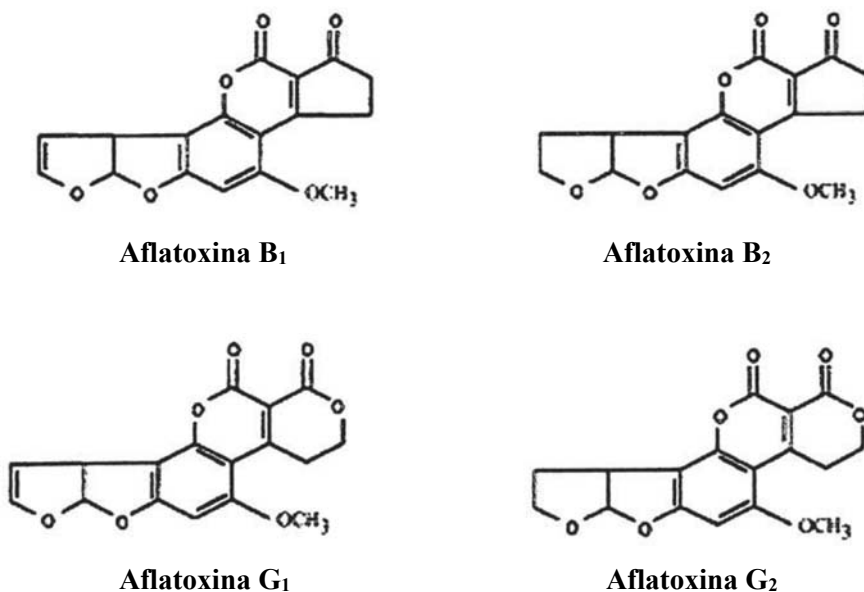


Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, (McLEAN, 1995).

Do ponto de vista da toxicologia, a aflatoxina pode ser considerada como uma ameaça quadrupla - uma potente toxina, um mutágeno, um teratógeno e um carcinógeno (UENO; UENO, 1978). A toxidez letal da AFB₁ varia em diferentes espécies animais, de extremamente susceptíveis (trutas, patos perus, cães, coelhos, ovelhas e ratos) a resistentes (macacos, galinhas e camundongos). As aflatoxinas têm sido relacionadas à formação de aductos em DNA e com o desenvolvimento de câncer extra-hepático.

A hipótese de associação causal entre a ingestão de aflatoxinas e o desenvolvimento de enfermidades humanas continua sendo objeto de controvérsias; mesmo assim, desde a descoberta das aflatoxinas, em 1960, diversos países adotaram limites de tolerância para essas toxinas em produtos destinados ao consumo humano. No Brasil, foi estabelecido em 1996, o limite de 20 µg/kg de peso corporal, para a soma das frações B₁ e G₁, onde AFB₁ ≤ 15 g/kg, em qualquer tipo de alimento, conforme determina a resolução 54/96 (MAPA, 2002). Desconhece-se, contudo, se este valor ainda representa ou não risco significativo para o desenvolvimento do câncer hepático. Na última década, porém, intensas pesquisas contribuíram para melhor caracterizar os possíveis efeitos das aflatoxinas sobre a saúde humana, com destaque para os experimentos sobre a atividade biológica da AFB₁ nas células hepáticas, no âmbito molecular, e sua aplicação em estudos populacionais (MCLEAN, 1995).

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas. Estas enzimas pertencentes à superfamília das enzimas do citocromo P-450 e suas isoformas constituem parte do processo de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo. A biotransformação da AFB₁ tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica. Existe atualmente consenso, entre os especialistas, de que a AFB₁ é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (SWENSON et al, 1974)

Quando um alimento contaminado por aflatoxinas é consumido, estas são metabolizadas no fígado e produzem a formação de um metabólito intermediário altamente reativo. A ligação deste metabólito ao DNA resulta na ruptura da transcrição e em uma proliferação anormal de células, guiando a mutagênese e carcinogênese (GUENGERICH, 2001). Patterson (1973) traçou a trilha de biotransformação da AFB₁ em células susceptíveis. Após o transporte através da membrana plasmática, a molécula é ativada por mono-oxigenases microssomais de função mista para formar AFB₁-8,9-epóxido que, por sua vez, pode se ligar ao DNA nuclear resultando em dano celular.

A AFB₁ pode ser também reversivelmente convertida por uma NADPH-redutase a aflatoxicol. O aflatoxicol então pode atuar tanto como um assimilador quanto como reservatório para AFB₁ (PATTERSON, 1973). O sistema microssomal de mono-oxigenases é também responsável por transformar a AFB₁ em moléculas polares tal como AFM, e AFP, que podem ser eliminadas pelos hepatócitos, mas o epóxido pode vir a se ligar a ácidos nucleicos e proteínas e é convertido na forma carcinogênica da AFB₁ (SWENSON *et al.*, 1974)

A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxidez das aflatoxinas. Esta capacidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação a AFB₁ em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas. Nesses animais, as aflatoxinas induzem a formação de carcinoma hepatocelular, mesmo quando ingerida em quantidades tão baixas quanto 0,2 ng/kg de peso corpóreo (CASTEGNARO *et al.*, 1991; CREPPY *et al.*, 1993), o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais, sendo em 1993, classificada como químico carcinógeno de classe I pela IARC (International Agency for Research in Carcinogenesis, 1993). Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como o pâncreas e intestino, tem sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas, sendo também associada ao aparecimento de tumores primários e metástases (STONER *et al.*, 1982).

Estudos demonstraram que múltiplas isoformas do citocromo P 450 podem ativar a aflatoxina B₁ (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6 e CYP3A4), mas com potencial mutagênico reduzido se for transformada, por exemplo, pelo CYP2B6. Experimentos de imunoinibição e de inibição química tem indicado que as isoformas CYP1A2 e CYP3A são os maiores responsáveis pela ativação deste promutágeno no fígado (CRESPI, *et al.* 1997).

As aflatoxinas também têm sido estudadas por enfraquecer o sistema imunológico. Geralmente, a inibição da síntese de proteínas pode resultar em alterações na concentração de proteínas no soro, guiando a supressão de substâncias humorais não-específicas. Quanto à imunidade inata, as aflatoxinas podem ter um efeito imunossupressivo sobre macrófagos depois a exposição *in vivo*, a qual foi relacionada à redução da atividade antitumoral (MOON, 1999). As aflatoxinas inibem fortemente a produção de interferon alfa, interleucina 1 e 6 e a habilidade fagocítica dos macrófagos (MOON, 1999).

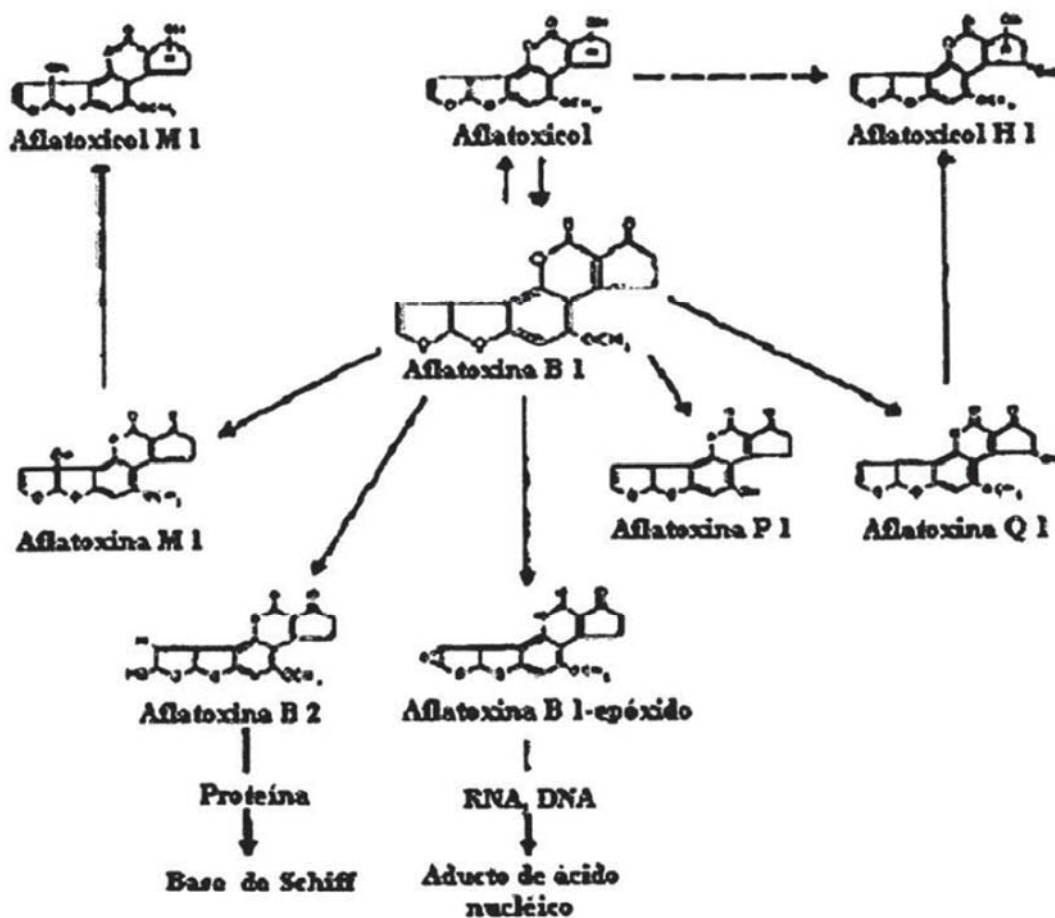


Figura 2. Metabolismo da Aflatoxina B₁ (World Health Organization, 1979).

Existem evidências concretas que sugerem que as aflatoxinas suprimem a função imune por afetar a imunidade dependente de células T em várias espécies animais. Estudos com ratos, coelhos e camundongos reforçam estes achados (RAJSUDDIN *et al.*, 1990 e 1993). A imunossupressão pela toxina pode resultar de vários mecanismos tais como diminuição da concentração protéica ou síntese de DNA, mudança ou perda de atividade enzimática e mudanças no metabolismo ou ciclo celular, o que podem resultar em necrose individual de células ou necrose (CUSUMANO *et al.*, 1995 e 1996; DUGYALA; SHARMA, 1996). Doses subagudas de AFB, em porcos da guiné podem resultar em deficiência de complemento (THURSTON *et al.*, 1972). Em altas doses, AFB, reduz os níveis de imunoglobulina G e A, guiando a uma deficiência de imunidade adquirida. Pier (1992) reportou que as micotoxinas podem reduzir a eficácia da imunidade adquirida durante a vacinação.

Doenças secundárias relacionadas a micotoxinas podem resultar do enfraquecimento do sistema imune. Animais mostraram aumento da suscetibilidade à candidíase, coccidiose, salmonelose e deficiência imunológica geral. Assim, as micotoxinas podem predispor os animais a doenças infecciosas, resultando em decréscimo de produtividade (PESTKA; BONDY, 1990) e possibilidade de mortalidade como resultado de complicações.

2.2. Piperina

A utilização de plantas com fins terapêuticos, para tratamento, cura ou prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início dos anos 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993).

Muitos autores têm discutido a importância e o potencial de plantas medicinais como fonte de novos agentes terapêuticos (CORDELL *et al.*, 2001). Mendelsohn e Balick (1995) concluíram que existem 375 mil plantas de importância farmacêutica nas florestas do mundo, das quais apenas 1/8 teriam sido descobertas. A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação são um desafio para a ciência.

O gênero *Piper* pertence à família *Piperaceae* que apresenta cerca de 700 espécies. As espécies do gênero *Piper*, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, são usadas medicinalmente para fins diversos. As espécies do gênero *Piper* apresentam importância comercial e econômica por serem pimentas usadas, mundialmente, como temperos picantes. (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

Os registros mais antigos do consumo de pimentas datam de aproximadamente nove mil anos, resultado de explorações arqueológicas em Tehuacán, no México. Outros sítios arqueológicos pré-históricos (2500 a.C.) são conhecidos no Peru, nas localidades de Ancon e Huaca Prieta.

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) é uma planta trepadeira originária da Índia. É a mais importante especiaria comercializada mundialmente e é usada em larga escala como condimento, e também em indústrias de carnes e conservas.

O Brasil é um dos maiores produtores de pimenta-do-reino, oscilando entre a segunda e terceira posição no mercado mundial. Das 50 mil toneladas por ano, o País exporta 45 mil, principalmente para a Europa e para os Estados Unidos.



Figura 3 – Foto A - Pimenta negra e B - Pimenta longa.
(fotos tiradas pelo Prof. Gilberto de Andrade Fraife Filho, Ceplac/Cepec).

A piperina foi a primeira amida isolada do gênero Piper. Esta previne a carcinogênese de estômago e fígado induzida por carcinógenos químicos (KHAJURIA *et al.*, 1998) e protege da citotoxicidade induzida por aflatoxina B₁ (AFB₁) e genotoxicidade em células de hepatoma de rato H4IIEC3 (SINGH *et al.*, 1994). A piperina foi um agente não genotóxico quando ensaiado no teste de Ames usando *Salmonella typhimurium*, teste do micronúcleo, teste de anormalidades na forma do espermatozoide e teste de letalidade em camundongos suíços (KAREKAR *et al.*, 1996), mas inibe enzimas do metabolismo enzimático hepático (ATAL *et al.*, 1985), podendo assim causar alterações na sua biodisponibilidade.

A biodisponibilidade é uma característica das substâncias administradas a um sistema biológico intacto e pode ser definida como a quantidade e velocidade na qual o princípio ativo é absorvido a partir da forma farmacêutica e se torna disponível no sítio de ação (CARCAMO, 1982; LIEBERMAN *et al.*, 1990). Ela está intimamente relacionada com a absorção da substância ativa.

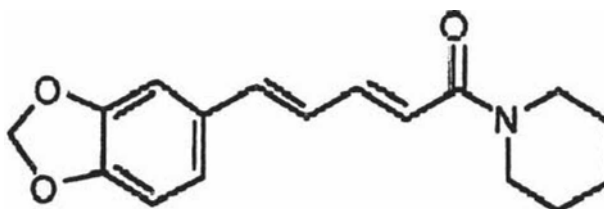


Figura 4. Estrutura química da piperina (LAMBERT, 2004).

Além disso, a piperina tem sido recentemente estudada quanto ao seu efeito inibitório na metástase de pulmão induzida por células de melanoma B16F-10 em camundongos (PRADEEP; KUTTAN, 2002), na estimulação, proliferação e diferenciação de melanócitos (VENKATASAMY *et al.*, 2004), toxicidade no ensaio de letalidade usando *Artemia sp* (PADMAJA *et al.*, 2002), efeito protetor em carcinogênese de pulmão induzida por benzo(a)pireno em camundongos suíços (SELVENDIRAN *et al.*, 2004) e atividades imunomodulatória e antitumoral (SUNILA; KUTTAN, 2004). A piperina também apresentou efeito inibitório na produção de óxido nítrico e TNF- α *in vitro* e *in vivo* (PRADEEP; KUTTAN, 1999), além de apresentar propriedades hipotensoras *in vivo* (DUARTE *et al.*, 2004) e efeito inibitório na monoamino oxidase (LEE *et al.*, 2005). Pradeep e Kuttan (2004) demonstraram que a piperina também é um inibidor do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e da expressão de genes de citocinas pro-inflamatórias em células de melanoma B16F-10, o que de acordo com os autores, pode explicar a atividade antimetastática da piperina.

A piperina também apresenta uma atividade contraceptiva em camundongos machos e ratos (MUNSHI; RAO, 1972). Ela inibe a fertilização de óvulos e espermatozoides *in vitro* por queda do influxo de cálcio dentro do espermatozoide, o que leva à inibição da reação do acrossomo (PIYACHATURAWAT *et al.*, 1991). Em fêmeas de rato, causa aborto quando administrada diversas vezes durante a gestação (MALINI, 1999).

Estudos sugerem que a piperina possui propriedades inibitórias contra a ciclooxigenase-1, uma importante enzima que atua na formação de prostaglandinas, as quais são importantes mediadores no desenvolvimento de doenças inflamatórias tal como o reumatismo (GLEITZ *et al.*, 1997; VENKATESHWARLU, 1997). Stohr comprovou com

seu trabalho em 2001 que a piperina, presente em vários extratos de pimenta testados, pode atuar não só como inibidor da ciclooxigenase-1, mas também da 5-lipoxigenase. Esta se constitui em outra enzima chave no metabolismo do ácido araquidônico, que é responsável pela formação de leucotrienos pró-inflamatórios que desempenham função fundamental na indução da asma (SMITH, 1996).

A piperina contrapõe-se ao citocromo P-450_{2B1} mediando a citotoxicidade e genotoxicidade da AFB₁ nas células por inibição de ativação da toxina e pode, desta forma, oferecer um potente efeito quimiopreventivo contra pró-carcinógenos ativados pela via do CYP 450_{2B1}. Ela age diretamente no citocromo, impedindo a atividade destas enzimas (REEN *et al.*, 1997).

Várias centenas de membros da família de isoformas da P-450 já são conhecidas, cada uma com diferente especificidade para o substrato. O citocromo P-450 é importante na hidroxilação de muitas drogas diferentes, como os barbituratos e outros xenobióticos, particularmente se elas são hidrofóbicas e relativamente insolúveis. A fase 1 do metabolismo, por meio de diversas reações, transforma compostos estranhos ao organismo em substâncias mais solúveis em água, o que permite sua eliminação na urina. Infelizmente, por esse mesmo processo, alguns compostos se convertem em substâncias tóxicas, subvertendo o sistema de detoxificação.

De uma forma interessante, Atal *et al.*, (1985), descreveram o aumento da biodisponibilidade de drogas e de alguns suplementos nutritivos pela piperina, por atuar inibindo o mecanismo de glicuronização no fígado e intestino delgado. A piperina aumenta a atividade de drogas como a nimesulide, por exemplo, por atuar como um potente inibidor de enzimas metabolizadoras da droga, como as isoformas do citocromo P 450, resultando em um aumento não-específico da sua biodisponibilidade. 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).

Foi reportado que o tratamento com a piperina aumentou a biodisponibilidade de Epigallocatequina-3-galato (EGCG) – a maior catequina componente do chá verde e talvez seu constituinte mais ativo – em camundongos. A administração intragástrica de 163.8 µmol/kg de EGCG e 70.2 µmol/kg de piperina a camundongos machos CF-1 aumentou o nível de C_{max} no plasma 1,3 vezes comparado com os animais tratados apenas com EGCG. A piperina provou aumentar a biodisponibilidade de EGCG por inibir a glicuronização e o trânsito gastrointestinal (LAMBERT, *et al.*, 2004).

A atividade imunomodulatória da piperina pode ser devida à ação combinada das respostas imunes celular e humoral. Sendo assim, a piperina pode atuar como um imunomodulador não-tóxico o qual possui também propriedades antitumorais (SUNILA, 2001).

Os efeitos da piperina sobre o sistema imunológico estão sendo investigados e demonstram resultados contraditórios na literatura, cabendo estudos mais aprofundados sobre o tema (DOGRA *et al.*, 2004; SUNILA *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICATIVA

Devido à importância da contaminação de grãos por aflatoxinas e das evidências, *in vitro*, de que a piperina oferece um potente efeito quimiopreventivo contra a ativação de pró-carcinogênicos, este trabalho busca verificar a capacidade da piperina em diminuir, *in vivo*, os danos causados por essas toxinas. A comprovação da ação da piperina sobre a metabolização das aflatoxinas pode apresentar uma excelente alternativa para sanar o problema de intoxicação por aflatoxinas, podendo esta ser usada como aditivo em ração e outro tipo de alimentos sujeitos à contaminação pelos fungos, apresentando a vantagem de ser um produto de origem natural, de baixo custo e fácil obtenção.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral: Avaliar a ação protetora da piperina sobre ratos intoxicados de forma prolongada com aflatoxinas.

4.2. Específicos:

4.2.1. Determinar a influência de diferentes doses de piperina sobre os parâmetros físicos (peso), hematológicos e bioquímicos;

4.2.2. Analisar a toxidez de diferentes concentrações de piperina através de exames histopatológicos;

4.2.3. Determinar a capacidade tóxica e imunossupressora das aflatoxinas no modelo experimental proposto;

4.2.4. Avaliar a interferência da piperina no processo de intoxicação prolongada das aflatoxinas nesse modelo experimental.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Modelo biológico

Foram utilizados 54 ratos machos, adultos jovens, da linhagem LOU-M (Figura 4) obtidos do Biotério do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense e mantidos no Biotério de Criação do Instituto de Veterinária, UFRRJ durante a semana de adaptação. Durante os ensaios biológicos, os animais foram separados em grupos ($n \geq 6$) no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Veterinária, UFRRJ, sob condições ambientais padrão (temperatura controlada e ciclos de luz e escuridão de 12 h), recebendo ração adequada e água ad libitum. As doses de aflatoxinas e piperina foram calculadas diariamente de acordo com a variação de peso de cada animal. Os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia inalatória em câmpnula com éter. O manejo dos animais foi realizado seguindo os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento destes.

A ração oferecida aos animais foi avaliada quanto a uma possível contaminação por aflatoxinas. Um estudo de quantificação de aflatoxinas encontrada foi feito por meio de técnica de extração desenvolvida por Rodrigues e Amaya (2002) e posteriormente, este extrato foi submetido a uma análise por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo Direito (1989). De acordo com os resultados obtidos nesta quantificação foi excluída a hipótese de haver intoxicação incidental dos animais por meio de ração contaminada. O extrato provou estar livre da presença da citada toxina.

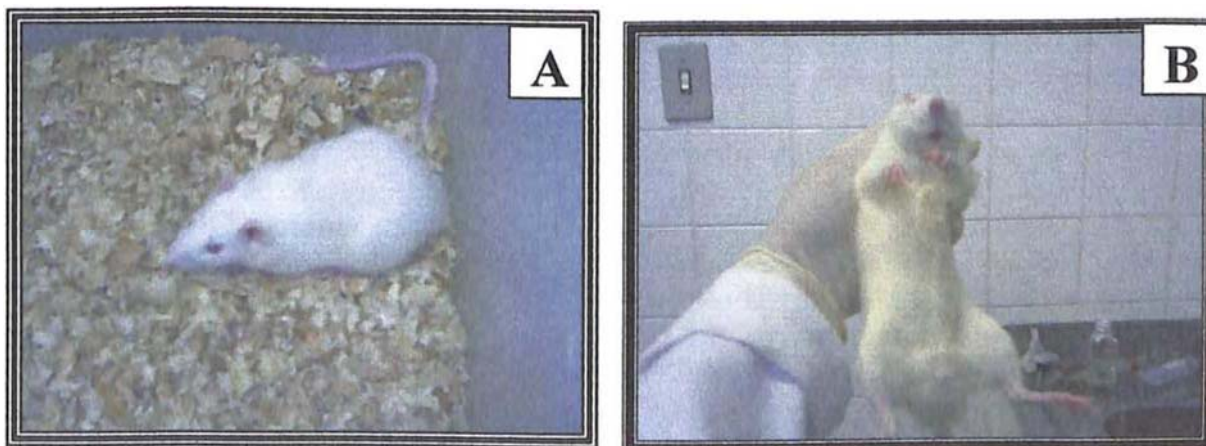


Figura 5. (Foto A e B) Ratos da linhagem LOU-M empregados como modelo experimental.

5.2. Metodologia

5.2.1. Obtenção e preparo da piperina

A piperina foi isolada à partir do pó dos frutos secos de *Piper nigrum* Linn., através de uma adaptação realizada sobre a metodologia descrita originalmente por Ikan (1991). A amida, em sua forma pura (pf: 125-126°C), foi obtida com rendimento em torno de 7% (RIBEIRO, 2004). Além da comparação do ponto de fusão, o produto natural foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ¹H, ¹³C, IV e EM), apresentando dados espectrométricos compatíveis com os descritos na literatura (IKAN, 1991). A piperina foi dissolvida em 1ml de 10% de DMSO/etanol 95% no momento do uso.

Para a preparação da solução de piperina nas diferentes concentrações, a amida dissolvida em dimetilsulfoxido DMSO/etanol foi diluída em solução salina tamponada, pH 7,2, misturada v/v em óleo de milho da marca Salada e vigorosamente homogeneizada, sendo administrada 200 l da mistura, por animal, via oral, através de seringa própria.

5.2.2. Obtenção e preparo das Aflatoxinas

As aflatoxinas foram produzidas à partir de cultivos, em meio YES (Anexo), da cepa de *Aspergillus parasiticus* CMDDB 0460, cedida pela *Fiocruz*, forte produtor de AFB₁, AFB₂, AFG₁, e AFG₂, mantidos por 11 dias em estufa à temperatura de 37°C. Após este período as culturas foram maceradas e então passaram por um processo de extração com clorofórmio (50 mL/ placa), filtradas em filtro de papel Whatman n° 1 e o extrato obtido foi concentrado até resíduo em rotoevaporador. Os extratos foram, posteriormente, diluídos em 1,0 mL de clorofórmio e analisados por cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 20 X 20 cm, que foram ativadas por 1 hora em temperatura de 120°C. Os extratos foram aplicados com micro-seringas, a uma distância de 1,0 cm entre cada aplicação. A fase móvel escolhida foi composta de tolueno:clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico 90%, na proporção de 70:50:50:20. A quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com sistema equipado com bomba Waters, modelo 510, injetor Rheodine (loop de 20l), detector de UV-Visível Merck-Hitachi modelo L-4250 e integrador Merck-Hitachi, modelo D-2500. Alíquotas dos extratos foram eluídas com a mistura acetato de etila:n-hexano (3:2.5, v/v) com fluxo de 1,5 ml/min em fase normal, com coluna Microsorb 4,6x15cm, 5µ, Varian®. A detecção foi realizada a 360nm, segundo Direito (1989).

Para a preparação da solução de aflatoxinas administrada aos animais, os resíduos dos extratos quantificados foram dissolvidos em óleo de milho comercial da marca Salada e homogeneizados em banho de ultra-som por 15 min. As soluções foram diluídas considerando a dose a ser administrada e mantendo o volume de 200µl (duzentos microlitros), a ser administrado por animal, por via oral, através de gavagem.

5.2.3. Procedimento Experimental

5.2.3.1. Análise de diferentes concentrações de piperina no modelo experimental proposto

Os ratos foram divididos em quatro grupos de seis animais, sendo diariamente pesados e inoculados com solução de piperina em diferentes concentrações (1,12; 2,25; 4,5 mg/kg de peso corporal), via oral, por 23 dias consecutivos, para escolha da dose de piperina que melhor se ajustava ao modelo animal. O grupo controle foi inoculado apenas com o veículo (10% de DMSO / Etanol a 95%), misturado a PBS e diluído em óleo de milho da marca Salada. As concentrações de piperina foram diluídas no mesmo veículo, sendo também acrescidas de PBS e óleo de milho. O sangue dos animais foi coletado com EDTA antes das inoculações e depois, durante a eutanásia, para a realização da leucometria, contagem diferencial de leucócitos e hematimetria. Após os 23 dias foi realizada a necropsia, e posteriormente coletados estômago, duodeno, jejuno, íleo, fígado e rins para avaliações histopatológicas, sendo o fígado e os rins pesados.

Quadro 1. Delineamento experimental para teste de concentrações de piperina.

Grupos	Piperina¹
Controle	0,00
A	1,12 mg/kg
B	2,25 mg/kg
C	4,50 mg/kg

¹. Animais inoculados com piperina por 23 dias consecutivos.

5.2.3.2. Ensaio de intoxicação com aflatoxinas

Os animais foram divididos em três grupos de dez (grupo P – 1,12 mg/kg de peso corporal de piperina; grupo A – 72g/100g de peso corporal de aflatoxinas e grupo P+A – piperina + aflatoxina), sendo diariamente pesados e inoculados, por via oral, conforme o Quadro 1. O sangue dos animais foi coletado no início do experimento por meio da veia caudal com EDTA e ao final do experimento, por meio de punção intra-cardíaca com e sem EDTA para a realização da leucometria, contagem diferencial, hematimetria e dosagem enzimática. Em seguida, procedeu-se a necropsia e posteriormente foram coletados o fígado e os rins para avaliação histopatológica. Os sinais de toxidez e morte dos animais foram observados por um período de 24 dias.

Quadro 2. Delineamento experimental para teste de intoxicação por aflatoxinas.

Grupos	Piperina¹	Aflatoxinas²
p	1,12 mg/kg	0
A	0	72 µg/100gr
P + A	1,12 mg/kg	72 µg/100gr

¹. Animais inoculados com piperina por 23 dias consecutivos.

². Animais inoculados com afla por 21 dias, a partir do 3º dia da inoculação com piperina.

P. piperina, A. aflatoxinas e P + A. Piperina + Aflatoxinas.

5.2.4. Metodologia de avaliação dos experimentos:

5.2.4.1. Variação de peso

Os animais foram submetidos à pesagem diária e de acordo com o peso médio de cada grupo foi calculada a dose de piperina ou aflatoxinas administrada. Ao final do experimento foi feita a avaliação estatística dos animais quanto ao ganho de peso.

5.2.4.2. Necropsia

A avaliação dos órgãos e vísceras foi feita em seguida à eutanásia, quando foi observada a presença de alterações macroscópicas de tamanho ou coloração dos órgãos e presença de lesões.

5.2.4.2. Histopatologia

Para realização dos exames histopatológicos os órgãos foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente esse material foi processado pelos métodos usuais, incluídos em parafina, cortados em micrótomo a 5µm e corados pela hematoxilina-eosina, no Laboratório de Coccídeos e Coccidiose, DPA/IV, pelo Dr. Walter Teixeira Leira. As lâminas foram encaminhadas ao Laboratório de Histopatologia, DESP/IV para serem examinadas pela Dra. Marilene de Farias Brito Queiroz.

5.2.4.4. Leucometria

O sangue dos animais foi diluído na proporção de 1/20 em solução de Türk e os leucócitos contados em hemocítômetro.

5.2.4.5. Hematimetria

O sangue foi diluído na proporção de 1/200 em líquido de *Gawer* e os eritrócitos contados em hemocítômetro.

5.2.4.6. Contagem Diferencial

A distensão sangüínea foi corada pelo método Panótico Rápido e, a contagem das células brancas foi feita em lente objetiva de imersão. Para tal foram contadas 100 células no total.

5.2.4.6. Dosagem enzimática

Foram realizadas as dosagens enzimáticas Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase e Fosfatase Alcalina, empregando Kits comerciais da marca LABORLAB, nos soros obtidos após o ensaio de intoxicação.

5.2.4.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm S.E. de no mínimo seis animais por grupo. As comparações foram realizadas com grupos controles apropriados através de análise de variância (Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis) e os valores de probabilidade inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Análise das diferentes concentrações de piperina no modelo experimental proposto.

Durante os ensaios de toxidez da piperina não foram verificadas alterações no estado geral dos animais, contabilizando 100% de sobrevivência em todas as concentrações empregadas.

Os resultados expressos na Tabela 1 mostram o ganho médio de peso e o peso médio dos órgãos nos grupos inoculados com diferentes concentrações de piperina. Os resultados obedeceram a uma distribuição normal; não sendo observada diferença significativa no ganho de peso entre os grupos ao final de 23 dias de inoculação. Todavia, observou-se aumento significativo no peso do fígado, baço e timo nos grupos inoculados com 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal de peso corporal de piperina.

Tabela 1. Influência da administração oral de diferentes doses de piperina, em ratos, sobre o ganho médio de peso e peso médio do fígado, baço e timo.

Dose de Piperina ¹	Ganho de peso (g)	Peso do órgão ² (g)		
		Fígado	Baço	Timo
0,00	75,16 ^a ± 5,477	3,409 ^a ± 0,108	0,270 ^a ± 0,039	0,264 ^a ± 0,039
1,12	55,61 ^a ± 9,403	3,190 ^a ± 0,387	0,260 ^a ± 0,049	0,246 ^a ± 0,073
2,25	60,19 ^a ± 15,27	5,228 ^b ± 0,533	1,757 ^b ± 0,247	1,721 ^b ± 0,247
4,50	73,39 ^a ± 17,17	5,604 ^b ± 0,449	1,585 ^b ± 0,283	1,582 ^b ± 0,234

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

¹ mg/kg de peso corpóreo.

² mg/100g de peso corpóreo.

^a e ^b letras iguais são resultados sem diferença estatística ($p > 0,05$), letras diferentes são resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$).

Os dados de ganho de peso e peso dos órgãos estão expressos pela média do grupo ± o desvio padrão de seis animais.

Quanto à avaliação histopatológica, os animais inoculados apenas com o veículo DMSO/Etanol (grupo controle) e o grupo de animais inoculados com piperina, na concentração de 1,12 mg/kg de peso corporal, apresentaram discretas alterações no fígado, tais como megalocitose, necrose individual de células e infiltrado de células mononucleares. Entretanto, nos grupos inoculados com piperina na dose de 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal, foram constatados edema da própria do jejuno e necrose individual de células no fígado, caracterizados como de grau leve a moderado. Na dose de 4,50 mg/kg de peso corporal também foram observados pequenos focos de células mononucleares e necrose individual nos hepatócitos. Nenhum grupo apresentou alterações significativas nos rins (Tabela 2).

Tabela 2. Lesões histopatológicas observadas nos grupos de animais inoculados por via oral, com diferentes doses de piperina.

Lesões Histopatológicas	Doses em mg/kg de peso corpóreo							
	0,00		1,12		2,25		4,50	
	F	I	F	I	F	I	F	I
Mitose	-	-	-	-	+	-	-	-
Megalocitose	(+)	-	(+)	-	+	-	-	-
Necrose individual de células	(+)	-	(+)	-	+	(+)	-	-
Edema da própria no jejuno	-	-	-	-	-	+	+	-
Infiltrado de cel. mononucleares	(+)	-	(+)	-	+	-	-	-

Legenda: ausência de lesão -; discreta (+); leve +; leve a moderada + (+).

F- fígado

I- intestino

Os valores médios obtidos no hemograma e no leucograma nos diferentes grupos experimentais estão demonstrados na Tabela 3. O número médio de hemácias e leucócitos totais obedeceu a uma distribuição normal; não sendo observada diferença significativa entre os grupos. A contagem diferencial dos monócitos, neutrófilos e eosinófilos, não obedeceram a uma distribuição normal, para análise estatística foi empregado o teste Kruskal-Wallis e a comparação das médias dos grupos foram feitas pelo teste de Dunns.

Tabela 3. Influência da administração oral de diferentes doses de piperina em ratos, sobre os valores médios do número de hemácias, leucócitos e contagem diferencial de leucócitos.

Dose de piperina ¹	Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	Linfócitos (x 10 ³ /mm ³)	Monócitos (x 10 ³ /mm ³)	Neutrófilos (x 10 ³ /mm ³)	Eosinófilos (x 10 ³ /mm ³)
0,00	5,993 ^a ± 1,133	7,992 ^a ± 1,440	5,542 ^a ± 1,143	0,813 ^a ± 0,296	1,446 ^{ab} ± 0,461	0,159 ^a ± 0,077
1,12	6,516 ^a ± 0,786	6,125 ^a ± 6,624	4,833 ^a ± 0,345	0,536 ^a ± 0,270	0,715 ^{ab} ± 0,229	0,041 ^{b*} ± 0,032
2,25	5,811 ^a ± 0,962	7132 ^a ± 2,055	4,434 ^a ± 1,691	1,077 ^a ± 0,618	1,441 ^{ab} ± 0,770	0,087 ^{ab} ± 0,073
4,50	5,398 ^a ± 1,082	7,377 ^a ± 1,290	4,167 ^a ± 9,994	1,029 ^a ± 0,468	2,087 ^{a**} ± 1,326	0,100 ^{ab} ± 0,088

Os dados de hematimetria e leucometria estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de seis animais.

¹ mg/kg de peso corpóreo.

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.

^{ab} nas colunas: letras diferentes significa diferença significativa (* p < 0,05; ** p < 0,01).

6.2. Ensaio de intoxicação com aflatoxinas.

Durante os ensaios de intoxicação com aflatoxinas não ocorreu óbito e nem foram observadas alterações no estado geral dos animais.

Os resultados expressos na Tabela 4 demonstram o ganho médio de peso e o peso médio do fígado e rins nos grupos inoculados com piperina, aflatoxinas e piperina + aflatoxinas. Os resultados obedeceram a uma distribuição normal, não sendo observada diferença significativa no ganho de peso entre os grupos ao final do experimento. Da mesma forma, não houve alteração significativa no peso do fígado e dos rins nos grupos inoculados.

As lesões observadas nos cortes histopatológicos estão demonstradas na Tabela 5. Nos animais inoculados com 1,12 mg/kg de peso corporal de piperina foram observados apenas focos incidentais de lesões consideradas discretas em sua maioria, que podem ser devidas a fatores ambientais ou estarem relacionadas ao veículo usado na diluição da piperina. Nos animais inoculados com aflatoxinas verificaram-se congestão, megalocitose, necrose individual e necrose incipiente de hepatócitos e focos de infiltrado de células mononucleares. Tais lesões foram mais discretas ou ausentes no grupo que recebeu o tratamento piperina + aflatoxinas. Não foram observadas lesões renais significativas em nenhum grupo, por esta razão não constam na referida tabela.

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos através da dosagem sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (AP) ensaiadas à uma temperatura de 37° C. Todos os animais seguiram o mesmo padrão de resultados e apresentaram níveis dentro dos limites de referência (ALT/35,1 ± 13,3; AST/42,9 ± 10,1) no grupo da piperina e no grupo da piperina + afla. O grupo de animais tratados com aflatoxinas apresentou seu nível enzimático aumentado para ALT e AST em todas as análises, entretanto, apenas com diferença significativa para a ALT.

No ensaio de dosagem para a enzima fosfatase alcalina (AP), todos os animais examinados apresentaram resultados similares; não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

Os valores médios obtidos na contagem do número de hemácias e dos leucócitos totais obedeceram a uma distribuição normal, não sendo observada diferença significativa entre os grupos quanto ao hemograma. A Figura 7 mostra os valores médios do número de leucócitos totais nos diferentes grupos experimentais, onde podemos verificar uma leucopenia significativa promovida pelas aflatoxinas, quando comparada ao grupo da piperina e da piperina + aflatoxinas.

A Figura 8 mostra os valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos. Houve uma diminuição significativa do número de linfócitos dos animais inoculados apenas com aflatoxinas, quando comparados aos animais inoculados com piperina e com piperina + aflatoxinas.

A Figura 9 expressa o número de leucócitos obtidos antes e após da inoculação dos grupos com piperina e/ou aflatoxinas. Pode-se observar a diminuição significativa ($p < 0,01$) do número de leucócitos após a inoculação dos animais apenas com aflatoxinas. Essa supressão da resposta dos leucócitos não foi verificada nos animais que receberam piperina + aflatoxinas.

Tabela 4. Interferência da piperina no ganho médio de peso e peso médio do fígado e rins em animais inoculados, por via oral, com piperina, aflatoxinas e piperina + aflatoxinas.

Grupo	Ganho de peso (g)	Fígado (mg/ 100g)	Rim (x 10 ³ /mm ³)
Piperina	56,67 ± 6,925	4,394 ^a ± 0,246	0,706 ^a ± 0,208
Aflatoxinas	51,20 ^a ± 10,08	4,303 ^a ± 0,264	0,842 ^a ± 0,320
P + A	55,40 ^a ± 6,638	4,574 ^a ± 0,291	0,750 ^a ± 0,303

Os dados de ganho de peso e peso dos órgãos estão expressos pela média do grupo ± o desvio padrão de 10 animais.

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

^a nas colunas significa que não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

P x A – Piperina x Aflatoxina.

Tabela 5. Lesões histopatológicas observadas no fígado de ratos inoculados com piperina, aflatoxinas e piperina + aflatoxinas

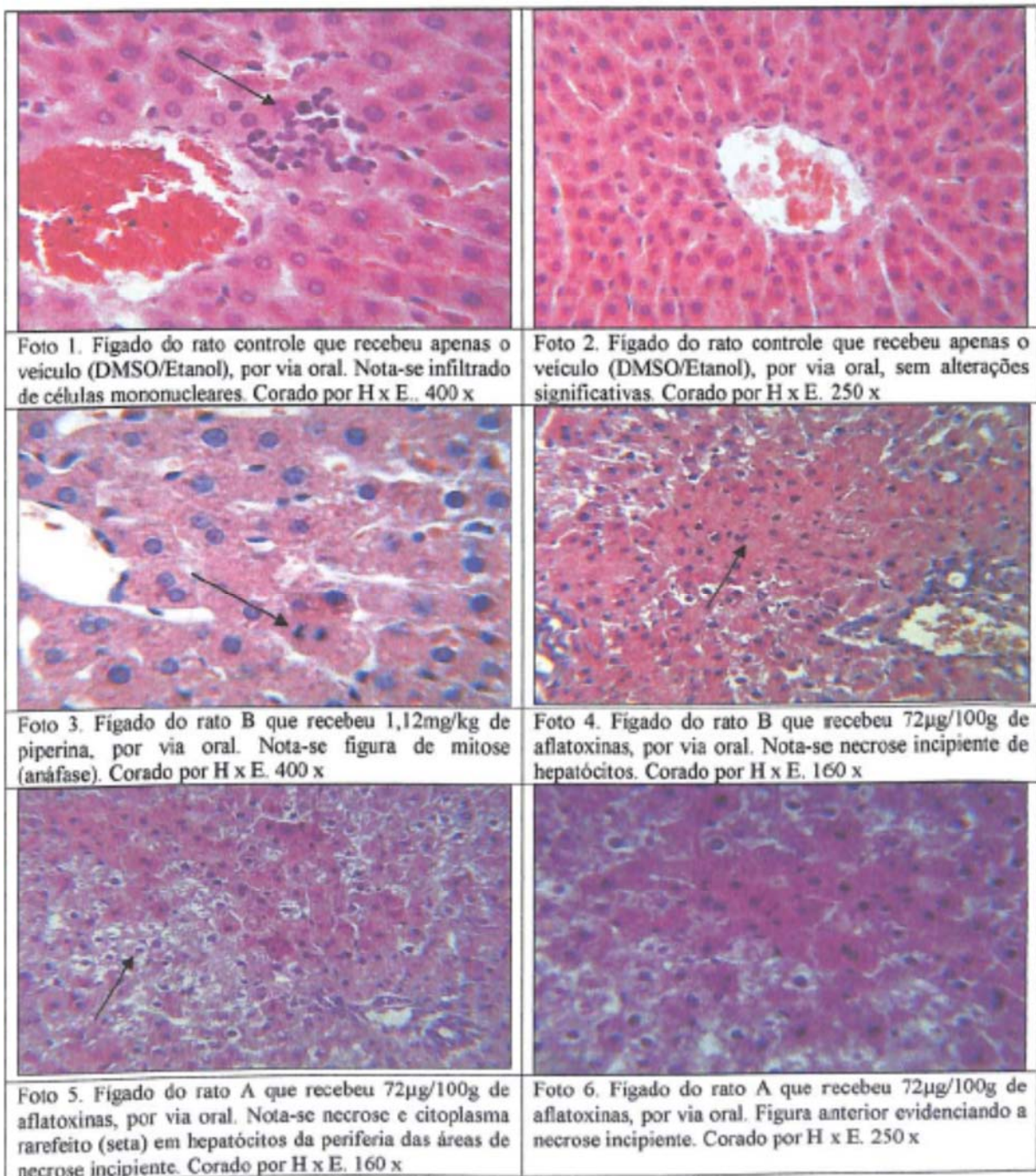
Lesões hepáticas	Piperina				Aflatoxinas				Piperina x Aflatoxinas			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A ¹	B	C	D
Megalocitose	(+)	(+)	(+)	(+)	++	+(+) ^a ++	++	+(+)	+	+	(+)	(+)
Mitose	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	+(+)	+(+)	(+)	+
Necrose individual de células	-	(+)	(+)	-	+	+(+)	+(+)	+(+)	+	+	(+)	(+)
Vacuolização de hepatócitos / Citoplasma rarefeito	-	-	-	-	(+)	++ ^F	+	++ ^F	-	-	(+)	-
Infiltrado de cel. Mononucleares	-	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	-	(+) ^F	(+)	(+)
Necrose incipiente de hepatócitos	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	(+)	-
Necrose centrolobular a paracentral	-	-	-	-	++(+)	++(+)	++(+)	++ ^a +++	-	-	-	-
Congestão centrolobular	-	-	-	-	-	+(+)	+(+)	+(+)	-	-	-	-

Legenda: ausência de lesão -; lesão discreta (+); leve +; leve a moderada ++; moderada a acentuada ++(+); acentuada +++.

A, B, C e D – designação dos quatro animais separados para exame, em cada tratamento.

Lesões em focos ^F

Figura 6. Fotos dos resultados do exame dos cortes histopatológicos.



Continua

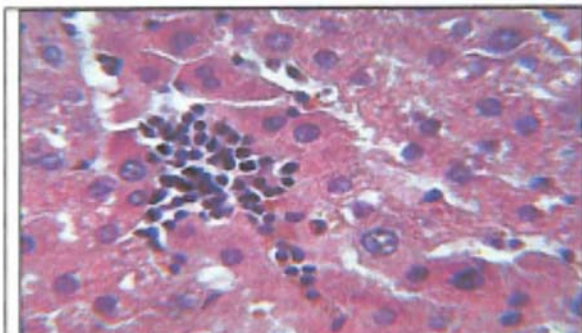


Foto 7. Fígado do rato B que recebeu 72 μ g/100g de aflatoxinas, por via oral. Nota-se infiltrado de células mononucleares. Corado por H x E. 400 x

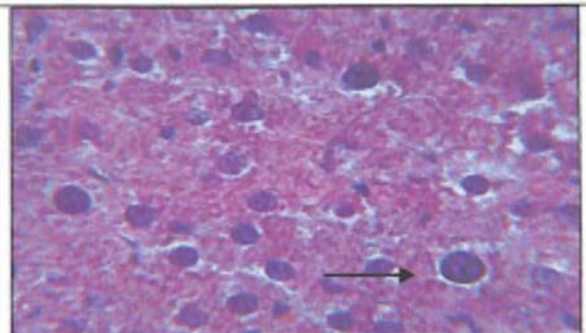


Foto 8. Fígado do rato B que recebeu 72 μ g/100g de aflatoxinas, por via oral. Nota-se megalocitose. Corado por H x E. 400 x

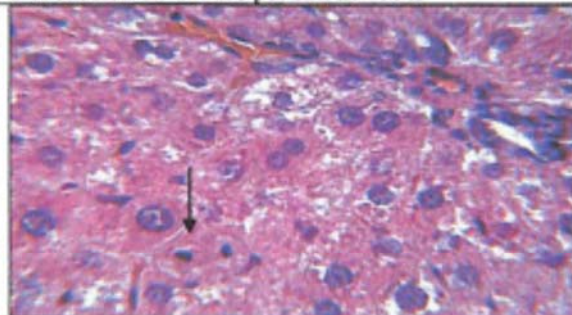


Foto 9. Fígado do rato C que recebeu 72 μ g/100g de aflatoxinas, por via oral. Nota-se figura de mitose (telófase). Corado por H x E. 400x

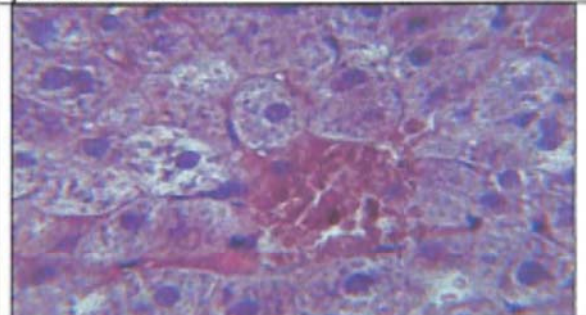


Foto 10. Fígado do rato C que recebeu 1,12mg/kg de piperina + 72 μ g/100g de aflatoxinas, por via oral. Nota-se rarefação/vacuolização do citoplasma dos hepatócitos. Corado por H x E. 400x

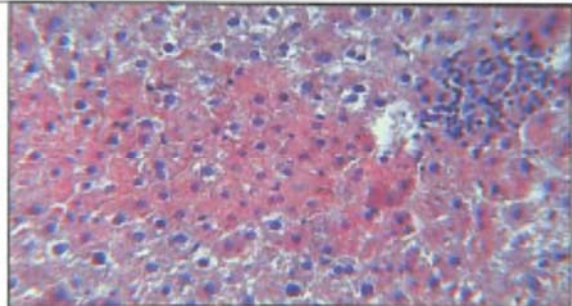


Foto 11. Fígado do rato C que recebeu 1,12mg/kg de piperina + 72 μ g/100g de aflatoxinas, por via oral. Nota-se necrose incipiente de hepatócitos e infiltrado de células mononucleares. Corado por H x E. 160 x

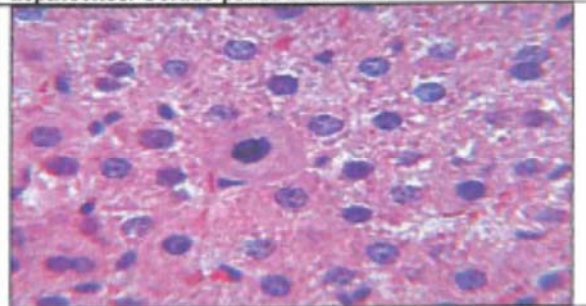


Foto 12. Fígado do rato D que recebeu 1,12 mg/kg de piperina, por via oral. Nota-se figura de mitose (prófase). Corado por H x E. 40x

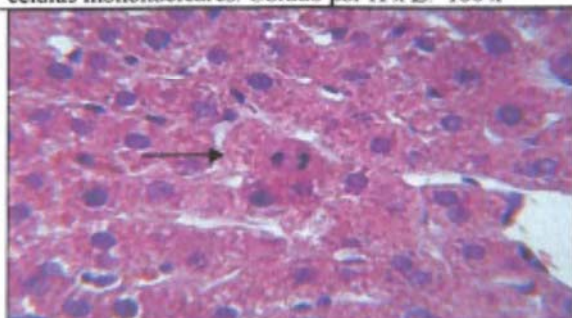


Foto 13. Fígado do rato B que recebeu 1,12mg/kg de piperina + 72 μ g/100g de aflatoxinas, via oral. Nota-se figura de mitose (anáfase). Corado por H x E. 400x

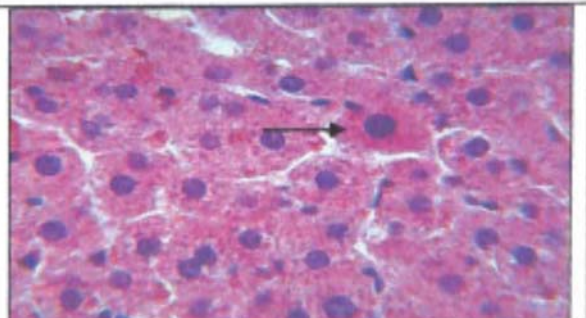


Foto 14. Fígado do rato A que recebeu 1,12 mg/kg de piperina + 72 μ g/100g de aflatoxinas, via oral. Nota-se necrose individual de células. Corado por H x E. 400x

Tabela 6. Efeito da intoxicação de ratos com aflatoxinas na dosagem sérica das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina.

Grupo	Dosagem enzimática ¹		
	ALT (U/l)	AST (U/l)	AP (U/l)
Piperina	41,80 ^a ± 12,89	44,50 ^a ± 21,45	444,30 ^a ± 215,90
Aflatoxinas	65,45 ^b ± 10,58	58,09 ^a ± 17,86	447,00 ^a ± 134,60
P + A	30,20 ± 11,20	50,90 ^a ± 22,92	482,00 ^a ± 90,84

ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), AP (fosfatase alcalina)

¹ ensaio a 37 °C.

Valores de referência: ALT- 35,1 ± 13,3 U/l; AST- 42,9 ± 10,1 U/l; AP- 426 ± 22,6 U/l

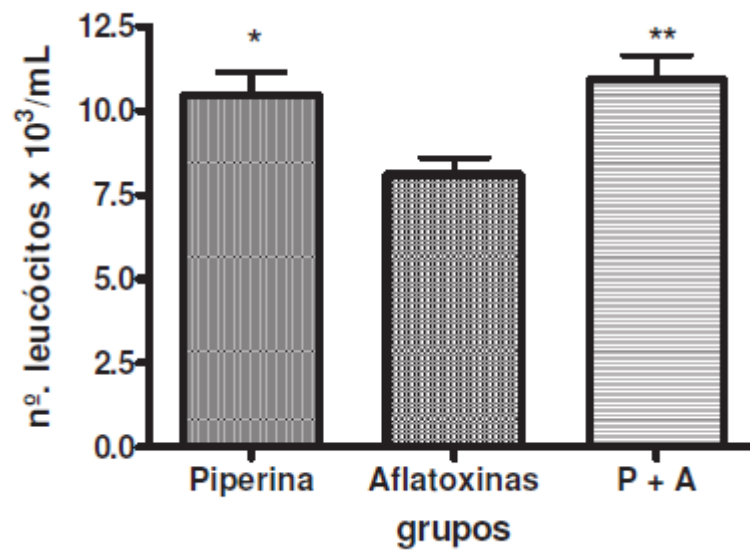


Figura 7. Efeito da piperina sobre a leucopenia induzida através da intoxicação de ratos com aflatoxinas. A administração oral de piperina (1,12 mg/kg de peso corporal) foi iniciada 72 horas antes da intoxicação com aflatoxinas (72 µg/100 g), também por via oral. Os resultados estão expressos pela média do grupo \pm desvio padrão de 10 animais. A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls. * indica $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$, quando o grupo aflatoxina foi comparado com os grupos piperina e piperina + aflatoxinas (P+A).

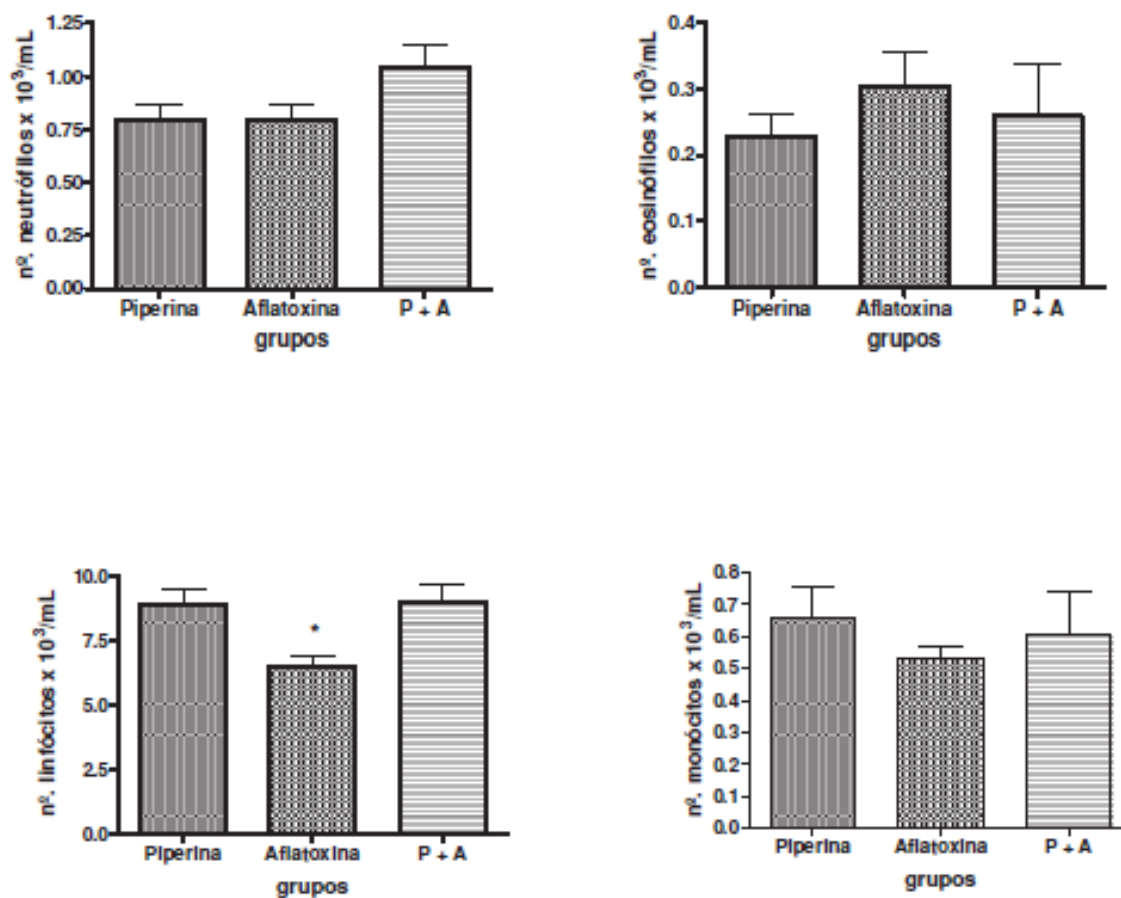


Figura 8. Efeito da piperina (1,12 mg/kg de peso corporal) nos valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos. Os resultados estão expressos pela média do grupo \pm desvio padrão de 10 animais. A análise estatística para os dados com distribuição normal (neutrófilos e linfócitos) foi feita por análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls; dados sem distribuição normal (monócitos e eosinófilos) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns. * indica $p < 0,01$ quando o grupo aflatoxinas foi comparado com os grupos piperina e piperina + aflatoxinas (P+A).

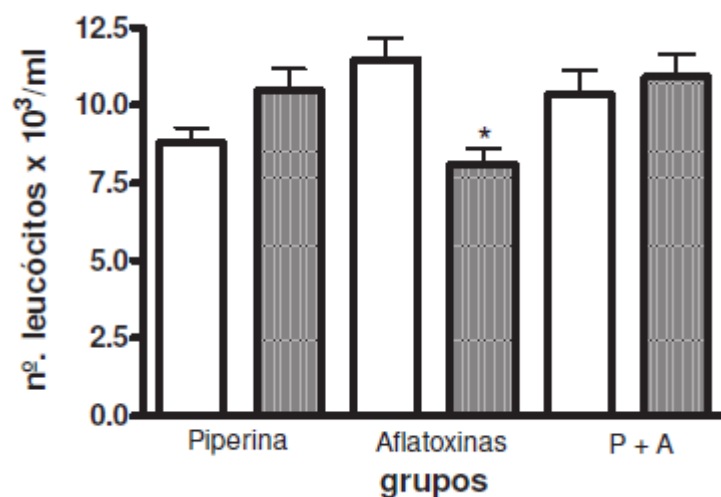


Figura 9. Efeito da administração oral da piperina e/ou aflatoxinas sobre o número de leucócitos antes (barras vazias) e depois das inoculações de piperina, aflatoxina ou piperina + aflatoxinas (barras cheias). Os resultados estão expressos pela média do grupo \pm desvio padrão de 10 animais. A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA), comparando-se as médias de cada grupo antes e após a inoculação pelo teste Newman-Keuls. indica $p < 0,01$.

7. DISCUSSÃO

A pesquisa por novos agentes quimiopreventivos mais efetivos e menos tóxicos tem despertado um grande interesse na área da fitoquímica. A piperina, originária das espécies de pimenta preta e longa, tem sido usada por milhares de anos como tempero na dieta humana e como constituinte da medicina alternativa sendo, recentemente, alvo de interesse por demonstrar inibição na formação de radicais livres e no funcionamento das enzimas da família do citocromo P 450.

A capacidade da piperina em aumentar, de forma inespecífica e com o envolvimento direto do citocromo P 450, a biodisponibilidade de certas drogas e suplementos nutritivos foi descrita por Atal *et al.* em 1985. Alguns anos depois, Reen *et al.* (1997) demonstraram, *in vitro*, que a piperina era capaz de competir com a aflatoxina B 1 pelo citocromo P 450 de células hepáticas de ratos. Tal competição foi capaz de diminuir a citotoxicidade e a genotoxicidade da aflatoxina, sugerindo que a piperina poderia ser utilizada como um agente quimiopreventivo contra pró-carcinógenos que sejam ativados pela via do citocromo P 450.

Levando-se em conta os dados disponíveis na literatura sobre os efeitos *in vitro* da piperina, nosso trabalho teve como objetivo central verificar a interferência da piperina sobre a toxicidade das aflatoxinas *in vivo*.

Para tal, inicialmente, grupos de ratos adultos jovens foram inoculados, por via oral, com diferentes doses de piperina (1,12; 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal) para avaliação de alguns parâmetros: interferência no ganho de peso; no tamanho de órgãos específicos como fígado, baço e timo; análises histopatológicas do estômago, duodeno, jejuno, íleo, fígado e rins; hematimetria, leucometria e contagem diferencial de leucócitos.

As doses empregadas nesse estudo 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 de peso corporal).

A avaliação da DL50 e da toxicidade subaguda da piperina em camundongos Swiss albino, ratos Fischer e hamsters Syrian golden foi realizada por Piyachaturawat *et al.* (1983). Neste estudo os autores utilizam animais de ambos os sexos e em desmame, separados por peso, para inoculação de piperina por diversas vias de administração, entre elas a intragástrica. Os resultados deste trabalho demonstram que a DL 50 da piperina para administração intragástrica em ratos fêmeas adultos foi de 514 mg/kg de peso corporal, ocorrendo óbito em aproximadamente quatro horas. Os autores não observaram nenhuma alteração histopatológica significativa nos animais após a necropsia, onde foi observada apenas uma discreta hemorragia ou hiperemia do trato gastrointestinal. Foi observado que, mesmo levando em conta as diferenças de sexo, idade e rota de administração, os sinais clínicos e sintomas foram similares entre as espécies tratadas com piperina.

Nesse estudo realizado por Piyachaturawat e seus colaboradores, a piperina na dose de 100 mg/kg de peso corporal/ dia demonstrou não ser tóxica aos animais, nem causar alterações no ganho de peso, quando comparados àqueles que receberam apenas o diluente. Entretanto, quando a dose é aumentada para 350 e 500 mg/kg de peso corporal/ dia ocorreu redução no ganho de peso e aumento no número de mortes, na necropsia observaram-se severa hemorragia e edema do trato gastrointestinal.

Os resultados dos testes de via de inoculação indicaram que a toxidez da piperina é reduzida quando inoculada pela via intragástrica. Os dados da toxidez aguda confirmam os citados por Singh *et al.* (1973), entretanto os valores da DL 50 para via intragástrica de ambos ratos e camundongos neste estudo são maiores do que no experimento prévio. A susceptibilidade dos animais a droga foi variável em função da idade, sexo e linhagem. A administração intragástrica da piperina demonstrou redução de sua toxidez, podendo ser atribuída tanto a sua insolubilidade quanto a instabilidade química no estômago. As maiores doses de piperina tendem a formar colóides no meio aquoso, conseqüentemente ocorrendo menor absorção.

Estes dados obtidos por Piyachaturawat *et al.* (1983) comprovam que a piperina é segura para uso em doses mais baixas, como a dose padrão que usamos em nosso trabalho, 1,12 mg/ kg de peso corporal/ dia. Essa dose está muito abaixo da dose subaguda usada por eles, e como esta, também não interfere no ganho de peso, características histopatológicas dos órgãos ou padrão imunológico dos animais.

Em nosso trabalho, as doses de piperina empregadas nos ensaios não interferiram no ganho de peso dos animais aos 23 dias de inoculação. Todavia, verifica-se que doses maiores de piperina (2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal) promoveram aumentos significativos do peso dos órgãos fígado, baço e timo (Tabela 1).

Dogra *et al.* (2004), realizaram um trabalho onde analisaram os efeitos imunotoxicológicos da piperina em camundongos machos, jovens da linhagem Swiss albino. Neste estudo foram testadas as mesmas dosagens que usamos em nosso experimento (1,12; 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal), também administradas por via oral, com a mesma solução diluente (10% DMSO/Etanol 95%), por cinco dias consecutivos.

Dogra e seus colaboradores puderam observar que nenhuma das doses utilizadas demonstrou efeito tóxico evidente entre os animais. Quanto ao peso corporal, nenhum dos tratamentos demonstrou alterar o índice padrão, sem apresentar diferença significativa. Todos os animais, em todas as doses apresentaram ganho de peso médio próximo do grupo controle. Foi constatado pelos autores aumento significativo de peso do fígado e do baço nos tratamentos de 1,12 e 2,25 mg/kg de peso corporal de piperina, o que não ocorreu na dose de 4,50 mg/kg de peso corporal, que causou decréscimo no peso do baço e do timo. Nenhuma das doses causou efeito significativo sobre o peso dos rins.

Constatamos em nosso trabalho que doses maiores proporcionaram aumento significativo no peso do fígado, baço e timo, ao final de 23 dias de experimentação; o que não foi observado na dose de 1,12 mg/kg de peso corporal, que se manteve próxima do controle. Quando comparamos os resultados de ganho de peso corporal, encontramos dados similares, onde neste trabalho, assim como no citado acima não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso em nenhuma das doses empregadas. Talvez as diferenças nos resultados de aumento no tamanho dos órgãos sejam devidas à diferença no tempo de experimentação e/ou a espécie animal empregada.

Sunila e Kuttan (2004), estudaram as atividades antitumoral e imunomodulatória da piperina e do extrato alcoólico dos frutos da pimenta longa em camundongos jovens Balb/c e Swiss albino, durante cinco dias consecutivos, por via intraperitoneal. Após administração tanto da piperina (1,14 mg/ dose/ animal) quanto do extrato alcoólico dos frutos da pimenta longa (10 mg/dose/animal) não foi observada nenhuma diferença significativa no ganho de peso corporal ou na contagem diferencial de leucócitos.

Nossos resultados de ganho médio de peso foram similares aos relatados por SuniJa e Kuttan (2004), em que não há alteração significativa neste item. Desta forma, podemos concluir que a piperina não interfere no ganho de peso dos animais, nas doses testadas neste trabalho, levando em consideração os resultados obtidos por outros dois autores que corroboram com nossos achados.

As análises histopatológicas do trato digestório, fígado e rins mostraram algumas alterações celulares no fígado, nas doses de 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal (Tabela 2). Dogra *et al.* (2004), também observaram alterações significativas (megalocitose e vacuolização) nos hepatócitos, nas doses de 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal. De forma semelhante ao observado em nosso trabalho, Dogra *et al.* (2004) verificaram que as doses de piperina empregadas no estudo (1,12, 2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal) não geravam alterações histológicas nos rins.

As alterações histopatológicas observadas no grupo que recebeu apenas o veículo empregado na diluição da piperina podem ter sido causadas pelo dimetilsulfóxido (DMSO), usado em combinação com o etanol a 95% para torná-la mais solúvel. Não houve diferença aparente nas lesões discretas observadas nos grupos inoculados com piperina (1,12 mg/kg de peso corporal) e apenas com o veículo.

Sendo assim, podemos considerar a dose de 1,12 mg/ kg segura para o consumo dos animais e não causadora de alterações histopatológicas. Já as maiores doses de piperina (2,25 e 4,50 mg/kg de peso corporal) apresentaram lesões de grau mais evidente em áreas do fígado e até mesmo no intestino, o que nos leva a crer que não sejam seguras para uso. Essas alterações nas maiores doses são bem significativas e observadas também em outros trabalhos, como o de Piyachaturawat *et al.* (1983), que observaram lesões no estômago, trato urinário, adrenal e intestino delgado.

As doses de piperina empregadas não promoveram variação significativa no número total de hemácias e de leucócitos nos animais inoculados (Tabela 3). Existiram apenas variações pontuais para os neutrófilos entre as doses de 1,12 e 4,50 mg/kg de peso corporal e para os eosinófilos entre o grupo controle e a dose de 1,12 mg/kg de peso corporal.

No estudo de Sunila e Kuttan (2004), também não houve diferença significativa na contagem diferencial de leucócitos. Em contrapartida, Dogra (2004) evidenciou que as doses de 2,25 e 4,50 mg/ kg causaram uma redução significativa na contagem total de leucócitos assim como na diferencial, mostrando aumento de neutrófilos. Alguns destes dados podem ser observados no atual estudo, onde apesar da contagem total de leucócitos não ter alterações significativas, houve um intenso aumento no número de neutrófilos na contagem diferencial do grupo de 4,50 mg/ kg, e uma redução de eosinófilos no grupo de 1,12 mg/ kg.

De acordo com os resultados alcançados nos experimentos realizados nessa primeira fase, a dose de 1, 12 mg de piperina por quilo de peso corpóreo foi aparentemente segura para o modelo animal proposto, sendo a dose de menor concentração com a máxima atividade e, por isso, selecionada para os experimentos de intoxicação dos ratos com aflatoxinas.

A concentração de aflatoxinas empregada em nosso estudo teve como base o trabalho de Pozzi *et al.* (2000), sendo previamente estabelecida através de um ensaio piloto, onde a dose de 72 µg/100g de peso corporal foi testada em três ratos da linhagem LOU-M, para comprovação da sensibilidade da linhagem, e causou leucopenia e alterações

histopatológicas compatíveis com a intoxicação por aflatoxinas.

Para a realização da segunda fase do trabalho, os animais foram separados em três grupos: (P) grupo inoculado apenas com piperina (1,12 mg/kg de peso corporal), (A) grupo inoculado apenas com aflatoxinas (72 µg/100g), (P+A) grupo inoculado com piperina (1,12 mg/kg de peso corporal) e aflatoxinas (72 µg/100g de peso corporal).

Pozzi *et al.* (2000), intoxicando ratos Wistar com aflatoxina B₁ (72 µg/100 g), por via oral, durante 21 dias observaram diferença significativa no ganho médio de peso e no peso do fígado e rim, à partir da segunda semana de intoxicação. Todavia, em nosso estudo essa dose de toxina não foi capaz de alterar significativamente o ganho médio de peso dos ratos intoxicados, quando comparado com os demais grupos. O mesmo ocorreu para o peso do fígado e rim (Tabela 4). Tal fato pode ter ocorrido por termos usado uma mistura de aflatoxinas, onde a aflatoxina B₁ é o componente em maior concentração e não a aflatoxina B₁ purificada.

Apesar da ausência de hepatomegalia no grupo experimentalmente intoxicado com aflatoxinas, provavelmente devido ao pouco tempo de inoculação, podemos observar lesões características de intoxicação, como megalocitose, mitose, congestão centrolobular e necrose individual de células, que variaram de leve a acentuada no fígado. Verifica-se uma diminuição acentuada dessas alterações quando a piperina foi administrada em conjunto com a aflatoxinas (grupo piperina + aflatoxinas), bem próxima às alterações observadas no grupo inoculado apenas com a piperina (Tabela 5). Com base nesses resultados podemos sugerir que a piperina, inoculada na dose de 1,12 mg/kg de peso corporal diminuiu o efeito tóxico da aflatoxinas na dose de 72 µg/100 g.

Na análise histopatológica do estudo desenvolvido por Hinton e colaboradores (2003), foram observadas mudanças histomorfológicas no fígado, causadas pela aflatoxina B₁, tais como megalocitose, vacuolização, citoplasma rarefeito, infiltrados inflamatórios e numerosas células de Kupffer ativadas depois de 8 semanas de tratamento contínuo e intermitente, aumentando em tamanho e número em 12 semanas, quando aparecem também hiperplasia biliar, em ambas as doses de 1,6 ppm (contínua e intermitente). As lesões foram mais proeminentes no grupo que recebeu a dose continuamente. Não foram observadas evidências de inflamação no baço, mas efeitos na distribuição de células dentro dos micro-compartimentos esplênicos foram evidenciados a partir de 4 semanas de estudo. Nas maiores doses, em contraste com o controle, os baços apresentaram-se mais densos e celulares, indicando imunoestimulação.

O estudo feito por Hinton (2003), acresce nossos resultados, à partir do momento em que são observadas as lesões características de intoxicação por aflatoxinas; este dado confirma nossos achados, pois muitas das lesões são similares, mesmo tendo sido a toxina administrada em dose e via de inoculação diferentes.

A lesão hepática evidenciada no grupo intoxicado com aflatoxinas foi comprovada no ensaio de dosagem enzimática (Tabela 6). A enzima ALT, marcador específico de lesão hepática, aumentou de forma significativa no grupo de animais intoxicados com aflatoxinas; também houve uma diminuição significativa no grupo inoculado com piperina + aflatoxinas. Este resultado corrobora com os resultados descritos anteriormente, e demonstram que a piperina foi capaz de diminuir a capacidade tóxica das aflatoxinas no modelo animal proposto. No trabalho de Pozzi et al (2000), com uma intoxicação de 21 dias com 72 µg/100g de peso de aflatoxina, os ratos da linhagem Wistar apresentaram aumentos significativos nas concentrações das enzimas ALT e AST, quando comparado ao grupo controle.

Mekia *et al.*, 2004 utilizando ratos machos saudáveis da linhagem Sprague-Dawley, com 100-150 g de peso corporal evidenciaram que o tratamento com aflatoxina (50 mg/kg de peso corporal) foi capaz de aumentar significativamente a atividade de diversas enzimas como a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina.

A capacidade imunotóxica das aflatoxinas foi demonstrada nas Figuras 7, 8 e 9. As aflatoxinas na dose empregada diminuíram, de forma significativa, o número total de leucócitos e, especificamente, os linfócitos. Essa leucopenia e linfopenia observada nos animais intoxicados com aflatoxinas não foram evidenciadas no grupo dos animais inoculados com piperina e aflatoxinas. Desta forma, podemos afirmar que a piperina foi capaz de reverter à capacidade imunossupressora das aflatoxinas.

Os dados obtidos no trabalho realizado por Raisuddin e colaboradores (1993), onde ratos recém desmamados foram subcrônicamente expostos a doses misturadas à dieta de 60, 300 e 600g de aflatoxina B/kg de peso corporal, durante 4 semanas, em dias alternados; confirmam nossos achados, quando atestam que a AFB₁ suprime seletivamente a imunidade mediada por células em ratos desmamando. A toxina suprimiu os níveis de CMI apenas nas doses de 300 e 600 µg, como mensurado pelo ensaio de resposta DTH. Estes dados são conclusivos para os autores de que as contínuas exposições a baixos níveis de aflatoxina podem aumentar a susceptibilidade do hospedeiro a infecções e tumorigênese.

Os resultados alcançados pelo presente trabalho sugerem que a reversão da toxidez das aflatoxinas pela piperina *in vivo* seja devida à competição dessa amida com as aflatoxinas pelo citocromo P 450, *in vitro*.

8. CONCLUSÕES

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

- A dose de 1,12 mg/kg de peso corporal de piperina não foi tóxica ou imunossupressora para o modelo experimental proposto. As lesões histopatológicas apresentadas foram de grau discreto, podendo ter relação com fatores ambientais ou com substâncias usadas em sua diluição e não com a administração da piperina.
- A dose de 72µg/100g de peso corporal de aflatoxinas não foi suficiente para promover diferença significativa no ganho médio de peso e no peso dos órgãos fígado e rins entre os grupos ao final do experimento no modelo experimental proposto. Porém, foi capaz de causar lesões histopatológicas características de intoxicação por aflatoxinas.
- A piperina (1,12 mg/kg de peso corporal) foi capaz de minimizar, *in vivo*, as lesões histopatológicas características de intoxicação, a dosagem da enzima ALT e a imunossupressão causada pela aflatoxina 72 g/100g de peso corporal).
- A reversão da toxidez das aflatoxinas pela piperina, *in vivo*, reflete a competição dessa amida com o sítio de ligação das aflatoxinas no citocromo P 450, *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERELE, O.; WHO. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. *HerbalGram*. v. 28, p. 13-20, 1993.

ALLAMEH, A; SAXENA, M.; BISWAS, G; RAI, H. G; SINGH, J; SRIVASTAVA, N. Piperine, a plant alkaloid of the piper species, enhances the bioavailability of aflatoxin B1 in rat tissues. *Cancer Lett*. v.61, nº 3, p. 195-199 1992.

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. *J Pharmacol Exp Ther*. v. 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. *Nutr Res*. v. 19, p. 381-388, 1999.

BENY, J. L; ZHU, P.; HAEFLIGER, I. O. Lack of bradykinin-induced smooth muscle cell hyperpolarization despite heterocellular dye coupling and endothelial cell hyperpolarization in porcine ciliary artery. *J Vasc Res*. V. 34, Nº 5, P. 344-50, 1997.

BEZERRA D. P. Potencial anticancer da Piplartina e da Piperina, amidas isoladas de plantas do gênero Piper. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2005.

BHA T, B. G; CHANDRASEKHARA, N. Interaction of piperine with rat liver microsomes. *Toxicology*. v. 44, nº 9, p. 91-88, 1987.

CASTEGNARO, M.; PLESTINA, R.; DIRHEIMER, G.; CHERNOZEMSKY, I. N.; BARTSCH, M. Micotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publication nº 115 Lyon; World Health Organization/ *International Agency for Research on Cancer*, 1991.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L; FARNSWORTH, N. R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. *Phytother. Res*. v. 15, p. 183-205, 2001.

CREPPY, E.; CASTEGNARO, M.; DIRHEIMER, G. Human Ochratoxicosis and its Pathologies in France. *Colloque Inserm* (France; Montroge) V. 231, 1993.

CRESPI, C. L.; CODE, E. L.; PENIMAN, B. W.; GONZALEZ, F. J.; CHANG, T. K. H.; WAXMAN, D. J. Interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metabolism and Disposition*. v. 25, nº 8, 1997.

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.

CUSUMANO, V.; COSTA, G. B.; TRIFILETTI, R.; MERENDINO, R. A.; MANCUSO, G. Functional impairment of rat Kupffer cells induced by aflatoxin B1 and its metabolites. *FEMS Immunol Med Microbiol*. v. 109 n 2, p. 151-155, 1995.

CUSUMANO, V.; ROSSANO, F.; MERENDINO, R. A.; ARENA, A.; COSTA, G. B.; MANCUSO, G.; BARONI, A.; LOSI, E. Immunobiological activities of mould products: functional impairment of human monocytes exposed to aflatoxin B1. *Res Microbiol.* v. 147 n° 5, p. 385-391, 1996.

DALVI, R. R.; DALVI, P. S. Differences in the effects of piperine and piperonyl butoxide on hepatic drug-metabolizing enzyme system in rats. *Drug Chem Toxicol.* v. 14 n° 1-2, p. 219- 29, 1991.

DIREITO, G. M. Desenvolvimento de fase móvel para separação de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando fase normal em sistemas de compressão radial. *Dissertação de Mestrado*, UFRRJ, Rio de Janeiro, 1989.

DOGRA, R. K.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. *Toxicology.* v. 196 n 3, p. 229-36, 2004.

DUARTE, C. M.; VERLI, H.; ARAUJO-JUNIOR, J. X.; MEDEIROS, I. A.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. New optimized piperamide analogues with potent in vivo hypotensive properties. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 23, p. 363 - 369, 2004.

DUGYALA, R. R.; SHARMA, R. P. The effect of aflatoxin B1 on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes. *Int J Immunopharmacol.* v. 18 n° 10, p. 599-608, 1996.

FAO Food and Nutrition, Paper 45. *World Regulations for Mycotoxins*, 1995. A compedium. Rome, 1996.

GLEITZ, J.; BEILE, A.; PETERS, T. (+/-)-kavain inhibits the veratridine- and KCl-induced increase in intracellular Ca²⁺ and glutamate-release of rat cerebrocortical synaptosomes. *Neuropharmacology.* V. 35, N° 2, P. 179-86, 1996.

GUENGERICH, F. P.; KIM, D. H. *In vitro* inhibition of dihydro-pyridine oxidation and aflatoxin B; activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis.* V. 11, p. 2275-2279, 1990.

HAYES, J. D.; JUDAH, D. J.; MCLELLAN, L. I.; NEAL, G. E. Contribution of the glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B. *Pharmacol. Ther.*, v. 50, p. 443-72, 1991.

HINTON, D. M.; MYERS, M. J.; RAYBOURNE, R. A. Immunotoxicity of Aflatoxin B1 in Rats: Effects on lymphocytes and the Inflammatory Response in a Chronic Intermittent Dosing Study. *Toxicological Sciences.* v. 73, p. 362-377, 2003.

IKAN, R. In Natural Products. A Laboratory Guide 2° ed. *NY Academic Press.* p. 233-238, 1991.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. 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.

KAREKAR, V. R.; MUJUMDAR, A. M.; JOSHI, S. S.; *et al.* Assessment of genotoxic effect of piperine using Salmonella typhimurium and somatic and somatic and germ cells of Swiss albino mice. *Arzneimittelforschung*. v. 46, p. 972-975, 1996.

KAWADA, T.; SAKABE, S.; WATANABE, T.; YAMAMOTO, M.; IWAI, K. Some pungente principles of species cause the adrenal medulla to secrete catecholamine in anesthetized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 188, p. 229-233, 1988.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U.; BEDI, K. L. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. *Mol. Cell. Biochem.* v. 189, p. 113-118, 1998.

KHAJURIA A., ZUTSHI U., BEDI KL. Permeability characteristics of piperine on oral absorption -- an active alkaloid from peppers and a bioavailability enhancer. *Ind J Exp Biol.* v.36, p.46-50, 1998

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; KIM, D. H.; MISHIN, V. M.; Yang, C. S. Piperine Enhances the Bioavailability of the Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate in Mice. *J. Nutr.* V. 134, p. 1948-1952, 2004.

LEE, S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; OH, G. J.; LEE, K. S.; LEE, M. K.; HWANG, B. Y.; RO, J. S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. *Chem. Pharm. Bull.* v. 53, p. 832-835, 2005.

LIEBERMAN, M. D.; REYNOLDS, J.; BARTLETT, D.; DALY, J. M. Comparison of acute and chronic protein malnutrition on host antitumor response to interleukin-2 immunotherapy. *Clinical Nutrition.* v. 9, s.1, p. 50, 1990.

MALINI, T.; MANJMARAN, R. R.; ARUNAKARAN, J.; ARULDHAS, M. M.; GOVINDARAJULU, P. Effects of piperine on testis of albino rats. *J Ethnopharmacol.* v. 64 n° 3, p. 219-25, 1999.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Portaria nº 7 de 09 de novembro de 1988. Publicada no Diário Oficial da União em 14 de novembro de 2002.

MCLEAN, M.; DUTTON, M. F. Cellular interactions and metabolism of Aflatoxin: an update. *Pharmacy. Ther.* v. 65, p. 163 -219, 1995.

MEKIA A. M. A.; ESMAILB, E. E. F.; HUSSEINC, A. A.; HASSANEINC H. M. Caspase-3 and heat shock protein- 70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin. *Toxicol.* v.43, p.93-100, 2004.

MENDELSON, R.; BALICK, M. J. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Econ. Bot.*, v. 49, p. 223- 228, 1995.

MOON, E. Y.; RHEE, D. K.; PYO, S. In vitro suppressive effect of aflatoxina B1 on murine peritoneal macrophage functions. *Toxicology.* v. 15, p. 171-179, 1999.

MOON, E. Y.; RHEE, D. K.; PYO, S. Inhibition of various functions in murine peritoneal macrophages by aflatoxina B1 exposure in vivo. *Int J. Immunopharmacol.* v. 21 n° 1, p. 47- 58, 1999.

- MORI, A.; KABUTO, H.; PEI, Y. Q. Effect of piperina on convulsions and on brain serotonin and catecholamine levels in Elmice. *Neurochem. Res.* v. 10, p. 1269-1275, 1985.
- MUNSHI, S. R.; RAO, S. S. Antifertility activity of an indigenous plant preparation (ROC- 101) I Effect on reproduction. *Indian J Med Res.* v. 60, nº 7, p. 1054-1060, 1972.
- OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Rev. Saúde Pública.* V. 31, nº 4, 1997 .
- PADMAJA, R.; ARUN, P. C.; PRASHANTH, D.; DEEPAK, M.; AMIT A.; ANJANA, M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, v. 73, p. 508-510, 2002.
- 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*. v. 46, p. 597-673, 1997.
- PATTERSON, D. S. P. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. *Fed. Cosmet. Toxicol.* v. 11, p. 287-294, 1973.
- PESTKA, J. J.; BONDY, G. S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Physiol. Pharmac.* V. 68, p. 1009-1016, 1990.
- PIER, A. C. An overview of the mycotoxicoses in domestic animals. *J. Am. Vet. med. Assoc.* V. 163, p. 1259-1261, 1973.
- PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J. anim. Sci.* v. 70, p. 3964-3967, 1992.
- PIYACHATURAWAT, P.; GLINSUKON, T. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. *Toxicology letters*. v. 16, p. 351-359, 1983.
- PIYACHATURAWAT, P.; PHOLPRAMOOL, C. Enhancement of fertilization by piperine in hamsters. *Cell Biol Int.* v. 21, nº 7, p. 405-409, 1997.
- PIYACHATURAWAT, P.; SRIWATTANA, W.; DAMRONGPHOL, P.; PHOLPRAMOOL, C. Effects of piperine on hamster sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *Int J Androl.* V. 14, nº 4, p. 283-290, 1991.
- POZZI, C. R.; CORREA, B.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; ORSI, R. B.; MATARAZZO, S. V. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B₁ and aflatoxin B, in rats. *Mycopathologia*. v. 151, p. 21-27, 2000.
- PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the production of nitric oxide and TNF- α *in vitro* as well as *in vivo*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* v. 25, p. 337-346, 1999.
- PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. *Clin. Exp. Metastasis*. v. 19, p. 703- 708, 2002.

RAISUDDIN; SINGH K. P.; ZAIDI, S. I.; SAXENA, A. K.; RAY, P. K. Effects of aflatoxin on lymphoid cells of weanling rat. *J Appl Toxicol.* v. 10, n° 4, p. 245-250, 1990.

RAISUDDIN, S.; SINGH, K. P.; ZAIDI, S. I.; PAUL, B. N.; RAY, P. K. Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats. *Mycopathologia.* v. 124, n° 3, p. 189-194, 1993.

REEN, R. K.; FRUEDRICH, J.; WIEBEL, B.; SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. *Journal of Ethnopharmacology.* v. 58, p. 165- 173, 1997.

REEN R. K.; SIEGFRIED, F.; ROESCH; FRANZ, K.; WIEBEL F. J.; SINGH, J. Piperine Impairs Cytochrome P4501A1 Activity by Direct Interaction with the Enzyme and Not by Down Regulation of CYP1A1 Gene Expression in the Rat Hepatoma 5L Cell Line *Biochemical and biophysical research communications.* v. 218, p. 562-569, 1996.

LIEBERMAN, M. D.; REYNOLDS, J.; BARTLETT, D.; DALY, J. M. Comparison of acute and chronic protein malnutrition on host antitumor response to interleukin-2 immunotherapy. *Clinical Nutrition.* v. 9, s.1, p. 50, 1990.

RODRIGUES, A.; RUEFFA, J.; LAIRES, J. G. Activation of promutagens by porphyrinic biomimetic systems. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* V. 269, n° 2. P. 243-250, 1992.

SELVENDIRAN, K.; SAKATHISEKARAN, D. Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* V. 58, p. 264-267, 2004.

SINGH, J.; REEN, R. K.; WIEBEL, F. J. Piperine, a major ingredient of black and long peppers, protects against AFB 1-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells. *Cancer Lett.* v. 86, n° 2, p. 195-200, 1994.

SINGH, N.; KULSHRESTHA, V. K.; SRIVASTAVA, R. K.; KOHLI, R. P. studies on the analeptic activity of some Piper longum alkaloids. *J. Res. Ind. Med.* V. 8, p. 1-9, 1973.

SMITH, L. J. leukotrienes in asthma. the potential therapeutic role of antileukotriene agents. *Archives of Internal Medicine.* V. 156, p. 2181-2189, 1996.

SMITH, J. E.; MOSS, M. Mycotoxins. *Formation, Analysis und Significance.* John Wiley and Sons, Chichester. 1985.

STONER, G. D.; DANIEL, F. B.; SCHENCK, K. M.; SCHUT, H. A. J.; SANDWISCH, D. W.; GORARA, A. F. DNA binding and adduct formation of aflatoxin B, in cultured human and animal tracheobronchial and bladder tissues. *Carcinogenesis.* V. 3, p. 1345-1348, 1982.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine . *J Ethnopharmacol.* v. 90, n° 2-3, p. 339-346, 2004.

SUNILA, J.; GOTTLÖB, I. Orbital myositis associated with ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology* V. 96, n° 12, P. 3442-3444, 2001.

SWENSON, D. H.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Aflatoxin B₂-3-oxide: evidence for its formation in rat liver *in vivo* and by human liver microsomes *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 60, p. 1036-1043, 1974.

THEUMER, M. G.; LOPEZ, A. G.; MASIH, D. T.; CHULZE, S. N.; RUBINSTEIN, H. R. Immunobiological effects of AFB₁ and AFB₁-FB₁ mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Toxicology*. v. 186, p. 159-170, 2003.

THURSTON, J. R.; RICHARD, J. L.; CYSEWSKI, S. J.; PIER, A. C.; GRAHAM, C. K. Effect of aflatoxin on complement activity in guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* V. 138, p. 300-303, 1972.

UENO, Y.; UENO, I. Toxicology and biochemistry of mycotoxins. *Toxicology. Biochemistry and Pathology of Mycotoxin.*, p. 107-188, Uraguchi, K. and Yamazaki, M. (eds) Kodansha Press, Tokyo (1978).

VENKATASAMY, R., FAAS, L., YOUNG, A. R., RAMAN, A. & HIDER, R. C. Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. *Bioorg. Med. Chem.* v. 12, p. 1905 -1920, 2004.

VENKATESHWARLU, V. Ciclo-oxygenase inhibitors from spices. *Indian Drugs*. V. 34, n° 8, p.427-432, 1997.

WAHHAB, M. A. A.; NADA S. A.; KHALIL F. A. Physiological and toxicological responses in rats feed aflatoxina-contaminated with or without sorbent materials. *Animal feed Science and technology*. v. 97, p. 209-219, 2002.

ANEXOS

Meio YES (Extrato de Levedura e Sacarose) – 20 g de extrato de levedura, 150 g de sacarose, 15 g de agar, 1 L de água destilada q.s.p.

Líquido de Gower – 12,5 g de sulfato de sódio + 33,3 mL de ácido acético glacial + 1000 mL de H₂O destilada

Líquido de Tuerk – 0,1 mL de ácido acético glacial + 0,1 mL de violeta de genciana + 10 mL de H₂O destilada

Tampão Salina 10% – 10 g de cloreto de sódio + 1000 mL de H₂O destilada

Eosina 0,5% – 0,5 g de Eosina + 80 mL de EtOH + 0,5 mL de ácido acético + 20 mL de H₂O destilada

Formalina tamponada a 10% – 900 mL de H₂O destilada + 100 mL de formol + 1 g de carbonato de cálcio

Hematoxilina de Harris (0,1 %) – 0,5 g de Hematoxilina + 10 mL de Glicerina + 25 g de Sulfato de alumínio + 0,1 g de Iodeto de potássio + 37,3 g de Cloreto de potássio

Tampão fosfato (PBS) – 2,587 g de fosfato monopotássico (KH₂PO₄) + 8,494 g de fosfato dissódico (Na₂HPO₄·2H₂O) + 8,5 g de cloreto de sódio + 1000 mL de H₂O destilada

Solução diluente para piperina – 900 µl de Etanol a 95% + 100 µl de DMSO