

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Avaliação da capacidade protetora da piperina  
adicionada à ração contra os efeitos tóxicos da  
aflatoxina B<sub>1</sub> em frangos de corte**

**Verônica da Silva Cardoso**

**2011**



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

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROTETORA DA PIPERINA  
ADICIONADA À RAÇÃO CONTRA OS EFEITOS TÓXICOS DA  
AFLATOXINA B<sub>1</sub> EM FRANGOS DE CORTE**

**VERÔNICA DA SILVA CARDOSO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Maria das Graças Miranda Danelli**  
*e Co-orientação do Professora*  
**Glória Maria Direito**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ  
2011

636.5  
C268a  
T

Cardoso, Verônica da Silva, 1978-

Avaliação da capacidade protetora da piperina adicionada à ração contra os efeitos tóxicos da aflatoxina B1 em frangos de corte / Verônica da Silva Cardoso – 2011.

102 f. : il.

Orientador: Maria das Graças Miranda Danelli.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 67-84.


1. Frango de corte - Toxicologia – Teses. 2. Aflatoxina – Teses. 3. Amidas – Teses. I. Danelli, Maria das Graças Miranda, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

**VERÔNICA DA SILVA CARDOSO**

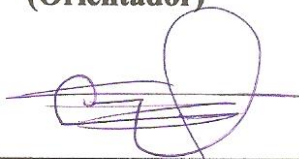
**Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal**

**TESE APROVADA EM 18/04/2011**



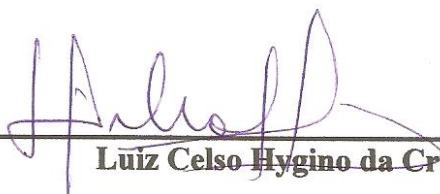
---

**Maria das Graças Miranda Danelli . (Dr.) UFRRJ  
(Orientador)**



---

**Benedito Corrêa . (Dr.) USP**



---

**Luiz Celso Hygino da Cruz . (Dr.) UFRRJ**



---

**Dayse Lima da Costa de Abreu . (Dr.) UFF**



---

**Cristina Amorim Ribeiro de Lima . (Dr.) UFRRJ**

## **DEDICATÓRIA**

“À minha amada filha **Juliana Cardoso de Carvalho** por sempre me amar e pelo grande afeto, mesmo sem entender minha ausência. Por toda alegria, força e superação que demonstra todos os dias. Com muita admiração, sempre busco a determinação que vejo em você de ser feliz e alcançar os objetivos. Você foi e é o meu maior presente!”

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela força, sabedoria, e saúde para realizar este trabalho.

À minha mãe, **Luzia da Silva Cardoso** e meu pai **Sebastião Junqueira Cardoso** e minha avó **Lourdes Pereira da Silva** e meu avô **José Coelho da Silva** por todo apoio, compreensão e por tudo que sou hoje.

Ao meu marido e amigo **André de Carvalho** por todo apoio e companheirismo.

À minha orientadora, Professora **Maria das Graças Miranda Danelli** pela oportunidade e confiança.

Às minhas co-orientadoras professoras **Glória Maria Direito e Cristina Amorim Ribeiro de Lima** pela amizade, apoio, incentivo, ajuda e força.

À minha irmã **Carolina da Silva Cardoso** e meu cunhado **Cid Pinheiro Junior**.

À minha sogra e amiga **Nilza Matioli de Carvalho** e ao meu sogro **Celso Rossi de Carvalho (em memória)**, por sempre terem me dado apoio e incentivo nas horas que mais precisei e pelo entusiasmo que demonstrado em cada vitória conquistada.

À minha grande amiga irmã **Vanessa Araújo da Silva Corecha** pelo carinho amizade e grande ajuda nos momentos difíceis.

À 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 a realização deste projeto.

Aos professores **Carlos Mazur, Lucia Helena Pinto da Silva e Sierberth do Nascimento Brito** pela convivência agradável no Laboratório.

Aos professores do Departamento de Biologia animal, da Área de Histologia e Embriologia, da UFRRJ, **Armando Sales, Rosa Maria Marcos Mendes, Aparecida Alves do Nascimento**, e à técnica de laboratório **Ilza Lucas C. Meireles** pela atenção, amizade e colaboração, sem os quais não poderia ter concluído os objetivos traçados neste estudo.

Ao professor **Marco Edílson Freire de Lima** pela produção e fornecimento da piperina, atenção e incentivo.

À professora **Lusânia Maria Greggi Antunes** do Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP pelo treinamento dos testes de genotoxicidade.

Aos amigos aqui conquistados na Pós- Graduação **Isabela da Silva Castro, Jhonnatha Paulo de Oliveira, Amanda Vargini Nadia Rossi, Aline Rodrigues Bernardo, Cesar Daniel Kruger, Michelle Hipólito da Silva Mateus, Natália da Silva Mateus, Jéssica Mendes de Oliveira** pela constante ajuda e amizade.

À todos os integrantes do Laboratório de Imunologia e Víruses.

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 **Nutrição Animal e Pastagens** do Instituto de Zootecnia e ao **Setor de Avicultura** do Centro Integrado de Produção da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela colaboração e constante incentivo.

Ao professor **Augusto Vidal da Costa Gomes** pela ajuda em elaborar a segunda etapa do experimento.

Aos **técnicos da Zootecnia e da fabrica de ração** pela grande colaboração.

Aos **animais** utilizados no experimento.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de Doutorado.

Enfim, a todos que de alguma forma cooperaram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida profissional.

## RESUMO

CARDOSO, Verônica da Silva. **Avaliação da capacidade protetora da piperina adicionada à ração contra os efeitos tóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub> em frangos de corte.** 2011. 86p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A interferência da piperina (amida extraída da pimenta do reino) adicionada à ração de frangos de corte intoxicados experimentalmente por aflatoxina B<sub>1</sub> (micotoxina de grande relevância no setor avícola) e sua capacidade quimioprotetora foram o principal objetivo deste trabalho. O experimento foi dividido em dois ensaios: (i) O primeiro ensaio foi realizado para determinar os efeitos de diferentes concentrações de piperina (0, 60, 120 e 180 ppm) foram avaliados e sua possível toxicidade. Noventa e seis pintos (*Cobb*), com 7 dias de idade foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=24), por 35 dias consecutivos. Os parâmetros avaliados foram: hematológicos, bioquímicos, histopatológicos (proventrículo, moela, fígado e rim), histomorfométrico (intestino delgado) e parâmetros zootécnicos. A concentração de 60 ppm de piperina adicionada à ração foi segura para frangos de corte, tendo ainda resultado em melhor desempenho dos frangos na fase final (36-42 dias de idade). A concentração de 180 ppm promoveu leucopenia e nas concentrações de 120 e 180 ppm foi observada diminuição do número de heterófilos e monócitos; hepatotoxicidade, com elevação da enzima AST e alterações histopatológicas em ambas as concentrações; diminuição da superfície de absorção nos segmentos (jejuno e íleo) do intestino delgado, porém, sem alteração dos parâmetros zootécnicos. (ii) Para o segundo ensaio com a concentração de 60ppm de piperina: 60 frangos com 9 dias de idade, foram divididos em 4 grupos (n=15): grupo controle, grupo aflatoxina B<sub>1</sub> (0,5 mg aflatoxina B<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo por via oral), grupo piperina (60 ppm adicionada à ração) e grupo piperina associada a aflatoxina B<sub>1</sub>, determinando-se a capacidade quimioprotetora da piperina sendo avaliados os parâmetros zootécnicos, hematológicos, bioquímicos, histopatológicos, histomorfométricos, os efeitos genotóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub> pelo teste do cometa e do micronúcleo, presença de heterófilos tóxicos no sangue periférico. Os frangos intoxicados com aflatoxina B<sub>1</sub> (0,5 mg de aflatoxina B<sub>1</sub>.Kg<sup>-1</sup> de peso vivo) apresentaram: diminuição do ganho médio de peso e piora da conversão alimentar; diminuição do rendimento de carcaça e cortes; hepatotoxicidade, com aumento de peso relativo do fígado e coração, variações macroscópicas do parênquima hepático e elevação das enzimas hepáticas; aumento das enzimas renais, sem evidência de lesões macroscópicas e microscópicas no tecido renal; leucopenia, com diminuição significativa de linfócitos e heterófilos; diminuição da superfície de absorção em função da redução do comprimento e largura das vilosidades de todos os segmentos estudados do intestino delgado; presença de heterófilos tóxicos. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub> foram significativamente reduzidos ou ausentes no grupo piperina associada a aflatoxina B<sub>1</sub>, sem diferença significativa entre o grupo controle e piperina. A ração de frangos de corte com 60 ppm de piperina foi segura, promovendo efeito benéfico tanto nos parâmetros zootécnicos avaliados, como na sanidade avícola, por impedir os efeitos tóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub> em frangos de corte.

Palavras-chave: Aflatoxina B<sub>1</sub>. Frangos de corte. Piperina.



## ABSTRACT

CARDOSO, Verônica da Silva. **Evaluation of the protective capacity of piperine against the toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> added to the diet of broiler chickens.** 2011. 86p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Piperine interference (amide extracted from black pepper) added to the diet of broiler chickens experimentally intoxicated by aflatoxin B<sub>1</sub> (mycotoxin of great importance in the poultry sector) and its chemoprotective capacity were the main goal of this work. The experiment was divided into two assays: (i) The first assay was carried out to determine the effects of different concentrations of piperine (0, 60, 120, 180 ppm) and its possible toxicity in broiler chickens diets. Ninety six male chicks (*Cobb*), seven days old were used, being randomly allocated into four experimental groups (n=24) during 35 consecutive days. The following parameters were evaluated: biochemical, hematological, histopathological (proventriculus, gizzard, liver, kidney), histomorphometric (small intestine) and zootechnic. The concentration of 60 ppm of piperine in the diet was safe for broilers, showing better performance of broilers on period from 36 to 42 days old. The concentration of 180 ppm caused leukopenia and concentrations of 120 and 180 ppm was observed decrease in the number of heterophils and monocytes. Hepatotoxicity was observed by elevated AST enzyme activity, histopathological changes and decreased absorption surface in the segments (jejunum and ileum) of small intestine were observed for both 120 and 180 ppm concentrations. (ii) In the second assay, 60 broilers with nine days old divided into four groups: control, piperine (60 ppm added to diet), aflatoxin B<sub>1</sub> (0.5 mg of aflatoxin B<sub>1</sub>.Kg<sup>-1</sup> of body weight, orally) and piperine associated aflatoxin B<sub>1</sub>, were evaluated by effect chemoprotector of piperine against toxics effects of aflatoxin B<sub>1</sub> being evaluated for zootechnic, biochemical, histopathological and histomorphometric parameters, toxic heterophils in peripheral blood and genotoxic by comet assay and micronucleus were also determined. No changes in the performance parameters were observed after this experiment. Broiler chickens intoxicated with AFB<sub>1</sub> (0.5 mg of aflatoxin B<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> of body weight ) showed: decreased body weight gain and increased feed conversion; reduced carcass and cuts yields; liver toxicity, with increased relative weight of the liver and heart, macroscopic variations of hepatic parenchyma and increase of liver enzymes activity; kidney enzymes increase without evidence of renal tissue damage macroscopic or microscopic; leukopenia with significant reduction of lymphocytes and heterophils; reduction in absorptive surface due to the reduction of the length and width of the villi of all studied segments of small intestine; presence of toxic heterophils. The cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> described above were significantly reduced or absent in the group of broiler intoxicated with aflatoxin B<sub>1</sub> and fed with with piperine. No significant difference between piperine associated aflatoxin B<sub>1</sub> in control and piperine groups were observed. The addition of 60 ppm of piperine in the diet of broiler chickens was safe, promoting beneficial effect both in zootechnic parameters and in poultry health, preventing toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chickens.

Key words: Aflatoxin B<sub>1</sub>. Broiler chicken. Piperine.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura química das principais aflatoxinas.	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b>	Metabolismo da aflatoxina B <sub>1</sub> no fígado de aves.	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b>	Estrutura molecular da piperina.	<b>15</b>
<b>Figura 4.</b>	Biotransformação da piperina em ratos.	<b>16</b>
<b>Figura 5.</b>	Cromatograma da avaliação da piperina incorporada na ração de frangos de corte por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b>	Exposição à luz ultravioleta de amostras de obtidas do cultivo do <i>A. parasiticus</i> . (A) extrato de aflatoxinas antes da purificação (fluorescente) sob exposição à luz ultravioleta.	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b>	Cromatogramas de alguns dos extratos purificados de AFB <sub>1</sub> , obtidos a 350 nm, eluídos em metanol: H <sub>2</sub> O (50:50 v/v) a 0,7 mL/min em coluna microsorb MVD8 C18 µc (15x4,4mm) dos cultivos.	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b>	Critério visual para classificação dos nucleóides no Ensaio do cometa: A. classe I (DNA intacto); B. Classe II (DNA com baixo nível de dano); C. Classe III (com baixo médio nível de dano). D. Classe IV (com alto nível de dano).	<b>33</b>
<b>Figura 9.</b>	Alterações do tecido hepático causadas por diferentes concentrações de piperina adicionada à ração de frangos de corte - Cortes histológicos do fígado.	<b>38</b>
<b>Figura 10.</b>	Efeito da piperina sobre a Conversão Alimentar Média CA (A) e Ganho de Peso Médio GP (B) avaliados no período de 36-42 dias de idade de frangos de corte alimentados com diferentes concentrações de piperina na ração.	<b>41</b>
<b>Figura 11.</b>	Fígado de aves que morreram durante o experimento. (A) fígado da ave do grupo piperina + AFB <sub>1</sub> , óbito aos 17 dias de idade; (B) Fígado da ave do grupo AFB <sub>1</sub> , óbito aos 29 dias de idade.	<b>42</b>
<b>Figura 12.</b>	Peso relativo médio do fígado (g. kg <sup>-1</sup> de peso vivo) de frangos com 36 dias de idade.	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b>	Alterações em cortes histológicos do fígado de frangos de corte do segundo ensaio.	<b>44</b>
<b>Figura 14.</b>	Análise de proteínas plasmáticas totais, albumina, globulinas e perfil hepático e renal das amostras de soros dos grupos controle (C), piperina (P), AFB <sub>1</sub> (A) e tratados com piperina + AFB <sub>1</sub> (P+A).	<b>46</b>
<b>Figura 15.</b>	Efeito da piperina sobre a leucopenia induzida através da intoxicação de frangos de corte com Aflatoxina B <sub>1</sub> .	<b>48</b>
<b>Figura 16.</b>	Efeito da piperina nos valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos de frangos intoxicados com aflatoxina B <sub>1</sub> .	<b>49</b>
<b>Figura 17.</b>	Ação da piperina sobre o efeito genotóxico da aflatoxina B <sub>1</sub> pelo teste do Cometa, a partir do sangue periférico de frangos de corte.	<b>50</b>
<b>Figura 18.</b>	Raiz quadrada da média de micronúcleos + 1 em 2000 eritrócitos nos tempos 24, 48, 72, 96 horas e com 26 dias de intoxicação de amostras de sangue periférico de frangos de corte.	<b>51</b>
<b>Figura 19.</b>	Teste do cometa. A visualização dos danos ao DNA observado no microscópio de fluorescência Olympus, equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm (aumento de 400x).	<b>52</b>
<b>Figura 20.</b>	Fotomicrografia com aumento de 1000 X em microscópio óptico (Olympus® CH30). NCEMN: Eritrócitos normocromáticos com	

	micronúcleo indicados pela seta. PCE: eritrócitos policromáticos, NCE: eritrócitos normocromáticos do sangue periférico do grupo de frangos que recebeu aflatoxina B <sub>1</sub> .	53
<b>Figura 21.</b>	Fotomicrografia com aumento de 1000 X em microscópio óptico (Olympus® CH30) de heterófilos tóxicos em esfregaços sanguíneos de frangos de corte que receberam piperina e aflatoxina B <sub>1</sub> .	53
<b>Figura 22.</b>	Contagem de heterófilos tóxicos observada (aumento de 1000x). Foram analisadas 100 heterófilos de amostras do sangue periférico de frangos de corte após 26 dias de experimentação.	54
<b>Figura 23.</b>	Rendimento de carcaça de frangos de corte com 36 dias de idade.	57

## ÍNDICE DE QUADROS

**Quadro 1.** Efeito das aflatoxinas adicionada à ração sobre aves.

**10**

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Composição percentual e nutricional das rações de referência utilizadas na dieta pré-inicial (0-7 dias de idade) nos dois ensaios.	<b>24</b>
<b>Tabela 2.</b>	Composição percentual e nutricional das rações de referência utilizadas em cada fase experimental no primeiro ensaio.	<b>25</b>
<b>Tabela 3.</b>	Composição percentual e nutricional das rações de referência utilizadas em cada fase experimental no segundo ensaio.	<b>26</b>
<b>Tabela 4.</b>	Distribuição dos grupos por tratamento no primeiro ensaio.	<b>30</b>
<b>Tabela 5.</b>	Distribuição dos grupos por tratamento no segundo ensaio.	<b>30</b>
<b>Tabela 6.</b>	Perfil bioquímico de frangos de corte com diferentes concentrações de piperina.	<b>36</b>
<b>Tabela 7.</b>	Efeito da ingestão das diferentes concentrações de piperina incorporada na ração de frangos de corte por 35 dias sobre os parâmetros hematológicos.	<b>37</b>
<b>Tabela 8.</b>	Histomorfometria de intestino delgado de frangos de corte, submetidos a quatro diferentes tratamentos com piperina por 35 dias: comprimento das vilosidades (CV); largura das vilosidades (LV); profundidade de cripta (PV) e superfície de absorção (SA).	<b>39</b>
<b>Tabela 9.</b>	Avaliação dos parâmetros zootécnicos de frangos de corte tratados com diferentes concentrações de piperina adicionada à ração por 35 dias.	<b>40</b>
<b>Tabela 10.</b>	Efeito da piperina sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) nos diferentes períodos de produção.	<b>40</b>
<b>Tabela 11.</b>	Histomorfometria de intestino delgado de frangos de corte tratados com piperina e aflatoxina B <sub>1</sub> : comprimento das vilosidades (CV), largura das vilosidades (LV), profundidade de cripta (PC) e superfície de absorção (SA).	<b>45</b>
<b>Tabela 12.</b>	Efeito da piperina sobre frangos de corte intoxicados com aflatoxina B <sub>1</sub> sobre os parâmetros hematológicos.	<b>47</b>
<b>Tabela 13.</b>	Relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE/NCE) de em um total de 1000 eritrócitos de frangos de corte.	<b>54</b>
<b>Tabela 14.</b>	Efeito da piperina adicionada à ração de frangos de corte intoxicados por aflatoxina B <sub>1</sub> sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) nos diferentes períodos de produção.	<b>55</b>
<b>Tabela 15.</b>	Parâmetros de carcaça avaliados em frangos de corte que receberam piperina adicionada à ração e intoxicados com aflatoxina B <sub>1</sub> .	<b>56</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Geral</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Específicos</b>	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Micotoxinas</b>	<b>4</b>
3.1.1 Aflatoxinas	5
3.1.2 Propriedades físico-químicas das aflatoxinas	5
3.1.3 Absorção, biotransformação e detoxificação das aflatoxinas	6
3.1.4 Efeitos biológicos e tóxicos da aflatoxina B <sub>1</sub>	8
3.1.5 Efeitos tóxicos da aflatoxina B <sub>1</sub> em frangos de corte	8
3.1.6 Hematologia e bioquímica sérica em afalatoxicose aviária	10
3.1.7 Métodos de controle da aflatoxicose	12
<b>3.2 Piperina</b>	<b>15</b>
3.2.1 Biotransformação e excreção da piperina	15
3.2.2 Atividades biológicas e farmacológicas	16
3.2.2.1 Efeito antioxidante	17
3.2.2.2 Efeito antiinflamatório	17
3.2.2.3 Efeito imunomodulador	18
3.2.2.4 Efeito antimetastático e antitumoral	18
3.2.2.5 Efeito sobre a biodisponibilidade de drogas, fitoquímicos e pró-carcinógenos	19
<b>3.3 Biomarcadores</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Aves e Manejo</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Obtenção da Piperina</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Rações Experimentais e Incorporação de Piperina na Ração de Frangos de corte</b>	<b>23</b>
<b>4.4 Determinação da Eficiência da Incorporação de Piperina na Ração</b>	<b>27</b>

<b>4.5 Obtenção e Preparo das Soluções de Aflatoxina B<sub>1</sub></b>	<b>27</b>
<b>4.6 Material Biológico para Análise</b>	<b>29</b>
<b>4.7 Delineamento Experimental</b>	<b>29</b>
4.7.1 Primeiro ensaio	30
4.7.2. Segundo ensaio	30
<b>4.8 Metodologia</b>	<b>31</b>
4.8.1 Análises hematológicas e avaliação de alterações bioquímicas (hepáticas e renais)	31
4.8.2 Histopatologia dos órgãos e histomorfometria dos segmentos do intestino delgado	31
4.8.3 Avaliação da genotoxicidade	32
4.8.3.1 Ensaio de eletroforese em gel de célula única (Ensaio do Cometa)	32
4.8.3.2 Teste do micronúcleo e frequência de eritrócitos policromáticos	33
4.8.3.3 Avaliação de heterófilos tóxicos no sangue periférico	33
4.8.4 Parâmetros zootécnicos	34
<b>4.9 Análise Estatística</b>	<b>35</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Primeiro Ensaio</b>	<b>36</b>
5.1.1 Análise da bioquímica sérica hepática e renal	36
5.1.2 Análise hematológica	36
5.1.3 Análise macroscópica e histopatológica	37
5.1.4 Análise histomorfométrica do intestino delgado	39
5.1.5 Avaliação dos parâmetros zootécnicos	39
<b>5.2 Segundo Ensaio</b>	<b>42</b>
5.2.1 Análise macroscópica do fígado	42
5.2.2 Análise histopatológica do fígado e rim e histomorfometria do intestino delgado	43
5.2.3 Análise da bioquímica sérica hepática e renal	45
5.2.4 Análise hematológica	47

5.2.5 Análise genotóxica	49
5.2.6 Avaliação dos parâmetros zootécnicos	55
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>85</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola vem crescendo nas últimas décadas como um dos setores agrícolas de maior dinamismo. O nível tecnológico alcançado pela avicultura industrial nacional colocou essa atividade em posição privilegiada na pecuária brasileira, com elevado nível de produtividade. O aprimoramento genético, as técnicas de manejo, nutrição, sanidade possibilitaram o desenvolvimento de uma indústria eficiente e mundialmente competitiva.

A qualidade do alimento fornecido é sem dúvida um fator fundamental para o bom desempenho de um plantel avícola. Na formulação das rações em que vários ingredientes são empregados, o milho destaca-se como cereal de maior importância, ao participar de 70% das rações industrializadas. Como se sabe, o milho é um excelente substrato para o crescimento de fungos, especialmente de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, responsáveis pela produção de micotoxinas. As aflatoxinas constituem o grupo de micotoxinas mais estudado, sendo as aflatoxinas identificadas como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> as que apresentam maior interesse médico-sanitário. A aflatoxina B<sub>1</sub> que é a mais tóxica das quatro, foi classificada em 1993, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como carcinogênica para humanos. Atualmente, a aflatoxina B<sub>1</sub> é reconhecida como sendo mais potente carcinógeno hepático e, por sua larga distribuição pode acometer uma ampla variedade de espécies de animais.

As intoxicações provocadas pelas aflatoxinas podem ser agudas, subagudas ou crônicas, e os problemas causados por elas podem variar desde alterações na pele até a morte, dependendo da concentração e do período de exposição à toxina. Os efeitos mais comuns observados em frangos, especificamente, nas intoxicações crônicas se caracterizam por uma redução acentuada na produtividade, que se observa diminuição da velocidade de crescimento e da eficiência alimentar, o que é em grande parte decorrente da redução do metabolismo protéico e da absorção de gorduras.

Ainda hoje a utilização de grãos contaminados com aflatoxinas na formulação de rações continua sendo um problema relevante, com sérias implicações econômicas para a indústria avícola.

O clima tropical e subtropical predominante no Brasil, com temperatura média entre 25-30°C e umidade relativa maior do que 13% favorecem o desenvolvimento de fungos em produtos agrícolas. Além dos fatores climáticos diversos outros fatores ligados ao manejo de grãos tais como: pH, taxa de oxigenação, tempo e condições de armazenamento, grau de contaminação e condições físicas dos grãos ou sementes, também são decisivos para o crescimento de fungos e produção de micotoxinas.

As aflatoxinas são produtos secundários do metabolismo fúngico, são quimicamente estáveis, sendo difícil inativá-las através de métodos físicos ou químicos. Portanto, quando presentes em um substrato, os métodos utilizados no processamento das rações não são capazes de eliminá-las, nem mesmo de diminuir sua concentração significativamente.

Nos últimos anos intensificaram as pesquisas e o emprego de substâncias naturais como aditivos em rações, visando aumentar a resistência do organismo animal contra diversas doenças e adversidades ambientais. A possibilidade destas substâncias não deixarem resíduos detectáveis em carne, ovos e derivados e as diversas observações evidenciando promissores efeitos positivos sobre os animais de produção reduzindo perdas econômicas.

A idéia de se adicionar piperina, principal amida extraída das sementes da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), à ração de frangos de corte foi decorrente de sua ampla atividade biológica e farmacológica já demonstrada por pesquisas anteriores. Dentre essas atividades, pode-se citar sua atividade antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e imunomoduladora descrita em modelo murino. Além disso, o seu efeito quimiopreventivo contra pró-

carcinógenos ativados pelo citocromo P-450 vem despertando a atenção de diversos pesquisadores.

No que diz respeito ao pró-carcinógeno aflatoxina B<sub>1</sub>, pode-se afirmar que sua biotransformação guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica: ao ser biotransformada pelo sistema microssomal hepático, através de enzimas do citocromo P-450, gera diversos subprodutos agudamente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos como o aflatoxicol e 8,9-epóxido de aflatoxina. Dados da literatura revelam que a piperina é capaz de diminuir significativamente a toxidez da aflatoxina B<sub>1</sub> em hepatócitos de ratos, através do citocromo P-450 (in vitro).

Estudos preliminares, empregando a piperina como agente quimiopreventivo na intoxicação experimental com aflatoxinas em ratos e frangos de corte, mostraram resultados promissores que motivaram o desenvolvimento da presente pesquisa.

A possibilidade de elaboração de uma ração aditivada com uma substância natural não tóxica, facilmente obtida e purificada, que não deixa resíduos detectáveis em carne e derivados, e que também seja capaz de proteger contra os efeitos tóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub>, poderá promover não somente a melhoria da sanidade avícola, como também contribuir para o aumento da produtividade neste setor.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a capacidade quimioprotetora da piperina como aditivo na ração de frangos de corte intoxicados experimentalmente com aflatoxina B<sub>1</sub>.

### **2.2 Específicos**

- 2.2.1** Analisar a capacidade de diferentes concentrações de piperina adicionada a ração em promover alterações hematológicas e no perfil bioquímico hepático e renal;
- 2.2.2** Analisar o efeito de diferentes concentrações de piperina sobre tecidos de órgãos alvo, através de exames histopatológicos e histomorfométricos de segmentos do intestino delgado;
- 2.2.3** Avaliar o efeito da ração aditivada com piperina sobre os parâmetros zootécnicos;
- 2.2.4** Determinar a concentração de piperina a ser adicionada a ração para realização do estudo sobre seu efeito quimiopreventivo em intoxicação por aflatoxina B<sub>1</sub>;
- 2.2.5** Determinar os efeitos tóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub>, piperina e da piperina associada a AFB<sub>1</sub> após 26 dias de exposição diária pela avaliação dos parâmetros zootécnicos, hematológicos, bioquímicos, histopatológico, histomorfométricos e genotóxicos.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Micotoxinas

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos filamentosos. Sob certas condições, cepas de algumas espécies podem produzir substâncias, com funções variadas, como as de proteger e perpetuar a espécie. Para poder atuar dificultando o desenvolvimento de seus competidores no meio ambiente suas estruturas devem ser eficientes em pequenas concentrações e estáveis em condições críticas (COULOMBE, 1991, BADIALE-FURLONG, 2010). Diversos fatores como, temperatura, pH, tipo de substrato e teor de oxigênio são determinantes na produção de micotoxinas (CALVO, et al. 2002).

Existem centenas de tipos diferentes de micotoxinas, cuja ocorrência, toxicidade e órgão alvo da intoxicação variam consideravelmente (MOSS, 1996, BENNETT; KLICH, 2003).

Quando presentes em alimentos destinados ao consumo humano ou animal podem causar danos à saúde provocando distúrbios fisiológicos ou morte. Em geral, as micotoxinas são encontradas nos grãos em baixas concentrações e por isso podem não ocasionar alterações anatomopatológicas evidentes em animais de produção, mais mesmo assim elas podem tornar os animais mais suscetíveis a doenças infecciosas e reduzir a produtividade acarretando perdas econômicas significativas (CRUZ, 1995; SANTURIO, 2000; CAST, 2003, OSWALD, et al., 2005).

Em todas as partes do mundo o crescimento de fungos é o principal problema na conservação de grãos porque além de reduzir a qualidade dos produtos derivados, podem determinar efeitos adversos à saúde humana e animal. Na literatura especializada podemos encontrar diversas pesquisas que demonstram a presença de diferentes concentrações de micotoxinas em alimentos, tanto para consumo humano, como em rações animais (SABINO, 1980, 1990; BALDISSERA et al., 1992; SANTURIO, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; ONO, et al. 2004; RAWAL et al., 2010). Assim, as micotoxinas são reconhecidas como sendo um importante problema de saúde pública e uma grande preocupação no âmbito econômico, por causa dos prejuízos em diversos setores comerciais, incluindo aos produtores de grãos, criadores de animais, bem como os processadores de alimentos e rações e seus derivados (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MINAMI et al., 2004).

Micotoxicose é o nome das alterações patológicas não transmissíveis e de caráter não infecciosas que podendo ocorrer tanto em animais como em seres humanos, e que são desencadeada pelo consumo, inalação ou contato com rações ou alimentos previamente contaminados por fungos toxigênicos (HOERR, 1991; OSWALD, et al., 2005). Os efeitos tóxicos causados pelas micotoxinas podem ser agudos, subagudos ou crônicos, resultando em: citotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade, mutagenicidade e imunossupressão. Já os sinais e os sintomas observados nas micotoxicoses vão desde lesões de pele ou sinais e sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade, genotoxicidade e até mesmo a morte. (PITT, 2000; BUENO et al., 2001; CABASSI, 2007).

Cabe ressaltar que os efeitos e sintomas podem não cessar imediatamente após a interrupção do consumo do alimento contaminado por micotoxina e que o fungo também pode não mais estar presente no substrato. Mesmo com a eliminação do fungo, a toxina se manterá ativa e contaminará quem ingerir o alimento. Em função do tipo de micotoxina, do tempo de exposição e da dose ingerida, os sintomas observados podem ser: diarreia, vômito, cefaléia, dermatites, hemorragias e morte (agudos), diminuição da velocidade de crescimento, perda de peso, alterações imunológicas e neurológicas, hepatose, nefrose, em casos de intoxicações subagudos ou crônicos (BUENO et al., 2001; BADIALE-FURLONG, 2010).

### 3.1.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas constituem um importante grupo de micotoxinas, produzidas por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (YU et al. 2005).

As aflatoxinas de maior interesse médico-sanitário são identificadas como aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (COULOMBE, 1991). Enquanto o *A. flavus* é encontrado amplamente distribuído por todo mundo e é produtor de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, o *A. parasiticus* ocorre principalmente nas Américas e na África e é capaz de produzir as quatro aflatoxinas (IARC, 2003).

As contaminações por aflatoxinas ocorrem com maior intensidade em oleaginosas como amendoim, e em cereais como o milho, trigo, cevada, sorgo e arroz. (ANDREATTI, 2006).

O uso freqüente de grãos contaminados por aflatoxinas, na fabricação de rações é considerado um problema importante por provocar perdas econômicas na produção avícola, bem como na criação de outras espécies domésticas de interesse econômico (BAILEY et al., 1998; KUBENA et al., 1998; LEDOUX et al., 1999; PARLAT et al., 1999, ROSMANINHO et al., 2001)

Não se reconhece nenhum método que seja totalmente eficaz para a inativação das aflatoxinas. A eficiência de cada processo dependerá do tipo de alimento a ser descontaminado, de sua atividade de água, dos tipos de aflatoxinas nele presentes, do nível de contaminação e do grau de intensidade de sua ligação com os constituintes do alimento, principalmente as proteínas (RUSTOM, 1997).

Em 1993, a AFB<sub>1</sub> foi classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como carcinogênica para seres humanos, ou seja, passou a ser considerada um carcinógeno de classe I. Atualmente, a AFB<sub>1</sub> é amplamente reconhecida como sendo o mais potente carcinógeno hepático, podendo acometer uma ampla variedade de espécies de animais, incluindo o homem estando implicada na etiologia do câncer hepático no homem, através da ingestão de alimentos contaminados (IARC, 1993).

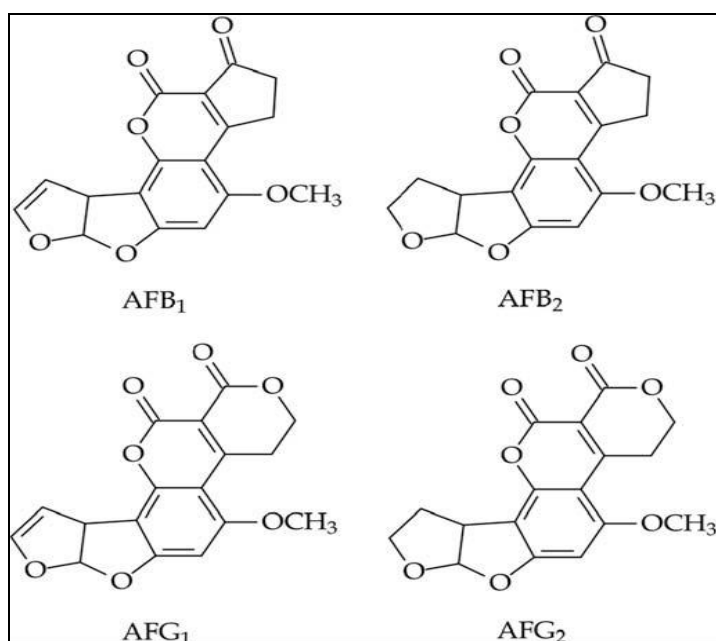
Segundo levantamento feito por Binder et al. (2007), amostras milho, arroz, ração, ingredientes de ração, trigo, farelo de trigo, amendoim e outros, vindos de diversos países da Europa, Ásia e Oceania apresentavam contaminação por micotoxinas. O sudoeste e o sudeste da Ásia e Oceania foram às regiões onde houve o maior número de amostras positivas para AFB<sub>1</sub>, sendo encontradas concentrações médias de 38, 52 e 34 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Dentre os diferentes tipos de amostras, as maiores concentrações foram encontradas no milho, que é um dos principais constituintes de rações, principalmente rações destinadas às aves de produção.

### 3.1.2 Propriedades físico-químicas das aflatoxinas

As aflatoxinas são moléculas de baixo peso molecular, com grande similaridade estrutural entre elas e recebem a designação B ou G devido à propriedade de fluorescência azul (blue= B) ou verde-azulada (green= G) sob luz ultravioleta de comprimento de onda longo, 365 nm (ASAO et al., 1963). Apresentam-se na forma de cristais numa escala de cores que vai de incolor a amarelo pálido; são solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, etanol, metanol e dimetilsulfóxido; quando secas apresentam ponto de fusão de 269 °C; quando dissolvidas em solventes polares são instáveis sob radiação ultravioleta, na presença de oxigênio e em condições extremas de pH (pH < 3 e pH > 10), e também na presença de

agentes oxidantes; mas são degradadas facilmente através da reação com amônia ou hipoclorito de sódio (IARC, 1993).

As aflatoxinas pertencem a uma classe de compostos denominados furanocumarinas e todas apresentam um núcleo cumarina associado com o furano. As quatro toxinas principais, denominadas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, têm estruturas bastante semelhantes: as aflatoxinas do grupo B possuem anel ciclopentenona e as do grupo G, lactona insaturada. As aflatoxinas do grupo M são derivados hidroxilados de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (RAWAL et al., 2010). A figura 1 mostra a estrutura química das quatro principais aflatoxinas.



**Figura 1.** Estrutura química das principais aflatoxinas (RAWAL et al., 2010).

### 3.1.3 Absorção, biotransformação e detoxificação das aflatoxinas

A biotransformação das aflatoxinas varia de acordo com a espécie animal, porém, outros fatores também influem sobre a sua metabolização como: sexo, idade, saúde e dieta (RAWAL et al., 2010).

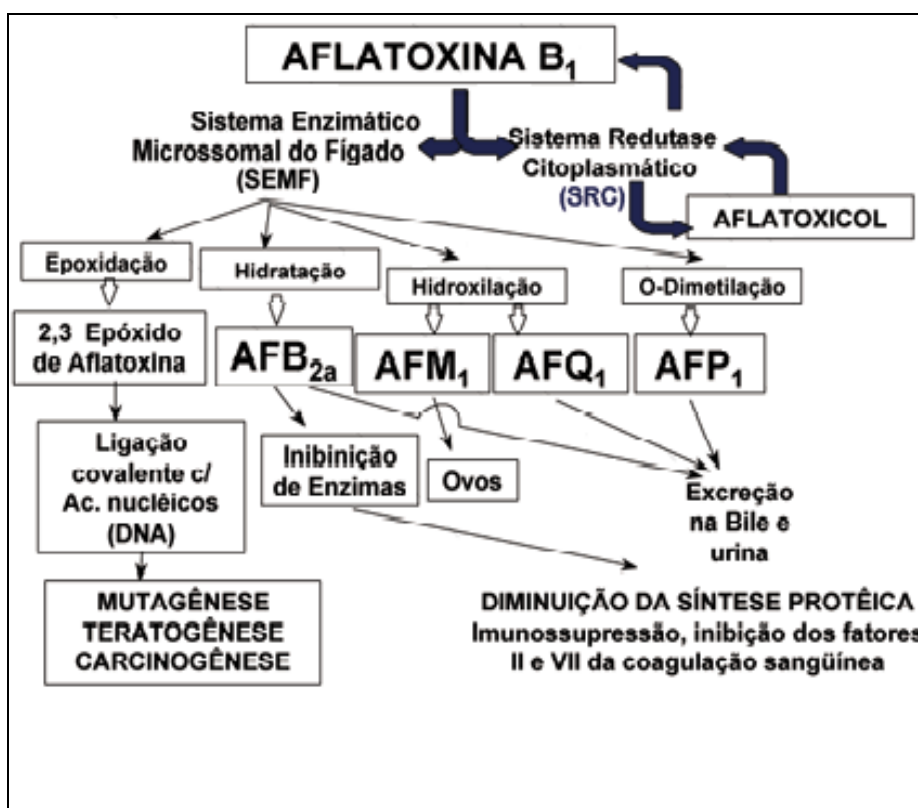
O mecanismo de biotransformação da AFB<sub>1</sub> tem sido estudado com maior interesse, uma vez que está intimamente correlacionado com a sua ação tóxica. Depois de ser absorvida, por difusão passiva, no trato gastrointestinal, a AFB<sub>1</sub> é imediatamente ligada, de forma reversível, à albumina e, em menor escala, a outras proteínas. Formas de aflatoxinas ligadas e não ligadas a proteínas séricas distribuem-se pelos tecidos, especialmente pelo tecido hepático (WYATT, 1991; SANTURIO, 2000; GUO et al., 2008).

A maioria dos carcinógenos genotóxicos é biotransformada por enzimas como citocromo P-450 e glutatona S-transferase, em compostos mais hidrossolúveis e, portanto passíveis de serem excretados. Os produtos gerados são extremamente eletrofílicos e irão reagir com centros nucleofílicos das células, dentre eles regiões do DNA, levando à formação de aductos. Esses aductos tendem a ser reparados por enzimas de reparo, mas caso a célula se divida antes que isto ocorra, essa ligação pode resultar numa alteração permanente no DNA. Para o surgimento de um tumor, esta alteração tem que ocorrer em determinadas regiões de genes que estimulam (proto-oncogenes) e/ou inibam (genes supressores de tumor) a

proliferação celular, levando assim, ao ganho ou à perda da função destes genes (PINTO; FELZENSWALB, 2003).

Em células normais, bases alquiladas, como a AFB<sub>1</sub> podem provocar lesões citotóxicas como resultado de inúmeras tentativas do MMR (reparo de erros de pareamento de bases “mismatch repair”) de removê-las, levando ao acúmulo dessas lesões e subseqüente apoptose (PINTO; FELZENSWALB, 2003).

Em sua forma natural, a AFB<sub>1</sub> é considerada um pró-carcinógeno, mas não é mutagênica. Depois de absorvida, ao chegar ao fígado, ela será biotransformada pelo sistema microsomal hepático, por enzimas do citocromo P-450. Nesse processo de biotransformação vão ocorrer várias reações. Ocorre o-dealquilação para AFP<sub>1</sub>; ceterredução para aflatoxicol; epoxidação para AF-8,9-epóxido de aflatoxina, que é um composto altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico; e hidroxilação para AFM<sub>1</sub> ou AFQ<sub>1</sub>; e hidratação para AFB<sub>2a</sub> (SANTURIO, 2000) (Figura 2).



**Figura 2.** Metabolismo da aflatoxina B<sub>1</sub> no fígado de aves (SANTURIO, 2000)

Apesar do metabolismo hepático ser a principal rota de detoxificação, a mucosa do estômago também possui enzimas catalíticas capazes de reduzirem a toxicidade da AFB<sub>1</sub> (GALTIER, 1998).

Em humanos e em diversas espécies de animais, a principal via de detoxificação parece estar relacionada com conjugação à glutatona S-hidrolase endógena. A reação é catalisada pelas enzimas glutatona S-transferase, que pertencem a uma família de proteínas multifuncionais diméricas, importantes na fase II de biotransformação que envolve a detoxificação e excreção de uma variedade de substâncias xenobióticas. Aparentemente, a taxa de conjugação entre o epóxido de AFB<sub>1</sub> e a glutatona S-hidrolase é o principal determinante para a sensibilidade ou resistência à AFB<sub>1</sub> (RAWAL et al., 2010; KIM et al., 2010).

### **3.1.4. Efeitos biológicos e tóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub>**

Além de ser a mais comumente encontrada nos alimentos contaminados por aflatoxinas, a AFB<sub>1</sub> é considerada a mais tóxica do grupo, seguida das aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> (ZIRINGUE et al., 1993; RAWAL et al., 2010). Segundo Legator, (1966) todas as aflatoxinas têm efeito carcinogênico.

Ingredientes de ração contaminados por AFB<sub>1</sub> têm impacto profundo e negativo sobre a conversão alimentar, reduzindo significativamente a produtividade na indústria avícola (RAWAL et al., 2010). Rauber et al. (2007) também observaram reduções significativas no consumo de ração com baixas concentrações de aflatoxinas na dieta (100, 200, 500 e 1.000 ppb).

Bonsi et al. (1999), demonstraram que a AFB<sub>1</sub> pode inibir a atividade do nucleotídeo fosfodiesterase cíclica nos tecidos do cérebro, fígado, coração e rins. Como a fosfodiesterase hidrolisa os nucleotídeos cíclicos, essa inibição resulta em concentrações mais elevadas de AMPc intracelular. Outro mecanismo de ação consiste na inibição de receptores de adenosina na superfície celular, que modulam a atividade da adenilato ciclase. Foi constatado que a adenosina provoca contração do músculo liso isolado das vias aéreas e induz a liberação de histamina por mastócitos locais (PÓVOA, 2008).

Clifford; Rees (1996) constataram que, uma hora após a ingestão da aflatoxina, já havia inibição da síntese protéica, sugerindo a entrada da toxina no núcleo do hepatócito, onde ela se uniria ao DNA e inibiria, deste modo, a síntese de DNA-polimerase e reduziria a síntese de RNA-mensageiro. Além disso, Wyatt (1991) relatou a alteração da síntese de proteínas no tecido hepático, comprometendo dessa maneira, o funcionamento do fígado. Tal fato acarreta uma profunda alteração nas propriedades funcionais e na síntese das proteínas nas aves.

No que diz respeito ao efeito citotóxico verificou-se que a AFB<sub>1</sub> é capaz de induzir a peroxidação lipídica em fígados de ratos provocando dano oxidativo aos hepatócitos (SHEN et al., 1996).

As aflatoxinas estão entre os mais potentes agentes genotóxicos conhecidos (MCCANN et al., 1975; FOSTER et al., 1983; BUSBY et al., 1985). A AFB<sub>1</sub> induz aberrações cromossômicas, aumento da frequência de micronúcleos, troca de cromátides irmãs, síntese imprevista do DNA, quebras cromossômicas e formação de aductos em células humanas e de roedores (BIEHL; BUCK, 1987; GEYIKOGLU; TUKEZ, 2005; LIN et al., 2006; REDDY et al., 2006;). A ligação da AFB<sub>1</sub>-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e a sua atividade biológica, através da ligação covalente em constituintes intracelulares, incluindo DNA e RNA, gerando aductos de DNA, caracterizando seu potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico (SOTOMAYOR et al., 2003). AFB<sub>1</sub>-8-9-epóxido forma uma ligação covalente com a guanina N7 (LILLEHOJ, 1973) e forma AFB<sub>1</sub>-N-guanina que se une às células alvo (BAILEY et al., 1988). Os resultados são transversões G-T, reparo insuficiente do DNA ou até inibição deste, lesões, mutações e subsequente formação de tumor (FOSTER et al., 1983). A formação de carcinomas hepatocelulares no homem tem sido atribuída à transversão G-T no códon 249 do gen supressor de tumores p53 (WANG; GROOPMAN, 1999).

### **3.1.5. Efeitos tóxicos da aflatoxina B<sub>1</sub> em frangos de corte**

Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para o diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança consiste em alterações no tamanho dos órgãos. Ocorre aumento de tamanho de fígado, baço e rins, enquanto a bursa e o timo diminuem. O fígado de aves com aflatoxicose tem como característica a coloração amarelada e friabilidade, com acentuada infiltração de gordura. Na aflatoxicose não ocorrem erosões na moela, apesar de muitas aves com lesões características dessa micotoxicose também



apresentarem esse tipo de alteração. Isto pode ser explicado porque cerca de 36% das linhagens de *A. flavus*, além de produzirem aflatoxinas, também produzem uma outra micotoxina, o ácido ciclopiazônico que é responsável por erosões na mucosa da moela (TESSARI; CARDOSO, 2008)

O grau de infiltrado gorduroso no tecido hepático depende da dose e do tempo de intoxicação por AFB<sub>1</sub>, chegando a 68% de aumento do fígado em frangos de corte (MERKLEY et al., 1987). Segundo Schaeffer; Hamilton, (1991), a aflatoxicose causa esteatorréia, que pode ser severa, com o aumento de até dez vezes o teor de gordura no material fecal. Em frangos de corte, a esteatorréia é acompanhada por uma diminuição nas atividades específica e total da lipase pancreática, a principal enzima digestiva das gorduras e pela diminuição nos sais biliares, os quais são necessários, tanto para a digestão, como para a absorção de gorduras. Como consequência, também ocorre considerável redução da absorção de vitaminas lipossolúveis (vitaminas A e E). Por mecanismos ainda não bem esclarecidos, as aflatoxinas podem também reduzir os níveis plasmáticos de outras vitaminas como a colina, vitaminas do complexo B, riboflavina, tiamina, ácido pantotênico (SANTURIO, 2000; CRUZ, 2010).

A aflatoxicose crônica em aves 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. As aflatoxicoses agudas e subagudas não são relatadas comumente, sendo caracterizadas por desordens hepáticas, revelando 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 (HOERR, 1991; LEESON et al., 1995; MORAES, 2004).

Ortali et al. (2005), 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 o grupo controle. As principais alterações encontradas foram: degeneração hidrópica e vacúolos de gordura nos hepatócitos centrolobulares.

Dependendo de sua concentração na ração, as aflatoxinas podem ter ação sobre o sistema circulatório, provocando coagulopatias, por inibição da biossíntese dos fatores de coagulação II e VII, e aumento da fragilidade capilar. Mesmo em níveis insuficientes para provocar alterações clínico-patológicas, elas podem interferir negativamente na resposta imune (CRUZ, 2010).

Especificamente com frangos de corte, os efeitos das aflatoxinas mostraram-se notadamente maiores na fase inicial de crescimento. Animais 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., 1975; MARIANI, 1998).

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

Em surtos de aflatoxicose no campo, os sintomas e alterações nutricionais mais marcantes é a má absorção que se manifesta como partículas de ração mal digeridas na excreta das aves que está associada com esteatorréia ou excreção aumentada de lipídeos Essa má absorção prejudica a eficiência da conversão alimentar e, conseqüentemente, aumenta o custo da produção (OSBORNE; HAMILTON, 1981; TESSARI; CARDOSO, 2008). Essa má absorção prejudica a eficiência da conversão alimentar e, conseqüentemente, aumenta o custo da produção. Leeson et al. (1995) e Tessari; Cardoso (2008) observaram extrema palidez das

mucosas e pernas, que parece ser resultado da menor absorção, diminuição no transporte e na deposição tecidual dos carotenóides da dieta.

Segundo Cuccioloni et al. (2009), estudos in vitro demonstraram ainda, que as aflatoxinas funcionam como inibidor competitivo de proteases de serina, como a trombina, tripsina e elastase. Essas enzimas estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos e respostas celulares como coagulação, digestão e resposta inflamatória.

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 no fígado que, ao contrário dos mamíferos, não sintetizam lipídeos no tecido adiposo. Além disso, a produção de bile se torna aumentada e se encontra muito diluída contendo 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 (CRUZ, 2010).

Giacomini et al. (2006), observaram que o coração, baço, moela, fígado e as carcaças de frangos de corte intoxicados com 3 ppm de AFB<sub>1</sub>, apresentavam um aumento significativo de peso. As análises anatomopatológicas das carcaças coletadas ao final do experimento (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, do ganho de peso e que apresentaram falta de uniformidade.

O dano mais proeminente das aflatoxinas à produção animal decorre do efeito de baixas concentrações de aflatoxinas nas rações, insuficientes para desencadear um quadro de alterações perceptíveis, mas capazes de alterar o desempenho animal. A perda no ganho de peso é determinada pela redução nas taxas de síntese protéica e por alterações no metabolismo energético (KUBENA et al., 2001; ARAVIND et al., 2003), comprometendo o sistema imunológico dos animais e tornando-os propensos a doenças infecciosas e parasitárias. Os efeitos deletérios das aflatoxinas em aves é dose-dependente e estão relacionados no quadro 1.

**Quadro 1.** Efeitos das aflatoxinas adicionadas à ração sobre aves.

Efeitos	Dose (ppm)
Morte súbita, necrose hepática e hemorragia	1 a 10
Imunogênese deprimida	0,25
Resistência diminuída	0,6 a 1
Ganho de peso reduzido	1,5 a 2,5
Produção de ovos reduzida	2-8

(ANDREATTI, 2006)

### 3.1.6 Hematologia e bioquímica sérica em aflatoxicose aviária

A hematologia e a bioquímica sérica são ferramentas que possibilitaram a compreensão e o aprofundamento dos conhecimentos sobre a natureza de inúmeras situações fisiopatológicas que afetam as aves. Diversas enfermidades avícolas provocam alterações nos parâmetros hematológico, dentre elas merecem citações a anemia infecciosa aviária, leucoses e as micotoxicoses (KOHAYAGANA et al., 2001 CARDOSO; TESSARI, 2003).

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 tanto no homem como também nas aves. Na maioria das espécies aviárias, o percentual de linfócitos é maior que qualquer outro elemento celular, correspondendo a 40-70% da contagem total, sendo os heterófilos o segundo grupo mais numeroso (NORIEGA, 2000).

Natt; 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.

O principal órgão alvo das aflatoxinas é o fígado, e nele ocorrem lesões caracterizadas por degeneração gordurosa e proliferação dos ductos biliares. Em frangos, a consequência destas lesões é uma mudança no perfil metabólico do fígado, como consequência surgem alterações na bioquímica clínica resultando numa diminuição do nível de proteínas plasmáticas, principalmente da albumina e das globulinas alfa e beta (SANTIN, 2000).

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

Alterações na concentração de proteínas totais é o parâmetro bioquímico sérico mais relacionado as aflatoxicoses o que permite monitorar o grau de exposição a essas micotoxinas. Isso pode ser explicado através do já conhecido mecanismo de ação das aflatoxinas: uma vez biotransformadas pelo citocromo P-450 no fígado elas serão capazes de interagirem com DNA e o RNA e também com proteínas intracelulares inibindo, dessa maneira, a transcrição e a síntese de proteínas. (LEESON et al., 1995; OGUZ et al., 2000, PEROZO et al., 2003).

Os aductos de aflatoxina-albumina são formados através da ligação da aflatoxina-dialdeído (um produto da hidrólise da aflatoxina-exo-8,9-epóxido) com a albumina e podem ser encontrados no sangue periférico de humanos (WILD, 1992; WILD; TURNER, 2002). Em estudos mais recentes Willians et al. (2004) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Enzimoimunoensaio (EIA) e Jianguo et al. (2005) empregando radioimunoensaio (RIA) demonstraram que os aductos de aflatoxina- albumina tinham no organismo uma meia vida de 30-60 dias e 60-90 dias respectivamente, podendo refletir a exposição por um período mais longo, sendo, atualmente, um dos biomarcadores mais utilizados em estudos epidemiológicos para a avaliação da exposição a AFB<sub>1</sub> (GROOPMAN; KENSLER, 1999; BANDO, 2007).

Bianchi et al. (2005), intoxicaram frangos de corte, machos da linhagem Ross, 21 a 42 dias de idade, com diferentes doses da toxina, aflatoxina B<sub>1</sub>, fumonisina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>1</sub> + fumonisina B<sub>1</sub> e os avaliaram por meio de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os frangos que receberam as concentrações de 50,0µg AFB<sub>1</sub>. Kg<sup>-1</sup> + 10 mg FB<sub>1</sub>.Kg<sup>-1</sup> e 2,450µg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> na ração apresentaram alterações hematológicas significativas como: diminuição de heterófilos e aumento de linfócitos, estes últimos tipos celulares também aumentaram na dose de 350 µg g de AFB<sub>1</sub>. Kg<sup>-1</sup>. Observaram também que houve diminuição da albumina sérica apenas no grupo de frangos intoxicados com 2,450µg AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> associada a 10 mg FB.kg<sup>-1</sup> na dieta.

As aflatoxinas também induzem supressão hematopoiética que afeta tanto os glóbulos vermelhos quanto os glóbulos brancos, gerando anemia e leucopenia. A gravidade dessa supressão depende de fatores como a concentração e tempo de exposição à toxina (TUNG et al., 1975; PEROZO et al., 2003).

Tessari et al., (2006) avaliaram os efeitos da AFB<sub>1</sub> e da FB<sub>1</sub> sobre o hemograma e o leucograma de frangos alimentados com ração contendo as toxinas isoladas 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 dias de vida. Os frangos 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 quando em associação. Observou-se um menor ( $P < 0,05$ ) número de leucócitos em todos os tratamentos, porém esta redução foi mais acentuada nos grupos tratados com  $200 \mu\text{g}$  de  $\text{AFB}_1 \cdot \text{kg}^{-1}$ , com ou sem  $\text{FB}_1$ . A presença de aflatoxinas na ração de frango de corte, mesmo em níveis permitidos pela legislação ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), acarretaram um quadro caracterizado por anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia e heteropenia.

Nas aflatoxicoses, as atividades das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) encontram-se elevadas, assim como as concentrações séricas de bilirrubinas. As micotoxinas hepatotóxicas promovem o extravazamento das enzimas hepatobiliares AST, ALT e gama glutamil transferase (GGT) para o sangue, além da elevação dos ácidos biliares, que é um marcador sensível da função hepática nesta espécie (CAMPBELL, 2004; LUMEIJ, 1997; SCHMIDT et al., 2007).

Borsa et al (1998), avaliaram a função hepática em frangos de corte machos da linhagem Ross, alimentados com ração adicionada de bentonita sódica 0,5 % e 5 ppm de aflatoxinas. Verificaram que nos grupos que receberam aflatoxina mais bentonita e aflatoxina separadamente houve aumento de GGT e a AST só apresentou aumento no grupo de aflatoxina. A enzima ALT não apresentou nenhuma variação durante todo o tratamento. Os resultados também demonstraram que o uso de bentonita sódica na ração com aflatoxinas não modificou o comportamento das enzimas AST, ALT e lactato desidrogenase (LDH).

Considera-se que a uréia tem pouco valor diagnóstico para frangos quando comparada ao ácido úrico (Campbell, 2004). Contudo, a uréia pode ser um teste sensível para azotemia pré-renal em algumas espécies de aves, porque é eliminada por filtração glomerular, que depende do estado de hidratação individual. Desta forma, é útil apenas para detectar uma diminuição da perfusão arterial renal (CAMPBELL, 2004; LUMEIJ, 1997, SCHMIDT et al., 2007). A creatinina tem pouco valor diagnóstico porque a creatina é excretada pelos rins antes de ser convertida em creatinina. Assim, o ideal seria dosar as concentrações plasmáticas de creatina para detectar uma diminuição na taxa de filtração glomerular (CAMPBELL, 2004; SCHMIDT et al., 2007).

### **3.1.7 Métodos de controle da aflatoxicose**

Na última década, dada sua importância, diversos pesquisadores têm intensificado o estudo de produtos e formas de inativação das aflatoxinas (RUSTOM, 1997; ABDEL-WAHAB; ALY, 2003; DENLI; OKAN, 2006).

O crescimento fúngico e formação de micotoxinas são dependentes de uma série de fatores, como umidade, temperatura, presença de oxigênio, tempo para o crescimento do fungo, constituição do substrato, lesões à integridade dos grãos causados por insetos ou dano mecânico/térmico, quantidade de inóculo fúngico, bem como a interação/competição entre as linhagens fúngicas (MALMANN et al., 2006; SALWA; ANWER, 2009, CRUZ, 2010).

Devido à comprovada natureza tóxica das micotoxinas, existe a necessidade de prevenir a contaminação dos alimentos por fungos toxigênicos. Muitos métodos alternativos de controle, buscando melhoria das práticas agrícolas e controle das condições de armazenamento estão sendo testados para que as concentrações de micotoxinas possam estar em níveis seguros (MALMANN et al., 2006).

A Organização das nações unidas para a Agricultura e alimentação (FAO) em 1996 instituiu uma série de critérios para determinar se o processo de descontaminação a ser empregado pode ser aceito, a saber: (i) destruir, inativar ou eliminar a toxina; (ii) não produzir resíduos tóxicos ou carcinogênicos nos produtos finais, ou em alimentos obtidos a partir de

animais que se alimentaram de uma dieta detoxificada; (iii) manter o valor nutritivo e a aceitabilidade do produto; (iv) não alterar as propriedades tecnológicas importantes de forma significativa e (v) destruir todos os esporos e micélios fúngicos para que não possam, em condições favoráveis, proliferar e produzir novas micotoxinas.

A intoxicação pela ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas pode ser combatida de diversas formas, como por exemplo, através da inativação física, adição de adsorventes à ração e utilização de antioxidantes. Entre as formas de inativação por fatores físicos podem ser utilizadas temperaturas elevadas, acima de 150°C, entretanto seu efeito é parcial (RUSTOM, 1997). A exposição à luz ultravioleta, também demonstrou redução de 45,7% de AFB<sub>1</sub> em figos contaminados experimentalmente por 250 µg.kg<sup>-1</sup> (ALTUG et al., 1990).

Segundo Ghanem et al. (2008), a degradação da AFB<sub>1</sub> correlacionou-se positivamente com o aumento da dose de raios gama. As porcentagens de degradação da AFB<sub>1</sub> foram mais altas na dose de 10 kGy, obtendo-se valores de inativação de 58,6% para amendoim, 68,8% para pistache descascada, 84,6% para pistache com casca, 81,1% para milho e 87,8% para arroz, 90% em rações com cevada, 86% para farelo de trigo, 84% para milho.

Existe também uma série de adsorventes utilizados para diminuir os efeitos tóxicos da AFB<sub>1</sub> (80ppb), como o aluminossilicato de cálcio-sódio hidratado, que segundo Denli; Okan (2006) inibiu o aumento da atividade das enzimas AST e ALT, do peso do fígado, além de mudanças histopatológicas, sugerindo que este adsorvente diminui o efeito negativo da AFB<sub>1</sub> em frangos de corte.

Segundo Ortatali; Oguz, (2001) e Ortatali et al. (2005) a adição simultânea de clinoptilolito em rações contaminadas por aflatoxinas promoveu melhoria moderada sobre as alterações histopatológica no fígado e nos órgãos linfóides. Além disso, os autores destacaram que houve melhora no efeito supressor da aflatoxinas sobre os títulos de anticorpos vacinais para o vírus da doença de Newcastle em frangos de corte.

Dentre as estratégias desenvolvidas pelo setor avícola vem sendo investigada a adição à ração de fitobióticos, ervas medicinais e seus extratos. Segundo Kohlert et al. (2000), os princípios ativos de fitobióticos adicionados à alimentação animal são absorvidos no intestino pelos enterócitos e rapidamente metabolizados pelo organismo, não deixando resíduos. Alguns fitobióticos podem atuar como promotores de crescimento e outros agem neutralizando o efeito tóxico de xenobióticos (BIAVATTI et al. 2003).

A utilização de ervas medicinais e extratos vegetais como antioxidantes também vem sendo estudada na tentativa de melhorar os efeitos causados pela aflatoxinas. Abdel-Wahhab; Aly (2003) avaliaram o efeito de diferentes extratos vegetais antioxidantes como, o alho, repolho e cebola, em ratos intoxicados por aflatoxinas. Os autores constataram que houve uma melhoria significativa em todos os parâmetros estudados, tais como o consumo de alimentos, e os níveis de colesterol e enzimas hepáticas e renais.

AMMAR et al. (2008) evidenciaram que o extrato de *Rhamnus alaternus* L., planta com atividade antioxidante, diminuiu significativamente a genotoxicidade induzida pela AFB<sub>1</sub>, in vitro. Da mesma forma, Yener et al. (2009) testaram os efeitos protetores do extrato de semente de *Urtica dióica* L. em ratos intoxicados por aflatoxinas, observando melhoras em relação às alterações histopatológicas do fígado e de enzimas hepáticas.

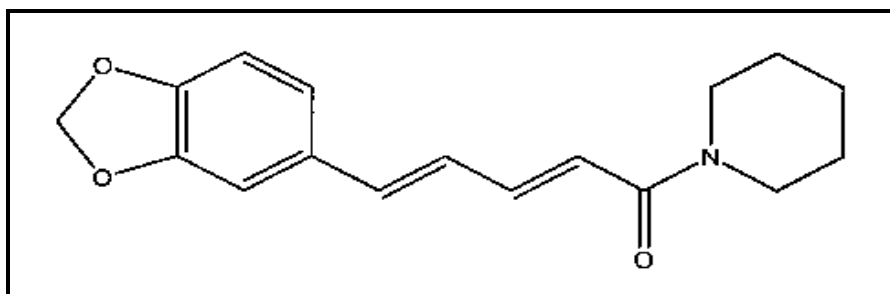
Gagini et al. (2010) estudaram a ação da piperina uma amida extraída das sementes da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), sobre os efeitos tóxicos das aflatoxinas em ratos. Os autores observaram que a dose oral de 1,12 mg de piperina. por Kg diminuiu as lesões hepáticas nos animais intoxicados, por gavagem, com 72 µg de aflatoxinas por 100g de peso, com diminuição significativa da enzima hepática ALT, além de ter evitado a leucopenia e a linfopenia características das aflatoxicoses.

O efeito da piperina e da pimenta-do-reino sobre a produção de aflatoxinas por fungos toxigênicos foi analisado por Madhyastha; Bhat (1984) e Mabrouk; El-Shayed (1980), respectivamente. Tanto a pimenta-do-reino quanto a piperina foram capazes de inibir a produção das aflatoxinas pelo *A. parasiticus* e *A. flavus*, respectivamente, com redução moderada do seu crescimento. O modo de ação da piperina sobre a produção de aflatoxinas pelo fungo ainda não é conhecido.

Os limites máximos de aflatoxinas para aves de produção são de 0, 2 e 5 ppb para frangos na fase inicial, crescimento e final, respectivamente (MALLMAN et al. 2006). A Portaria MA/SNAD/SFA n° 07 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1988) estipula que, para qualquer matéria prima, visando alimentação direta ou de componentes de rações destinadas ao consumo animal, o limite máximo da somatória de AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub> é de 50 µg.kg<sup>-1</sup>. Mas, devido à extensão do território brasileiro, ainda há dificuldade para implementar e fiscalizar as legislações e regulamentos existentes para o controle das aflatoxinas (MALLMAN et al. 2006, TESSARI; CARDOSO, 2008).

## 3.2 Piperina

A piperina (1-piperoyl piperidine) é uma amida (Figura 4) encontrada em várias espécies de pimenta, em especial na pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e na pimenta longa (*Piper longum* L.), é amplamente usada como tempero e como ingrediente de medicamentos usados em medicina alternativa (PEI, 1983; SINGH, 1992).



**Figura 3.** Estrutura molecular da piperina (BAJAD et al., 2002).

A piperina pode ser encontrada em todas as partes da planta, sendo extraída em maior quantidade a partir dos frutos secos cujo rendimento varia de 3 a 7% (IKAN, 1991). Trabalhos recentes mostraram que o consumo da piperina é relativamente seguro, apresentando toxicidade reduzida para células de mamíferos e aves (DOGRA et al, 2004; PATHAK; KHANDELWAL, 2006, 2007, 2008; CARDOSO et al., 2009).

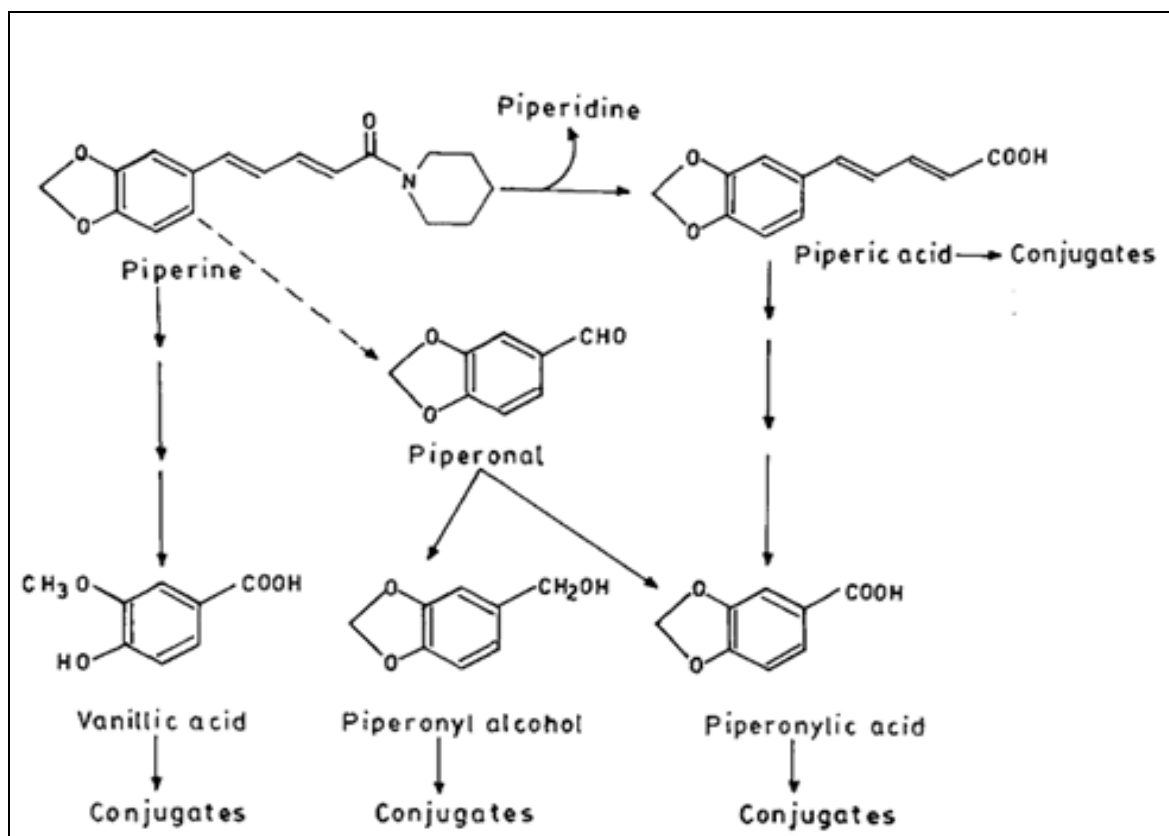
### 3.2.1 Biotransformação e excreção da piperina

Bhat e Chandrasekhara (1986) foram os primeiros pesquisadores que realizaram estudos sobre a absorção, metabolismo e excreção da piperina em ratos. A administração da piperina nas concentrações de 170 mg.Kg<sup>-1</sup> e 85 mg.Kg<sup>-1</sup> por gavagem ou pela via intraperitoneal, respectivamente, foi ampla e rapidamente absorvida (97%), independente da forma de administração. A eliminação da piperina, na sua forma natural, não foi detectada na urina; nas fezes e cerca de 3% da piperina administrada foi excretada por 5 dias, com as concentrações máximas de excreção ocorrendo no primeiro e terceiro dias após a administração. Ensaio in vitro, contendo segmentos do intestino delgado, demonstraram que 47-64% da piperina adicionada ao sistema não sofreu biotransformação durante o processo de absorção. Após 6 horas da administração oral, observou-se maior concentração de piperina no estômago e, em seguida, no intestino delgado. Apenas traços (0,15%) de piperina foram detectados no sangue, rim e baço entre 0,5-24 horas. Cerca de 0,1-0,25% de piperina foi detectada no fígado após as primeiras 6 horas.

Khajuria et al. (1998) sugeriram que a rápida absorção da piperina através da barreira intestinal poderia estar correlacionada a sua atuação como molécula apolar e formação de complexos com drogas e solutos, podendo ainda, modular o dinamismo da membrana devido à sua fácil partição, ajudando sua permeabilidade através das barreiras.

Estudo recente mostrou que ocorre pico de concentração da piperina no sangue, intestino, fígado e rim após 6 horas de administração oral de piperina em ratos, caindo drasticamente em 24 horas. Após 48 horas a quantidade de piperina nos tecidos (0,3%) reduziu significativamente, não sendo mais detectada após 96 horas no sangue, fígado e intestino. Os autores também não detectaram piperina na urina, apenas a encontraram nas fezes (3,64%), com pico no primeiro dia e, sem detecção no quinto dia (SURESH; SRINIVASAN, 2010).

Aparentemente, o rim é a principal via de excreção para os metabólitos em ratos. Em 1987, Bhat; Chandrasekhara examinaram os metabólitos urinários e biliares da piperina e verificaram que a piperina foi extensivamente biotransformada, e cinco produtos puderam ser identificados: ácido pipérico, ácido piperonílico, álcool piperonil, piperonal, ácido vanílico e seus conjugados (Figura 5). Na bile foi identificado apenas o ácido pipérico nas primeiras 6 horas. Os autores sugeriram que o metabolismo da piperina deve envolver uma amidase capaz de quebrar a piperina na ligação –CO-N-, seguida de oxidação da cadeia lateral e separação do grupo metilenodióxido.



**Figura 4.** Biotransformação da piperina em ratos (BHAT; CHANDRASEKHARA, 1987).

### 3.2.2 Atividades biológicas e farmacológicas

A piperina apresenta diversas atividades biológicas e farmacológicas como: inseticida, antiparasitária, antipirética, analgésica; contraceptivo; antiespermatogênico, antidepressiva, antitumoral e antimetastática, (MUJUNDAR et al., 1990; GHOSHAL et al., 1996; VIRINDER et al., 1997; MALINI et al., 1999; PRADEEP; KUTTAN, 2002; ESTRELA, et al., 2003). Também já foi demonstrado que ela possui atividade antioxidante, antiinflamatória, imunomoduladora e além de inibir os pró-carcinógenos metabolizados pelo citocromo P-450 descrita por diversos pesquisadores (MUJUNDAR et al., 1990; KOUL; KAPIL, 1993; KARAN et al., 1999; MITTAL; GUPTA, 2000; PRADEEP; KUTTAN, 2002; RIBEIRO et al., 2003; SELVENDIRAN et al., 2005a; SELVENDIRAN et al., 2005b; SRINIVASAN, 2007).



### 3.2.2.1 Efeito antioxidante

A piperina protege contra os danos oxidativos pela inibição ou destruição de radicais livres, por ser capaz de diminuir a peroxidação lipídica ao influenciar benéficamente certas moléculas e enzimas antioxidantes em diferentes situações de estresse oxidativo. O principal atributo da piperina é o seu efeito inibitório sobre o sistema de metabolismo de drogas no tecido hepático. Ela inibe fortemente o sistema microsomal (citocromo P-450) e, conseqüentemente, as reações de fase-I, mediadas pelo citocromo. Tal efeito também retarda as reações de glucoronidação da fase II (MITTAL; GUPTA, 2000).

A piperina tem se revelado como um eficiente agente antioxidante capaz de proteger contra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade humana (LDL) (NAIDU; THIPPESWAMY, 2002). Prasad et al. (2004) verificaram que o extrato aquoso de pimenta-do-reino e o de piperina exibem efeitos antioxidantes fisiológicos, inibindo de modo dose-dependente a 5-lipoxigenase humana, enzima chave no processo de biossíntese de leucotrienos.

O diabetes melitus, em ratos foi usado como modelo de dano oxidativo por Rauscher et al. (2000). O tratamento com piperina reverteu os efeitos da diabete no que se refere à concentração de glutathion no cérebro, da glutathion peroxidase e na atividade da glutathion superóxido no rim, na atividade da glutathion redutase cardíaca e na peroxidação lipídica. Todavia, a piperina não foi capaz de reverter os efeitos oxidativos da diabete no fígado. Desta forma, o tratamento com piperina (10 mg.Kg<sup>-1</sup> por dia, intraperitoneal) por 14 dias teve efeito parcial como agente antioxidante na diabete.

Khajuria et al. (1998) evidenciaram a capacidade de a piperina inibir ou reduzir as mudanças oxidativas induzidas por carcinógenos químicos (7,12-dimetil benzantraceno, dimetil aminometil azobenzeno e 3-metilcolantrene) no modelo intestinal de ratos. O papel protetor da piperina contra as alterações oxidativas promovidas pelos carcinógenos foi observado pela inibição da TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), aumento significativo do nível das glutathionas e restauração da GGT e na atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase.

Selvendiran; Sakthisekaran (2004) investigaram a ação da piperina sobre as alterações do sistema antioxidante mitocondrial e peroxidação lipídica na carcinogênese pulmonar induzida pelo benzo(α)pireno. A suplementação oral de piperina (50 mg.Kg<sup>-1</sup>) suprimiu significativamente a carcinogênese pulmonar, com decréscimo da peroxidação lipídica mitocondrial e concomitante aumento da atividade dos antioxidantes enzimáticos (superóxido desmutase, catalase e glutathion peroxidase) e não enzimáticos (glutathion reduzida, vitamina C e E).

Vijayakumar et al. (2004) examinaram o efeito da suplementação da pimenta-do-reino e da piperina sobre a peroxidação lipídica tecidual e a atividade antioxidante em ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura. Os resultados demonstraram que ambos foram capazes de reduzir o estresse oxidativo induzido pela dieta hipercalórica.

### 3.2.2.2 Efeito antiinflamatório

A atividade antiinflamatória da piperina foi evidenciada experimentalmente, em ratos, em casos de edema de extremidade induzida pela carragininina (MUJUMDAR et al., 1990). A piperina atua significativamente na fase aguda da resposta inflamatória e nas mudanças granulativas crônicas.

A piperina promove inibição da adesão de neutrófilos à monocamada endotelial pela diminuição da expressão de moléculas de adesão intracelular e vascular (ICAM-1 e VCAM-1) e E-selectina (KUMAR et al., 2007).

Kim; Lee (2009) avaliaram a atividade antiinflamatória e antiasmática da piperina em modelo murino. Nesse modelo, a piperina (2,25 e 4,5 mg.kg<sup>-1</sup>) administrada oralmente em camundongos sensibilizados com ovalbumina foi capaz de prevenir a infiltração de eosinófilos e a reação inflamatória no tecido pulmonar. Tal efeito antiinflamatório ocorreu devido à supressão da síntese de interleucina-4, interleucina-5, Imunoglobulina E e histamina, sugerindo que o mecanismo terapêutico seja baseado na ação supressora da piperina sobre as atividades de células T e sobre a produção de citocinas-Th2.

A atividade da piperina contra os efeitos inflamatórios e antiartrítico foram recentemente estudados por Yoo et al. (2009) que verificaram a ação da substância sobre fibroblastos-*like* sinoviócitos humano estimulados com interleucina-1 $\beta$  e no modelo de artrite em ratos. A piperina foi capaz de inibir a produção de interleucina-6 e matrix metalloproteinase 13, e reduziu a produção de prostaglandina E2 de forma dose-dependente. Nos ratos, a piperina reduziu as lesões e a área inflamatória da articulação fêmur tíbio patelar.

Sabina et al. (2010) estudaram o efeito antiinflamatório da piperina em caso clínico de doença metabólica caracterizada pela elevação sérica do ácido úrico e com surtos de artrite aguda, em camundongos, através de indução da inflamação por cristal de monourato de sódio. Os autores verificaram que a inoculação por via intraperitoneal de 30 mg de piperina por Kg reduziu o aumento dos níveis de enzimas lisosomais, a peroxidação lipídica, os níveis do fator de necrose tumoral  $\alpha$  e o aumento do volume da pata a valores próximos da normalidade.

Em 2010, Bae et al. e Kim et al. demonstraram, em camundongos, que o mecanismo de inibição da piperina na resposta inflamatória induzida pelo lipopolissacarídeo ocorre através da inibição da produção de interferon do tipo I.

### **3.2.2.3 Efeito imunomodulador**

A atividade imunomoduladora da piperina também vem sendo recentemente investigada, porém, com resultados contraditórios quanto à sua capacidade imunoestimulatória. Sunila; Kuttan (2004) descreveram que a piperina foi capaz de aumentar a resposta imune humoral para antígeno T-dependente em camundongos inoculados pela via intraperitoneal na concentração de 1,14 mg de piperina/dose/animal. Todavia, no mesmo ano, Dogra et al. (2004) demonstraram que, ao contrário, a piperina suprimiu a resposta imune, de forma dose-dependente, em camundongos gavados com 1,14, 2,25 e 4,5 mg.kg<sup>-1</sup>. A dose de 1,14 mg.kg<sup>-1</sup> foi considerada segura para uso, não demonstrando qualquer efeito tóxico para células e tecidos imunes.

Pathak e Khandelwal (2006, 2007, 2009) demonstraram, in vitro, que a piperina por si só não foi capaz de modular a blastogênese ou a função de células B e T, porém, constataram que ocorreria um eficiente efeito imunoprotetor, com atividade antioxidante, antiapoptótica e restauração da capacidade mitótica e funcional de tímócitos e esplenócitos de camundongos intoxicados por cádmio, e sugeriram o seu uso terapêutico em situações de imunossupressão.

### **3.2.2.4 Efeito antimetástático e antitumoral**

A capacidade de extratos de pimenta-do-reino inibir o desenvolvimento de tumores já havia sido demonstrada em 1987 por Loder et al. 1994. Posteriormente, a capacidade de extratos de pimenta-do-reino, administrados oralmente, reduzirem tumores em camundongos transplantados por via intraperitoneal com células ascíticas de Carcinoma de Ehrlich foi observada por Unnikrishnan; Kuttan, (1990). Sunila; Kuttan, (2004) verificaram que o extrato alcoólico dos frutos da *Piper longum* e de seu principal componente, a piperina, foram tóxicos para o linfoma ascítico de Dalton e para o carcinoma ascítico de Ehrlich. Tanto o extrato de pimenta-do-reino (10 mg/animal), quanto de piperina (1,14 mg/animal) inibiram o desenvolvimento de tumores sólidos induzidos com DLA em camundongos e aumentou a sobrevivência de camundongos com EAC para 37 e 59%, respectivamente.

Aparentemente, o efeito antitumoral da piperina guarda estreita correlação com seu efeito antioxidante. Pradeep; Kuttan (2002) demonstraram que houve inibição da metástase pulmonar induzida por células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6 pela piperina, *in vitro*. A administração simultânea de piperina e indução do tumor implicou na redução significativa (95%) da formação do nódulo tumoral. Os animais tratados com piperina sobreviveram durante todo o período de experimentação (90 dias). Os autores observaram que o nível sérico elevado de ácido siálico e da atividade da  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT) no soro dos animais não tratados foram reduzidos significativamente nos animais tratados com piperina. Selvendiran et al. (2004) evidenciaram o efeito citoprotetor da piperina no câncer de pulmão induzido experimentalmente por benzo( $\alpha$ )pireno em camundongos. A administração oral de piperina (100 mg.Kg<sup>-1</sup>) suprimiu, de forma efetiva, o câncer pulmonar iniciado pelo benzo( $\alpha$ )pireno através do decréscimo da extensa peroxidação lipídica, concomitantemente, com a elevação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, quando comparados com os animais com câncer pulmonar.

O efeito quimioprotetor da piperina contra o câncer de pulmão induzido por benzo( $\alpha$ )pireno tem sido bem documentado (SELVENDIRAM; SAKTHISEKARAN, 2004; SELVENDIRAM et al., 2004). O efeito benéfico da piperina ocorre durante o estágio inicial e pós-inicial da indução da carcinogênese pulmonar induzida pelo benzo( $\alpha$ )pireno, através da modulação da peroxidação lipídica e pela ligação com enzimas ATPase de membrana. Selvendiran et al. (2004) verificaram que a carcinogênese pulmonar induzida pelo benzo( $\alpha$ )pireno em camundongos podia ser inibida pela piperina não somente por sua proteção contra os danos protéicos, como também pela supressão da proliferação celular.

Bezerra et al. (2006) testaram duas amidas extraídas da pimenta-do-reino (piperina e pipartina) sobre células de sarcoma 180 inoculadas em camundongos. Após 24 horas da inoculação subcutânea das células os animais receberam por via intra-peritoneal, piperina ou pipartina (50-100 mg.Kg<sup>-1</sup>) por sete dias. Ambas as amidas inibiram o desenvolvimento do tumor sólido nos camundongos transplantados.

Recentemente, Manoharan et al. (2009) demonstraram a capacidade quimiopreventiva da piperina e da curcumina na carcinogênese da bolsa gular de hamster induzido por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno. Apesar de não determinado, os autores atribuíram o potencial quimioprotetor de ambos aos seus efeitos contra a peroxidação lipídica e antioxidativos, ou ainda modulando o efeito sobre o processo de detoxicação do carcinógeno.

### **3.2.2.5. Efeito sobre a biodisponibilidade de drogas, fitoquímicos e pró carcinógenos**

Como se sabe, o fígado é o órgão responsável pela desintoxicação e metabolismo de diversas drogas através da ação do citocromo P-450 onde a piperina é um potente inibidor não específico das isoenzimas do citocromo P-450, aumentando a biodisponibilidade de xenobióticos (ATAL et al., 1985; SINGH et al., 1986; REEN; SINGH, 1991; DALVI; DALVI, 1991; ALLAMEH et al., 1992; REEN et al., 1993; REEN et al., 1996).

Atal et al. (1985) observaram que o aumento da biodisponibilidade de algumas drogas e de alguns suplementos nutritivos estava relacionado à capacidade da piperina em inibir diferentes isoformas do citocromo P-450 e o mecanismo de glicuronidação no fígado e no intestino delgado envolvidos no metabolismo de xenobióticos. Também observaram que a piperina promovia a inibição da biotransformação de pró-carcinógenos e, portanto, a geração de seus intermediários reativos.

Por promover a inibição da biotransformação hepática e intestinal de certas drogas, a piperina é relatada em muitos artigos por aumentar a biodisponibilidade da curcumina (SHOBA et al., 1998), do propranolol e da teofilina (BANO et al., 1991).

A administração de 5,0 mg de piperina por 14 dias, em voluntários humanos, provocou significantes aumentos nos níveis de beta-caroteno no soro, e também o aumento da biodisponibilidade de vitamina B<sub>6</sub> e vitamina C (BADMAEV et al., 1999); a mesma dose produziu resultados similares envolvendo a coenzima Q<sub>10</sub> (BADMAEV et al., 2000).

Ribeiro et al. (2004) ressaltaram algumas vantagens relacionadas ao aumento da biodisponibilidade de fármacos e outros suplementos nutritivos, como sendo potencialmente vantajoso ao possibilitar o uso de rotas alternativas para a administração de medicamentos, e permitir o uso de doses menores dos fármacos co-administrados com a piperina.

Chen; Raymond (2006) demonstraram que o mecanismo de ação da piperina envolvia a inibição do citocromo P-450A4 e da glicoproteína P associada ao transporte de drogas, aumentando a biodisponibilidade de diversas drogas como a teofilina, rifampicina, propranolol entre outras.

O efeito quimiopreventivo da piperina contra pró-carcinógenos ativados pelo citocromo P-450 vem despertando nos últimos anos a atenção no meio científico (Selvendiran et al., 2004; Selvendiran; Sakthisekaran, 2004; Lee et al., 2006).

A piperina protege contra citotoxicidade, genotoxicidade e carcinogênese induzida por certos carcinógenos químicos e também pela aflatoxina B<sub>1</sub> (SELVENDIRAN et al., 2004; SELVENDIRAN et al., 2006). A aflatoxina B<sub>1</sub> é um pró-carcinógeno ativado pelo citocromo P-450, sendo biotransformada em produtos altamente tóxico, mutagêncio e carcinogênico. Singh et al. (1994), ao avaliarem o efeito da piperina sobre a citotoxicidade e genotoxicidade da AFB<sub>1</sub> em células de hepatoma de ratos, verificaram que a piperina foi capaz de diminuir a toxicidade da AFB<sub>1</sub> pela interferência na biotransformação da mesma pelo citocromo P-450.

ALLAMEH et al. (1992) observaram que a piperina poderia diminuir a toxicidade da aflatoxina B<sub>1</sub> ao ser capaz de aumentar a biodisponibilidade da AFB<sub>1</sub> em tecidos de ratos, e desta maneira reduzir a presença do carcinógeno derivado da biotransformação da AFB<sub>1</sub> no fígado. Alguns anos depois, Reen et al. (1997) demonstraram, in vitro, que a piperina, atuando no citocromo P-450 de hepatócitos de ratos, era capaz de interferir na metabolização da AFB<sub>1</sub>. Tal competição foi capaz de diminuir de forma dose-dependente a citotoxicidade e a genotoxicidade da aflatoxina, sugerindo que a piperina poderia ser utilizada como um agente quimiopreventivo contra os pró-carcinógenos que fossem ativados pelo citocromo P-450.

A capacidade quimiopreventiva da piperina nas aflatoxicoses foi estudada por Gagini et al. (2010), que analisaram o efeito da piperina (1,12 mg.Kg<sup>-1</sup>), administrada diariamente por via oral, em ratos LOU-M intoxicados experimentalmente por 23 dias. Os autores evidenciaram uma redução significativa e mesmo ausência de lesões hepáticas (infiltrado de células mononucleares, necrose individual de células, megalocitose, congestão e necrose incipiente de hepatócitos), e diminuição dos níveis dos biomarcadores de lesão hepática (ALT e AST) nos animais intoxicados que também receberam piperina diariamente. Além disso, a leucopenia/linfopenia promovidas pela intoxicação prolongada foi completamente prevenida pela administração oral de 1,12 mg.Kg<sup>-1</sup> de piperina.

A gavagem de frangos de corte por 14 dias consecutivos com 2,25 mg.kg<sup>-1</sup> de piperina foi bem tolerada, evidenciando-se, a prevenção de lesões hepáticas e das alterações de peso e também no hemograma de frangos intoxicados com dose subaguda (2 mg.Kg<sup>-1</sup>) de aflatoxinas (CARDOSO et al., 2007).

### 3.3 Biomarcadores

Os biomarcadores podem ser de susceptibilidade, de exposição ou de efeito. Os biomarcadores de susceptibilidade indicam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo em responder ao desafio da exposição a uma substância específica, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo a essa exposição (VAN DER OOST, et al. 2003). Os biomarcadores de exposição podem ser definidos como alguma substância, seus metabólitos, produtos de biotransformação ou produtos da interação entre o xenobiótico e uma molécula ou célula que é medida nos organismos ou nas subunidades destes (DEPLEDGE, et al. 1995). Biomarcadores de efeito representam alguma alteração química, fisiológica, comportamental ou outra que possa modificar o bem-estar de um organismo. Diversos componentes moleculares e celulares podem ser usados como biomarcadores de exposição e efeito, incluindo parâmetros bioquímicos, imunológicos e genéticos (VAN DER OOST, et al. 2003), sendo que dentre os marcadores genéticos podemos incluir a análise da frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares, quebras cromossômicas e quebras e alterações na fita de DNA.

Dentre os diversos biomarcadores, podemos examinar a biotransformação de enzimas (fase I e II), parâmetros de estresse oxidativo, produtos de biotransformação, metalotioneínas, proteínas MXR (proteínas de resistência multixenobiótica), parâmetros imunológicos, reprodutivos ou endócrinos, parâmetros genotóxicos, neuromusculares, fisiológicos, histológicos e morfológicos (VAN DER OOST et al. 2003).

Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003). O diagnóstico citopatológico é um método estável e útil para determinar a instabilidade genômica. Há duas décadas, o uso do teste de micronúcleos (MN) na investigação dos danos cromossômicos tem recebido considerável atenção (STICH et al., 1983).

A formação de micronúcleos tem sido amplamente empregada na epidemiologia molecular, como um biomarcador dos danos cromossômicos e da instabilidade do genoma (IAMARCOVAI et al., 2007). Os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos, resultantes de lesões/aductos no DNA ou cromossomos (efeito clastogênico) ou cromossomos inteiros que não se ligaram às fibras do fuso e não foram incluídos nos núcleos filhos principais durante a divisão nuclear, em consequência de lesões ao nível de proteínas envolvidas na segregação cromossômica, ou seja, por uma disfunção do aparato mitótico (efeito aneugênico) (FENECH et al., 1999; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003)

O ensaio de micronúcleo em ratos é amplamente usado devido a sua simplicidade e ampla base de dados, mas é aplicável primariamente em células do sistema hematopoiético. Porém, como alguns carcinógenos não têm como alvo o sistema hematopoiético e não induzem resposta positiva no teste do micronúcleo em ratos, ensaios *in vivo* devem ser aplicados usando um número maior de órgãos (MIYAMAE et al., 1998).

Heddle et al. (1991) destacaram que micronúcleos são respostas de curto prazo a uma substância genotóxica, de modo que a sua expressão depende da intensidade da exposição à poluição e provavelmente independe da duração de tal exposição.

A frequência de micronúcleos dentro de uma população de células é altamente dependente da cinética da proliferação celular. Essa cinética pode variar de acordo com a espécie animal, com o tecido estudado e com as alterações ambientais, entre outros fatores. (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O ensaio do cometa detecta danos ao DNA tais como as quebras de fitas simples e duplas, assim como os sítios álcali lábeis, locais de reparo incompleto e instabilidade genômica (NESSLANY et al., 2007). De utilização ampla para se testar agentes genotóxicos, a simplicidade e sensibilidade do Ensaio do Cometa fazem dele um sistema adequado de teste para biomonitoramento a níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises onde se podem avaliar células viáveis (BELPAEME et al., 1998). O Ensaio do Cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas (RIBEIRO et al., 2003).

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico no Ensaio do Cometa para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME et al., 1998). Também apresenta a vantagem de utilizar qualquer célula nucleada eucariótica, inclusive células vegetais (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Também não pode ser esquecido que o tipo de dano observado pelo ensaio é possivelmente reversível, o que já foi observado por vários autores em estudos de monitoramento ambiental, como por Nacci et al. (1992). Os resultados obtidos por esses autores demonstram que animais contaminados apresentam grande número de quebras no DNA ao serem coletados e menos quebras após um período de recuperação em condições não poluídas, em laboratório, refletindo a reversibilidade e não persistência de tal dano.

Em resposta a graves doenças sistêmicas, os heterófilos de frangos apresentam alterações tóxicas características, sendo estas alterações quantificadas de forma subjetiva, em relação à quantidade de células afetadas e à gravidade do quadro tóxico. Heterófilos tóxicos apresentam maior grau de basofilia citoplasmática, vacuolização e granulação anormal ou degranulação, formada por grânulos que parecem se unir dando origem a grandes grânulos arredondados e apresentam degeneração nuclear (THRALL, et al. 2007).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em dois ensaios: o primeiro objetivou estabelecer a concentração de piperina, adicionada à ração, capaz de promover alteração na sanidade e nos parâmetros de produção de frangos de corte.

No segundo ensaio foi avaliado o efeito quimioprotetor da piperina adicionada à ração, em frangos de corte intoxicados experimentalmente com aflatoxina B<sub>1</sub>.

Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas, sendo aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP/UFRRJ) sob o número de protocolo 015/2008.

### 4.1 Aves e Manejo

Foram utilizados 200 pintos de corte machos da linhagem comercial *Cobb Avian* no primeiro ensaio e posteriormente mais 200 pintos da mesma linhagem comercial no segundo ensaio. Os ensaios foram realizados na Fazenda Experimental, Setor de Avicultura e no Departamento de Nutrição Anima e Pastagens do Instituto de Zootecnia/UFRRJ. Os frangos foram inicialmente alojados e mantidos até os sete dias de idade em galpão convencional com círculo de proteção e campânula à gás, comedouros tipo bandeja e bebedouros tipo copo, com temperatura monitorada através de termômetro de máxima e mínima, recebendo ração balanceada e água à vontade.

### 4.2 Obtenção da Piperina

A piperina foi extraída e purificada, no Laboratório de Química do Instituto de Ciências Exatas/UFRRJ, a partir dos frutos secos de *Piper nigrum* L., empregando etanol como solvente, conforme descrito por Ikan (1991). A amida natural foi obtida com rendimento de 5-7% e com elevado grau de pureza (~98%, determinado por GC-MS), demonstrando ponto de fusão entre 128-129°C e dados espectrométricos (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR, IR e MS) idênticos ao reportado na literatura (ARAÚJO-JUNIOR et al., 1997; SIDDIQUI et al., 1997).

### 4.3 Rações Experimentais e Incorporação de Piperina à Ração de Frangos de corte

As concentrações de piperina empregadas foram escolhidas tendo como base o trabalho realizado por Cardoso et al. (2009). De forma a se obter a quantidade aproximada de piperina incorporada na ração correspondente à obtida por via oral (gavagem), nas doses de 1,12; 2,25 e 4,5 mg/Kg de peso vivo, a quantidade de ração consumida diariamente foi estimada segundo o manual de criação da *Cobb Avian* 48, considerando-se: a ração tipo farelada, a idade correspondente dos frangos, o consumo acumulado, o ganho de peso e o consumo diário.

Para a avaliação do experimento, no primeiro foram utilizados diferentes concentrações de piperina e, no segundo uma única concentração pré estabelecida a partir do primeiro juntamente com a administração de aflatoxina B<sub>1</sub> via gavagem. Em ambos os ensaios foi incluído o inerte, em uma quantidade fixa, não alterando a composição da ração em todas as fases.

A análise micotoxicológica da ração foi realizada previamente, segundo metodologia de Soares; Rodriguez-Amaya (1989), para que não ocorressem alterações nos parâmetros imunológicos e hematológicos influenciadas por micotoxinas já presentes nos componentes da ração (grãos).

Os ingredientes e nutrientes utilizados nas rações experimentais encontram-se na Tabela 3 e 4, tendo a composição dos ingredientes e as exigências nutricionais dos frangos sido obtidas de Rostagno (2005). As rações experimentais foram produzidas na fábrica de ração do Centro Integrado de produção da UFRRJ.

**TABELA 1.** Composição percentual e nutricional das rações de referência utilizadas na dieta pré-inicial (0-7 dias de idade) nos dois ensaios.

<b>Composição Alimentar</b>	
<b>Alimento</b>	
Milho	57,540
Farelo de soja	36,509
Oleo de milho	1,730
Fosfato bicalcico	1,895
Calcario	0,851
Sal	0,463
Cloreto de colina	0,045
DL-Metionina	0,352
L-Lisina	0,360
Suplemento Vitamínico	0,100
Suplemento Mineral	0,500
Coccidiostatico	0,040
Total	100kg
<b>Composição Nutricional Calculada</b>	
Ácido Linoléico	2,2506
Cálcio (%)	0,9310
Energia metabolizável (Mcal/Kg)	2,9631
Energia metabolizável aparente (%)	2,9250
Fósforo disponível (%)	0,4660
Fósforo (%)	0,7041
Lisina (%)	1,3229
Lisina digestível (%)	1,4350
Metionina +Cistina total (%)	1,0190
Metionina +Cistina digestível (%)	0,9435
Metionina digestíve (%) <sup>1</sup>	0,6558
Metionina total (%)	0,6833
Proteína bruta (%)	21,9880
Sódio (%)	0,2210
Treonina total (%)	0,8340
Triptofano total (%)	0,2776

<sup>1</sup>Composição/kg do produto: Vit. A, 7.500.000 UI; vit. D<sub>3</sub>, 2.500.000 UI; vit. E, 18.000 mg; vit. K<sub>3</sub>, 1.200 mg; vit. B<sub>1</sub> 1.500 mg; vit. B<sub>2</sub>, 5.500 mg; vit. B<sub>6</sub>, 2.000 mg; vit. B<sub>12</sub>, 12.500 mcg; biotina, 67 mg; ácido pantotênico, 10 g; ácido nicotínico, 35 g; <sup>2</sup>Composição/kg do produto: Mn, 120 g; Cu, 13 g; Fe, 60 g; Zn, 100 g; I, 2500 mg; Se, 500 mg



**TABELA 2.** Composição percentual e nutricional das rações de referência utilizadas em cada fase experimental no primeiro ensaio.

Ingredientes (%)	Fases		
	Inicial (8 a 21 dias)	Crescimento (22 a 35 dias)	Final (36-42 dias)
Milho	60,735	64,361	68,852
Farelo de soja	33,925	29,920	25,925
Óleo de soja	1,603	1,850	1,850
Fosfato bicálcico	1,763	1,884	1,457
Calcário	0,820	0,780	0,745
Sal comum	0,447	0,425	0,400
Cloreto de colina	0,040	0,040	0,040
DL-metionina	0,223	0,227	0,213
L-lisina HCL	0,177	0,227	0,265
L-treonina	0,037	0,052	0,063
Suplemento vitamínico <sup>1</sup>	0,100	0,052	0,050
Suplemento mineral <sup>2</sup>	0,050	0,100	0,100
Coccidiostático	0,050	0,052	-
Inerte (amido)	0,030	0,030	0,040
Total (Kg)	100	100	100
Composição Nutricional Calculada			
Ácido Linoléico (%)	2,2216	2,4167	2,4453
Cálcio (%)	0,8780	0,8100	0,7510
Energia metabolizável (Mcal/Kg)	2,9800	3,0500	3,1000
Fibra Bruta (%)	20,6500	19,1000	17,7400
Fósforo disponível (%)	0,4390	0,4050	0,3740
Fósforo (%)	0,6718	0,6275	0,5879
Lisina (%)	1,1222	1,0611	1,0059
Lisina digestível (%)	1,2270	1,1570	1,0940
Metionina +Cistina total (%)	0,8710	0,8330	0,7880
Metionina +Cistina digestível (%)	0,7997	0,7668	0,7263
Metionina digestível (%)	0,5200	0,5022	0,4745
Metionina total (%)	0,5453	0,5257	0,4964
Proteína bruta (%)	20,6500	19,1000	17,7400
Sódio (%)	0,2130	0,2010	0,1910
Treonina total (%)	0,8340	0,7870	0,7440
Triptofano total (%)	0,2630	0,2383	0,2167

<sup>1</sup>Composição/kg do produto: Vit. A, 7.500.000 UI; vit. D<sub>3</sub>, 2.500.000 UI; vit. E, 18.000 mg; vit. K<sub>3</sub>, 1.200 mg; vit. B<sub>1</sub> 1.500 mg; vit. B<sub>2</sub>, 5.500 mg; vit. B<sub>6</sub>, 2.000 mg; vit. B<sub>12</sub>, 12.500 mcg; biotina, 67 mg; ácido pantotênico, 10 g; ácido nicotínico, 35 g; <sup>2</sup>Composição/kg do produto: Mn, 120 g; Cu, 13 g; Fe, 60 g; Zn, 100 g; I, 2500 mg; Se, 500 mg

**TABELA 3.** Composição percentual e nutricional das rações de referência utilizadas em cada fase experimental no segundo ensaio.

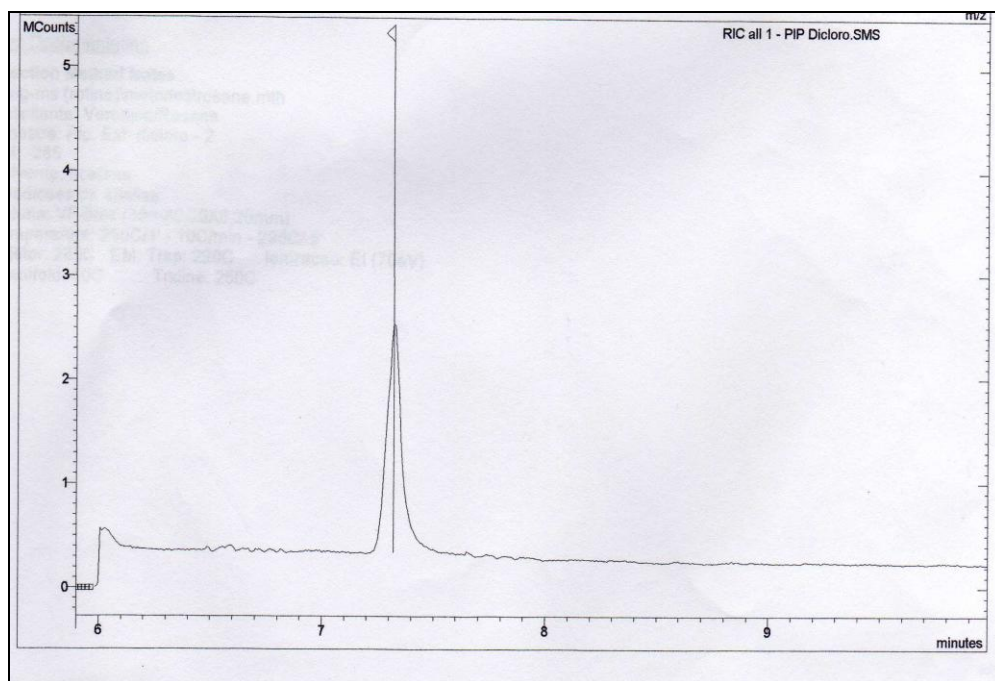
Ingredientes (%)	Fases	
	Inicial (9 a 21 dias)	Crescimento (22 a 35 dias)
Milho	62,455	59,903
Farelo de soja	30,626	34,034
Óleo de soja	3,117	2,105
Fosfato bicálcico	1,654	1,799
Calcário	0,872	0,918
Sal comum	0,469	0,492
Cloreto de colina	0,241	0,050
DL-metionina	0,236	0,252
L-lisina HCL	0,100	0,225
L-treonina	0,060	0,062
Suplemento vitamínico <sup>1</sup>	0,050	0,050
Suplemento mineral <sup>2</sup>	0,050	0,050
Coccidiostático	0,050	0,040
Inerte (amido de milho)	0,020	0,020
Total (Kg)	100	100
<b>Composição Nutricional Calculada</b>		
Ácido Linoléico (%)	3,0290	2,4583
Cálcio (%)	0,8240	0,8840
Energia metabolizável (Mcal/Kg)	3,1000	3,0000
Fibra Bruta (%)	2,7370	2,8763
Fósforo disponível (%)	0,4110	0,4420
Fósforo (%)	0,6181	0,6568
Lisina (%)	1,0945	1,1679
Lisina digestível (%)	1,1830	1,2630
Metionina +Cistina total (%)	0,8520	0,8970
Metionina +Cistina digestível (%)	0,7819	0,8221
Metionina digestível (%)	0,5134	0,5400
Metionina total (%)	0,5404	0,5689
Proteína bruta (%)	19,4100	20,7900
Sódio (%)	0,2050	0,2140
Treonina total (%)	0,8040	0,8590
Triptofano total (%)	0,2090	0,2265

<sup>1</sup>Composição/kg do produto: Vit. A, 7.500.000 UI; vit. D<sub>3</sub>, 2.500.000 UI; vit. E, 18.000 mg; vit. K<sub>3</sub>, 1.200 mg; vit. B<sub>1</sub> 1.500 mg; vit. B<sub>2</sub>, 5.500 mg; vit. B<sub>6</sub>, 2.000 mg; vit. B<sub>12</sub>, 12.500 mcg; biotina, 67 mg; ácido pantotênico, 10 g; ácido nicotínico, 35 g; <sup>2</sup>Composição/kg do produto: Mn, 120 g; Cu, 13 g; Fe, 60 g; Zn, 100 g; I, 2500 mg; Se, 500 mg.

#### 4.4 Determinação da Eficiência da Incorporação de Piperina na Ração

A partir de uma amostra teste com 30ppm de piperina, adicionada pelo mesmo método utilizado nos dois ensaios foram recolhidas três alíquotas da mesma partida de ração, para determinar a eficiência da incorporação. As amostras de 25g de ração foram adicionados 125 mL de hexano, seguido de agitação por 1 minuto e filtração à vácuo, preservando a fração sólida. Nesta fração foram adicionados 125 mL de diclorometano e nova agitação por 2 horas, em agitador magnético. Após filtração os extratos foram evaporados até resíduo. O extrato obtido foi analisado por cromatografia gasosa-espectrometria de massa, (GC-MS) no sistema utilizando detector de MS por trapeamento de íons (íon trap detector) Saturn 2000 (Varian, EUA), do Departamento de Química, ICE/UFRRJ. As condições cromatográficas utilizadas foram: (i) temperatura do injetor de 280°C; (ii) coluna capilar - VF-50ms (30m x 0,25mm); (iii) forno da coluna – temperatura inicial de 250°C/1' com incremento de 10°C por minuto até 290°C/5'; (iv) volume injetado 1µL; (v) solvente acetona; (vi) ionização: EI (70eV); (vii) manifold: 60°C; (viii) Trap line: 250 °C.

Os resultados mostraram recuperação média de 81,2% da piperina associada à ração. A Figura 6 mostra o perfil cromatográfico obtido.



**Figura 5.** Cromatograma da avaliação da piperina incorporada na ração de frangos de corte por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

#### 4.5 Obtenção e Preparo das Soluções de Aflatoxina B<sub>1</sub>

A aflatoxina B<sub>1</sub> foi obtida a partir do cultivo de cepas de *A. parasiticus* (CMDB 0336, origem: NRRL 2999), cultivadas em Agar YES (Anexo 1) por 11 dias a 25 °C. Após este período as culturas foram submetidas a processo de extração com clorofórmio P.A. (50 mL/placa), filtradas em filtro de papel *Whatman* n° 1 e o extrato obtido foi concentrado até resíduo em evaporador rotativo. Os extratos secos foram, posteriormente, diluídos em 1,0 mL de clorofórmio e analisados por cromatografia de camada delgada (CCD), em cromatofolhas de sílica gel 20 X 20 cm (Merck) e espessura de 0,3 mm, ativadas por 1 hora a 120°C. Os

extratos foram separados com a fase móvel composta por tolueno:clorofórmio:acetato de etila: ácido fórmico 90% (70:50:50:20, v/v/v/v).

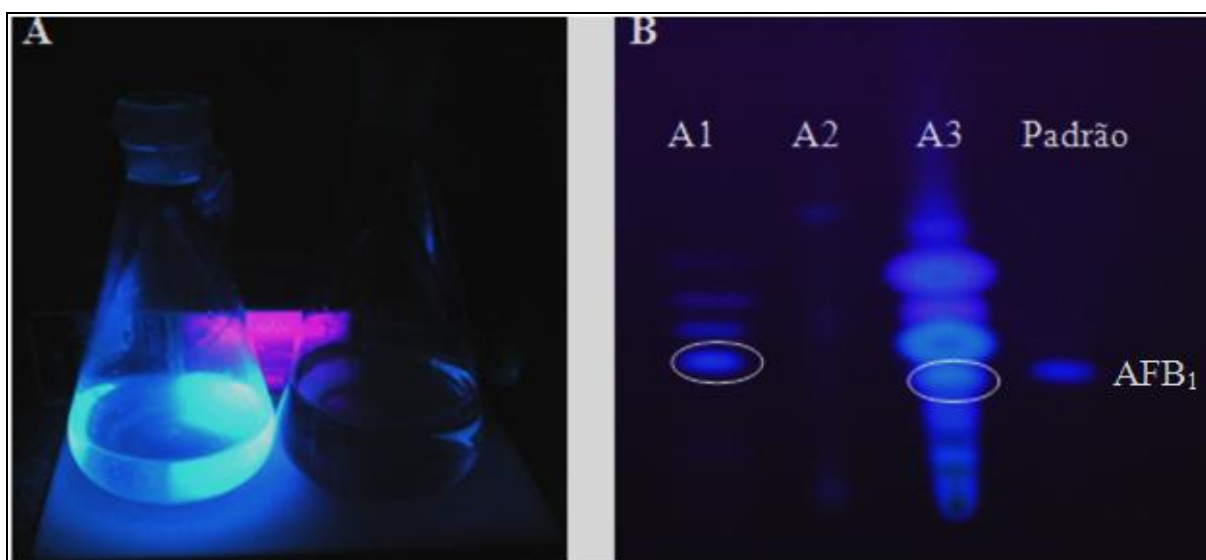
A AFB<sub>1</sub> purificada foi obtida por CCD preparativa, utilizando sílica gel (Silica Gel 60 G, Merck), em cromatoplaças de vidro 20x20cm. A fase móvel utilizada foi composta pela mistura de clorofórmio e acetona (90:10, v/v), para uma melhor resolução com relação aos interferentes presentes nos extratos.

A quantificação da AFB<sub>1</sub>, por padrão externo, foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo líquido equipado com bomba Waters (modelo 510), injetor Rheodyne (Rheodyne®) com *loop* de 20 µL, detectores de fluorescência Agilent série 1100 e de UV-VIS Merk-Hitachi L-4250 e Chromato-integrador D-2500, colunas de Silica 5µ (4,6mmx150) Varian e, Microsorb MV C18, 4µ, (4,6mm x 250) Varian, do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

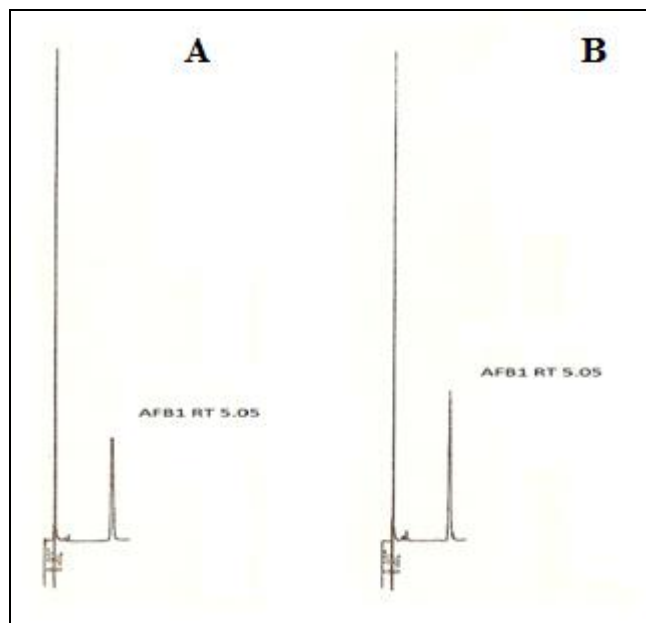
A detecção da fluorescência foi obtida com excitação de 330 nm, emissão de 460 nm e comparada com UV a 350 nm. As fases móveis utilizadas foram compostas pela mistura de acetato de etila: n-hexano (3: 2.5, v/v), a 2,0 mL/min, para detecção por fluorescência e, com a mistura de metanol:água (1:1, v/v), a 0,7 mL/min, para a detecção por UV.

Os extratos quantificados e secos foram mantidos em freezer até o momento da administração nos frangos. As soluções de AFB<sub>1</sub> administradas aos animais foram obtidas pela dissolução dos extratos secos com volume conhecido de óleo de soja (veículo), homogeneizados por ultrassom por 30 minutos na temperatura de 60 °C. Destas soluções foram retiradas alíquotas na concentração estabelecida para a administração nos frangos diariamente por meio de gavagem a partir de 10 dias de idade.

A solução padrão de AFB<sub>1</sub> (Sigma) foi preparada segundo a metodologia descrita no Manual de Métodos Oficiais da Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2000).



**Figura 6.** Exposição à luz ultravioleta de amostras obtidas do cultivo do *A. parasiticus*. (A) extrato de aflatoxinas antes da purificação (fluorescente) sob exposição à luz ultravioleta. O frasco sem fluorescência é o controle negativo (água); (B) cromatografia de camada delgada; Amostras: algumas amostras (A1, A2 e A3) dos extratos obtidos. Padrão de AFB<sub>1</sub> – Sigma - AOAC (2000).



**Figura 7.** Cromatogramas de alguns dos extratos purificados de AFB<sub>1</sub>, obtidos a 350 nm, eluídos em metanol: H<sub>2</sub>O (50:50 v/v) a 0,7 mL/min em coluna microsorb MVD8 C18  $\mu$ c (15x4,4mm) dos cultivos. Amostras: algumas amostras (A e B) dos extratos obtidos. Padrão de AFB<sub>1</sub> – Sigma - AOAC (2000).

#### 4.6 Material Biológico para Análise

Amostras de sangue foram coletadas, por meio de venopunção da veia ulnar, no início dos experimentos e no momento do abate, com o anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) para a realização das análises hematológicas e genotóxicas e sem o anticoagulante para as avaliações bioquímicas.

Para verificação de alterações macroscópicas nos órgãos foi realizada necrópsia, com pesagens dos órgãos e observação da cor e/ou presença de lesões no parênquima e nas mucosas dos órgãos estudados. Foram coletados, fígado, coração, moela, proventrículo e rim para avaliação histopatológica e, segmentos do intestino delgado para análises histopatológica e histomorfométrica.

No segundo ensaio, amostras de sangue com anticoagulante foram coletadas no em intervalos de 24, 48, 72, 96 horas e por 26 dias de intoxicação experimental com AFB<sub>1</sub> para a realização dos testes de genotoxicidade e citotoxicidade, de micronúcleo e cometa.

#### 4.7 Delineamento Experimental

Do total de 400 pintos de corte machos alojados no primeiro e segundo ensaios, foram separados 96 e 60 frangos, respectivamente, de forma a uniformizar os pesos corporais e diminuir possíveis variações individuais entre tratamentos.

Ao final de cada ensaio, os frangos foram abatidos segundo normas estabelecidas pela instrução normativa nº 3, de 17/01/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2000).

#### 4.7.1 Primeiro ensaio

Noventa e seis pintos com de sete dias de idade foram pesados individualmente, e alojadas em 16 boxes, com 4 tratamentos, 6 pintos por repetição e 5 aves por tratamento segundo a tabela 4. Os frangos foram submetidos aos tratamentos dos 7 aos 42 dias de idade sendo abatidos aos 43 dias de idade .

**Tabela 4.** Distribuição dos grupos por tratamento no primeiro ensaio.

<b>Grupos</b> (n=24/grupo)	<b>Tratamentos</b>
	<b>Piperina (ppm)</b>
<b>1</b>	0
<b>2</b>	60
<b>3</b>	120
<b>4</b>	180

#### 4.7.2 Segundo ensaio

Após o estabelecimento da concentração adequada de piperina no primeiro ensaio, iniciou-se ao segundo ensaio no qual, 60 pintos de corte aos nove dias de idade foram transferidos para duas baterias metálicas com três andares cada, dois compartimentos de 0,90 x 0,85 x 0,40m por andar, totalizando 12 compartimentos, contendo individualmente um bebedouro infantil do tipo copo (2,5 L) e comedouro tipo bandeja. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos, 3 repetições por tratamento e 5 aves por repetição conforme apresentado na tabela 5. No dia seguinte os comedouros e bebedouros infantis foram substituídos por comedouro e bebedouros tipo calha, que ficavam na parte externa das unidades experimentais, cujo comprimento equivalia às dimensões do compartimento que tinham em média 10 cm de largura.

Os frangos receberam ração com piperina (60 ppm) desde o dia anterior (9 dias de idade) ao início da intoxicação com AFB<sub>1</sub> (0,5 mg.kg<sup>-1</sup> por dia) que foi feita por 26 dias, sendo pesados diariamente e, a quantidade de AFB<sub>1</sub> a ser administrada recalculada e ajustada quando necessário.

O período de experimentação durou 26 dias, sendo os frangos abatidos, aos 36 dias de idade.

**Tabela 5.** Distribuição dos grupos por tratamento no segundo ensaio.

<b>Grupos</b> (n=15/grupo)	<b>Tratamentos</b>	
	<b>Piperina (ppm)</b>	<b>AFB<sub>1</sub> (mg/kg)</b>
<b>Controle<sup>1</sup></b>	0	0
<b>Piperina</b>	60	0
<b>AFB<sub>1</sub></b>	0	0,5
<b>P+A</b>	60	0,5

<sup>1</sup>Grupo controle: frangos que receberam apenas o veículo (óleo de soja) utilizado na gavagem dos animais com AFB<sub>1</sub>.

## 4.8 Metodologia

### 4.8.1 Análises hematológicas e avaliação de alterações bioquímicas (hepáticas e renais)

As amostras de sangue utilizadas para as análises hematológicas e bioquímicas nos dois ensaios foram coletadas de todos os frangos no momento do abate. Das amostras de sangue com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) foram realizadas as seguintes provas hematológicas: concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT), determinada por refratometria (COLES, 1984); a concentração de albumina realizadas com “kit” comercial (Bioclin SA), utilizando espectrofotômetro automático Bio-2000 (Bioplus), com calibração automática e leitura de alta performance, realizado por método colorimétrico, de acordo com a metodologia indicada pelo fabricante. A concentração de globulinas foi realizada através do cálculo [concentração de PPT – concentração de albumina = concentração de globulinas].

A concentração de hemoglobina foi dosada através do método de oxihemoglobina e centrifugação da amostra a 1.000 xg 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 hematócrito foi efetuada através do método do microhematócrito, segundo metodologia descrita por Jain (1993); contagens de hemácias e leucócitos totais realizadas em hemocítmetro, utilizando-se a solução de Natt e Herrick (NATT; HERRICK, 1951) (Anexo 2). O sangue foi diluído 1/100 e 1/200 para a contagem de leucócitos e hemácias, respectivamente. Foram contados os leucócitos do quadrante 1 mm<sup>3</sup> central (25 subdivisões do retículo melhorado do hemocítmetro) e, os eritrócitos foram contados neste mesmo quadrante em 1/5 de mm<sup>3</sup> (cinco subdivisões do retículo melhorado central do hemocítmetro). Os respectivos fatores de correção para as contagens totais de leucócitos e de eritrócitos foram os números de células contadas multiplicadas por 1.000 e 10.000, respectivamente, considerando-se a área e a altura da câmara e a diluição.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos corados com giemsa para determinação dos valores relativos e posteriormente dos valores absolutos de linfócitos, heterófilos, monócitos eosinófilos e basófilos.

Por meio de fórmulas padronizadas, foram calculados o volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) (WINTROBE, 1933).

O sangue coletado sem anticoagulante, após 2 horas a temperatura ambiente, foi centrifugado a 400 xg, por 5 minutos para obtenção do soro e armazenados à temperatura de -20 °C. No primeiro e segundo foram feitas as análises referentes à função hepática e renal como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP), creatinina, uréia e ácido úrico, empregando-se “kit” comercial (Bioclin SA), e espectrofotômetro automático Bio-2000 (Bioplus), com calibração automática e leitura de alta performance. Os testes foram realizados por método cinético, de acordo com a metodologia indicada pelo fabricante.

### 4.8.2 Histopatologia dos órgãos e histomorfometria dos segmentos do intestino delgado

A coleta dos órgãos foi efetuada nos dois experimentos, sendo que os órgãos de seis animais de cada tratamento foram fixados em solução fixadora de Bouin por 6 horas. Posteriormente, banhos sucessivos de álcool 70% foram aplicados sobre as amostras para a retirada do fixador, em seguida, desidratadas em uma série de concentrações crescente de etanol. Após a desidratação do material, as amostras foram recortadas em fragmentos menores, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

Os procedimentos histotécnicos foram realizados com o apoio do Laboratório de Histologia, Instituto de Biologia/UFRRJ. As análises histopatológicas foram realizadas em seções de 5µm, coradas por hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) e examinadas em

microscopia óptica com o microscópio Olympus® (CH30) em aumentos de 200 e 400 x, acoplada a uma câmera digital Nikon® (Colpix 4300).

Para as análises histomorfométricas, quatro amostras de cada segmento do intestino delgado foram coletadas: 5,0 cm do duodeno, jejuno e íleo foram removidos dos seguintes locais: ápice do duodeno, 10 cm distal do ponto de entrada do ducto biliar e 10 cm próximo da junção cecal, respectivamente. Os segmentos do intestino delgado foram lavados e limpos com solução salina tamponada e então fixados em solução de Bouin.

As amostras foram processadas em secções de 5 mm, coradas com hematoxilina e eosina conforme as técnicas descritas por Luna (1968) e, examinadas a microscopia óptica em microscópio da marca Olympus® (CH30) no aumento de 100x e acoplada a uma câmera digital Nikon® (Colpix 4300). Os índices morfométricos foram determinados pelo programa de análises de imagens de domínio público Image J (Image J, National Institute Mental of Health).

A altura das vilosidades foi mensurada usando a lâmina própria como base. A altura de cripta é definida como a profundidade da invaginação entre vilosidades adjacentes. A largura foi mensurada em 50% do comprimento da vilosidade e a superfície de absorção foi obtida através da fórmula [S.A. = comprimento da microvilosidade x largura da vilosidade (50%)]. Os valores expressos referem-se à média  $\pm$  SD de 10 microvilos adjacentes (OLIVEIRA et al., 2008).

#### **4.8.3 Avaliação de genotoxicidade**

A avaliação de genotoxicidade foi realizada no segundo ensaio, sendo que quatro frangos por tratamento, foram identificados e utilizados nos ensaios de genotoxicidade. De cada frango foi coletado uma amostra de sangue a intervalos de 24, 48, 72, 96 horas, a partir do primeiro dia de intoxicação e também no 26º dia.

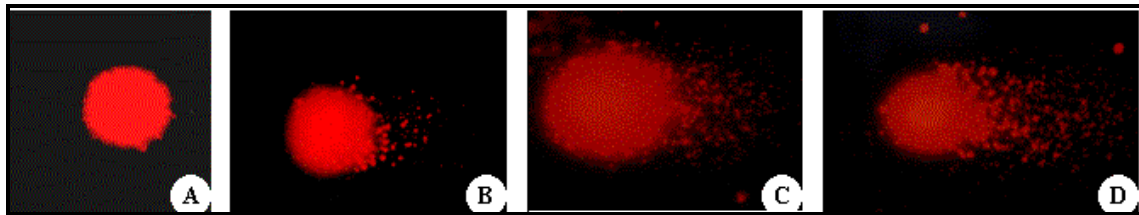
##### **4.8.3.1 Ensaio de eletroforese em gel de célula única (Ensaio do Cometa)**

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com algumas modificações. Foram utilizadas lâminas previamente cobertas por um filme de agarose (1,5% p/v em solução salina tamponada). O sangue utilizado como amostra foi coletado por punção da veia ulnar (1,0 mL) usando EDTA como anticoagulante. Foram homogeneizadas amostras de 10  $\mu$ L de sangue em 160  $\mu$ l de agarose de baixo ponto de fusão. Após uma homogeneização lenta, a mistura foi cuidadosamente dispensada sobre duas lâminas previamente preparadas com agarose a 1,5% de ponto de fusão normal. As lâminas foram cobertas com lamínula (60 x 25 mm) e colocadas na geladeira por 10 a 20 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submersas por 24 horas em uma cuba contendo uma solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100), pH 10. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma solução tampão de eletroforese (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos a 4 °C. A eletroforese foi desenvolvida a 25 V e 300 mA, por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris 0,4 M, por 5 minutos, fixadas em etanol absoluto por 2 minutos e armazenadas no escuro à temperatura ambiente.

No momento da análise as lâminas foram coradas com brometo de etídeo (20  $\mu$ L/mL) e examinadas com objetiva de 40 x em microscópio de epifluorescência usando um filtro de excitação de 516 – 560 nm e um filtro de emissão de 590 nm. Foram analisadas 100 células por animal, calculando-se a média de 50 células por lâmina (duas lâminas).

As células foram analisadas de acordo com a integridade do núcleo e o comprimento da cauda formada, conforme descrito por Tice et al. (2000). Desse modo, os nucleóides analisados foram classificados, segundo o grau de lesão conforme Souza; Fontanetti (2007) [Figura 8].





SOUZA; FONTANETTI (2007)

**Figura 8.** Critério visual para classificação dos nucleóides no Ensaio do cometa: A. classe I (DNA intacto); B. Classe II (DNA com baixo nível de dano); C. Classe III (com médio nível de dano). D. Classe IV (com alto nível de dano). Aumento de 1000x.

#### 4.8.3.2 Teste do micronúcleo e frequência de eritrócitos policromáticos

Dois esfregaços do sangue periférico de cada animal foram fixados em metanol P.A. (100%) por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com o corante com Giemsa 5%. Após secagem, as lâminas foram codificadas e armazenadas em caixas, em temperatura ambiente, até o momento da leitura. A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico em aumento de 1000x, tendo sido contados 1000 células por lâmina (duas lâminas/animal) (CAMPANA et al., 1999; GRISOLIA, 2002). A análise das lâminas foi realizada em teste cego, sendo determinado o número de eritrócitos policromáticos (PCEs), eritrócitos normocromáticos (NCEs), eritrócitos policromáticos com micronúcleo (MNPCEs) e eritrócitos normocromáticos com micronúcleo (MNNCEs). Os MNs foram identificados seguindo o critério proposto por FENECH et al. (2003).

#### 4.8.3.3 Avaliação de heterófilos tóxicos no sangue periférico

A partir dos esfregaços feitos para as análises hematológicas (fixados com metanol e corados com Giemsa 5%) foram analisadas 100 heterófilos em duas lâminas (50 células) por amostra de sangue periférico.

As células foram analisadas de acordo com o grau de basofilia citoplasmática, vacuolização, granulação anormal (degranulação grânulos que aparecem intensamente basofílicos e grânulos que parecem se unir formando grandes grânulos arredondados) e degeneração nuclear. Desse modo, os heterófilos analisados foram classificados, segundo o grau de lesão conforme Thrall, et al. (2007): grau 1- quando heterófilos apresentam aumento da basofilia; grau 2- quando os heterófilos apresentam citoplasma mais intensamente basofílico e degranulação parcial; grau 3- quando heterófilos têm citoplasma intensamente basofílico, degranulação moderada, grânulos anormais e vacuolização citoplasmática; grau 4 – os heterófilos apresentam basofilia citoplasmática intensa degranulação acentuada a moderada com grânulos anormais, vacuolização citoplasmática e cariorrexe ou cariólise. A contagem de heterófilos tóxicos é classificada como baixa (5 a 10%); moderada (11 a 30%) e alta (> 30%).

#### 4.8.4 Parâmetros zootécnicos

A viabilidade observada nos grupos experimentais foi determinada em percentual, levando-se em consideração o número de frangos vivos em relação ao número de pintos alojados durante o período experimental.

Ao término dos experimentos foram avaliados: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar de acordo com as seguintes definições: (i) Ganho de peso - obtido através da diferença entre o peso inicial e o final; (ii) Peso vivo - peso dos frangos vivos no período pré-abate; (iii) Consumo de ração - avaliando-se a ração fornecida, os desperdícios e as sobras de ração encontradas nos comedouros durante todo período experimental; (iv) Conversão alimentar – obtida através dos valores médios do consumo de ração e o ganho de peso das aves.

Ao final dos experimentos os frangos foram pesados individualmente após jejum de sólidos de 10 horas e abatidos. Após obter o peso em jejum, cada frango foi atordoado, sangrado, escaldado a 54 °C por 2 minutos, depenado em máquina e eviscerado manualmente, retirando-se a cabeça, o pescoço e os pés e separando-se o fígado, o coração, o proventrículo e a moela para posterior análise de seus pesos relativos.

Em seguida, os frangos passaram pelo processo de pré-resfriamento. Após o pré-resfriamento, os frangos foram pendurados por 5 minutos para escorrer o excesso de água (5 minutos), pesados novamente para avaliação do peso da carcaça quente e, em seguida, embalados em sacos plásticos previamente identificados. Após 1 hora de resfriamento em água com gelo, os frangos foram transferidos para uma câmara fria a 5 °C por um período de 24 horas, de onde foram retirados para pesagem individual, determinação do peso da carcaça resfriada, realização dos cortes e pesagem para avaliar o rendimento de carcaça e das partes (peito, coxa, dorso e asa). Os cortes foram embalados individualmente em sacos plásticos, identificados e congelados a uma temperatura média de menos 5° C.

O rendimento de carcaça (%) foi obtido pela relação entre o peso da carcaça (sem pés, cabeça e pescoço) e o peso vivo. O rendimento de cortes (%) foi obtido entre o peso desses cortes e o da carcaça resfriada.

As fórmulas aplicadas na obtenção dos pesos relativos dos órgãos e rendimentos de carcaça e cortes encontram-se abaixo:

$$\text{-Rendimento de carcaça} = (\text{Peso da carcaça após abate} / \text{Peso vivo pré-abate}) \times 100$$

$$\text{-Rendimento de cortes} = (\text{Peso dos cortes} / \text{Peso da carcaça resfriada}) \times 100$$

$$\text{-Peso relativo dos órgãos} = (\text{Peso do órgão} / \text{Peso carcaça resfriada}) \times 100$$

#### **4.9 Análise estatística**

Para respostas contínuas e normais, se homocedástica (peso, leucograma, contagem diferencial, hematimetria, microhematócrito, hemoglobímetria, proteína plasmática, e dosagem enzimática), o delineamento foi o inteiramente casualizado, com 12 repetições. A significância da média dos diferentes parâmetros entre os grupos experimentais foi avaliada por análise de variância (ANOVA), empregando os testes de *Student Newman-Keuls* e *Kruskal Wallis* para comparação dos grupos, nas análises paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Para o teste de micronúcleo, foi calculada a média e o desvio padrão de cada grupo e os resultados analisados pelo teste de *Student-Newman-Keuls*. Para a análise estatística do teste de cometa, foram atribuídos valores numéricos (Ranques) de 0 a 3 para cada uma das classes, respectivamente. Após a obtenção das frequências das classes de dano para cada indivíduo, foram calculada a soma dos ranques, para posterior comparação dos resultados entre os tempos de exposição e o T<sub>0</sub>. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do programa *GraphPad Prism 3.0* para *MS Windows* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*). Nível de significância ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Primeiro ensaio

#### 5.1.1 Análise da bioquímica sérica hepática e renal

As concentrações de 120 e 180 ppm de piperina na ração promoveram aumento significativo da enzima hepática AST; entretanto, essa alteração não foi acompanhada pelas outras enzimas ALT e GGT apresentando níveis dentro dos limites de referência para frangos de corte. O perfil bioquímico renal analisado não sofreu alteração significativa em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 6).

**Tabela 6.** Perfil bioquímico de frangos de corte com diferentes concentrações de piperina.

Bioquímica	Piperina				CV% <sup>1</sup>
	0 ppm	60 ppm	120 ppm	180 ppm	
AST (UI/L)	200,40 <sup>a</sup> ± 91,07	227,60 <sup>a</sup> ± 70,37	286,80 <sup>b</sup> ± 81,85	265,80 <sup>b</sup> ± 83,93	34,12
ALT (UI/L)	38,17 <sup>a</sup> ± 13,98	49,42 <sup>a</sup> ± 14,54	45,83 <sup>a</sup> ± 13,58	40,33 <sup>a</sup> ± 11,52	31,06
GGT (UI/L)	12,83 <sup>a</sup> ± 4,89	15,00 <sup>a</sup> ± 3,07	13,75 <sup>a</sup> ± 3,33	13,58 <sup>a</sup> ± 3,63	27,40
Uréia (mg/dL)	5,27 <sup>a</sup> ± 1,42	5,00 <sup>a</sup> ± 1,53	4,90 <sup>a</sup> ± 2,18	4,27 <sup>a</sup> ± 1,67	35,38
Creatinina (mg/dL)	0,50 <sup>a</sup> ± 0,10	0,45 <sup>a</sup> ± 0,09	0,47 <sup>a</sup> ± 0,09	0,49 <sup>a</sup> ± 0,10	20,84

<sup>1</sup> Coeficiente de variação. Os dados tabulados estão expressos pela média do tratamento ± desvio padrão de 15 animais. As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls. <sup>a, b</sup> Nas linhas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

#### 5.1.2 Análise hematológica

Quanto aos parâmetros hematológicos (Tabela 7), observou-se uma diminuição significativa de hemoglobina e, conseqüentemente, no CHGM no grupo que recebeu a ração com 120 ppm em relação aos outros grupos teste. As diferentes doses de piperina não foram capazes de alterar de forma significativa os outros parâmetros, estando estes dentro dos índices de normalidade descritos para frangos de corte. Todavia, a piperina foi capaz de diminuir significativamente o número total de leucócitos no grupo que recebeu 180 ppm; neste mesmo grupo observou-se uma diminuição significativa de heterófilos em relação ao grupo controle. Em relação aos monócitos, observou-se uma diminuição significativa nos grupos que receberam piperina na ração, com características dose-dependente, sem alteração na leucometria total nos grupos de 60 e 120 ppm.

**Tabela 7.** Efeito da ingestão das diferentes concentrações de piperina incorporada à ração de frangos de corte por 35 dias sobre os parâmetros hematológicos.

Parâmetros	Piperina				CV% <sup>1</sup>
	0 ppm	60 ppm	120 ppm	180 ppm	
Hemácias (x10 <sup>6</sup> / µL)	2,68 <sup>a</sup> ± 0,36	2,81 <sup>a</sup> ± 0,31	3,04 <sup>a</sup> ± 0,38	2,83 <sup>a</sup> ± 0,38	12,59
Hematócrito (%)	30,17 <sup>a</sup> ± 2,85	30,17 <sup>a</sup> ± 3,01	30,50 <sup>a</sup> ± 2,32	30,33 <sup>a</sup> ± 2,64	7,90
Proteína Plasmática (g/dL)	3,42 <sup>a</sup> ± 0,25	3,48 <sup>a</sup> ± 0,30	3,53 <sup>a</sup> ± 0,27	3,48 <sup>a</sup> ± 0,28	8,00
Hemoglobina (g/dl)	9,10 <sup>ab</sup> ± 0,65	9,73 <sup>ab</sup> ± 0,90	8,78 <sup>b</sup> ± 0,71	9,18 <sup>ab</sup> ± 0,61	7,79
CHGM (g/dL)	30,33 <sup>a</sup> ± 2,70	32,47 <sup>a</sup> ± 3,96	28,90 <sup>b</sup> ± 2,85	30,41 <sup>a</sup> ± 2,34	9,67
VGM (fL)	114,40 <sup>a</sup> ± 17,80	108,40 <sup>a</sup> ± 14,56	101,50 <sup>a</sup> ± 11,09	108,00 <sup>a</sup> ± 10,20	12,36
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> / µL)	31,08 <sup>a</sup> ± 5,57	29,75 <sup>a</sup> ± 4,77	28,17 <sup>a</sup> ± 5,28	25,92 <sup>b</sup> ± 3,37	16,43
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> / µL)	16,77 <sup>a</sup> ± 2,20	18,89 <sup>a</sup> ± 3,50	17,33 <sup>a</sup> ± 3,49	17,13 <sup>a</sup> ± 2,89	17,17
Heterófilos (x10 <sup>3</sup> / µL)	10,60 <sup>a</sup> ± 3,40	9,12 <sup>ab</sup> ± 1,57	9,02 <sup>ab</sup> ± 2,58	7,27 <sup>b</sup> ± 1,81	25,72
Monócitos (x10 <sup>3</sup> / µL)	2,53 <sup>a</sup> ± 1,13	1,77 <sup>b</sup> ± 0,75	1,69 <sup>b</sup> ± 0,60	1,45 <sup>b</sup> ± 0,31	30,69
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> / µL)	0,42 <sup>a</sup> ± 0,13	0,24 <sup>a</sup> ± 0,07	0,40 <sup>a</sup> ± 0,10	0,27 <sup>a</sup> ± 0,04	26,05

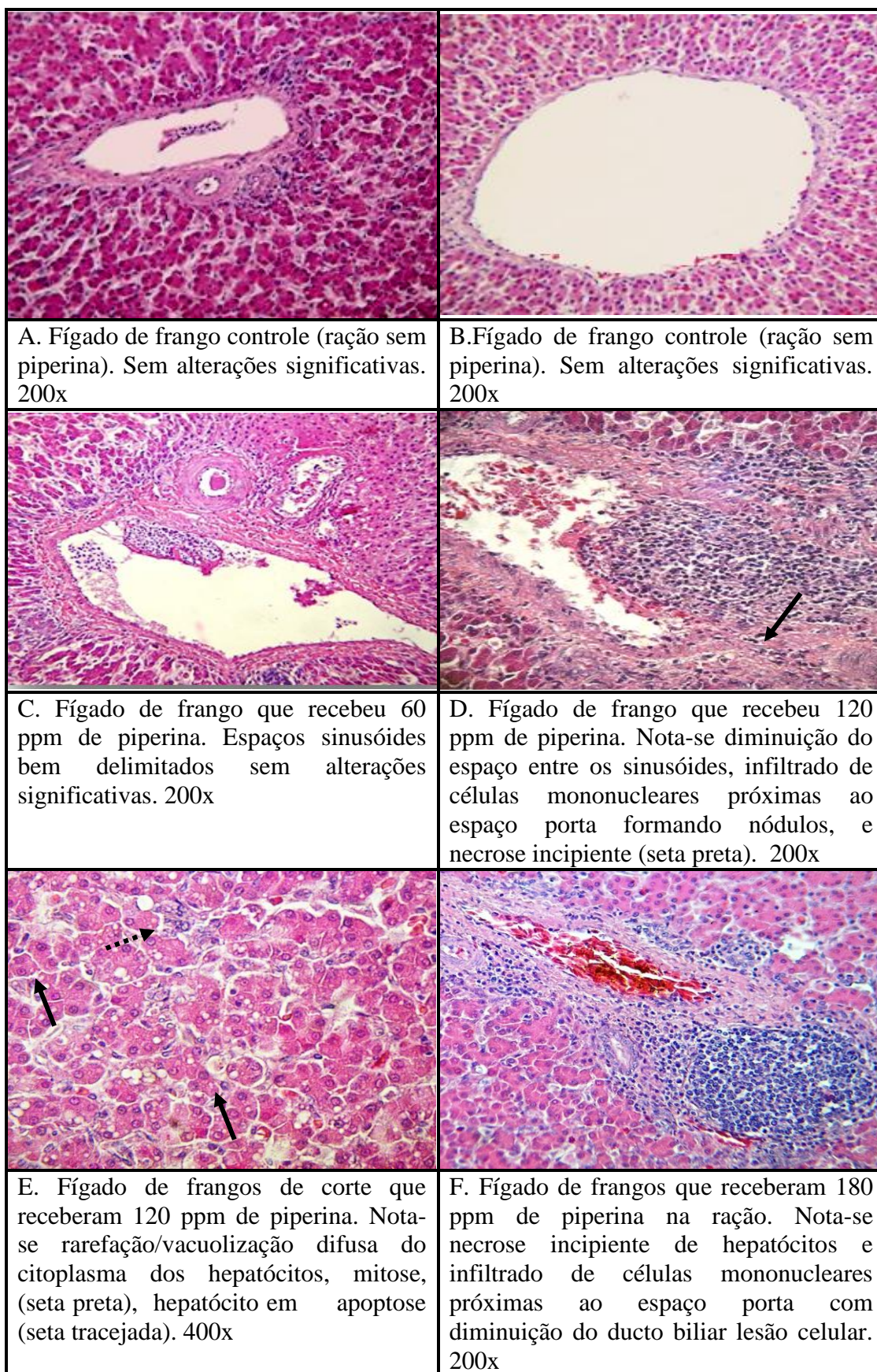
<sup>1</sup> Coeficiente de variação. Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais. As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls e teste de Kruskal-Wallis (monócitos e eosinófilos). <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística, com p < 0,05.

### 5.1.3 Análise macroscópica e histopatológica

De acordo com as análises macroscópicas, as diferentes concentrações de piperina não promoveram alterações no tamanho, na cor ou lesões no parênquima e nas mucosas dos órgãos avaliados que foram o rim e o proventrículos.

Na análise histopatológica do fígado observou-se raros infiltrados inflamatórios dispostos de forma randômica, com predominância de células mononucleadas do grupo controle e o grupo que recebeu 60 ppm de piperina, sugerindo ter relação extrínseca, por ser um órgão com intensa característica de biotransformação de diversas substâncias, comum para a espécie estudada, sendo estas alterações consideradas não significativas. Com o aumento da dose de piperina, os grupos apresentaram aumento de infiltrados de células mononucleadas formando nódulos com predominância de linfócitos, e raros heterófilos, próximos ao espaço porta com características dose-dependente, no fígado. O grupo de 180 ppm ainda foi caracterizado pelo intenso infiltrado de células mononucleares periportais na Zona 1. Os espaços entre os sinusóides dos grupos controle e 60 ppm se mostraram bem delimitados; nos grupos 120 e 180 ppm pode-se observar uma diminuição do espaço entre os sinusóides, com lesão de hepatócitos (apoptose e necrose) e figuras de mitose; no grupo 120 ppm observou-se ainda, intensa vacuolização difusa de hepatócitos sugerindo esteatose (Figura 9).





**Figura 9.** Alterações do tecido hepático causadas por diferentes concentrações de piperina adicionada à ração de frangos de corte - cortes histológicos do fígado.

### 5.1.4 Análise histomorfométrica do intestino delgado

As medidas histomorfométricas dos segmentos intestinais estão demonstradas na tabela 8. As alterações na histomorfologia (comprimento e largura das vilosidades) dos segmentos intestinais pela piperina ocasionaram modificação na superfície de absorção. A ração com 60 ppm de piperina promoveu aumento da superfície de absorção do duodeno e no íleo, neste último segmento também foi observado elevação com a concentração de 120 ppm. Concentrações maiores de piperina levaram à diminuição significativa da superfície de absorção no jejuno.

A profundidade de cripta sofreu uma diminuição significativa no duodeno, em todas as concentrações de piperina analisadas e no jejuno para as concentrações de 120 e 180 ppm. No íleo, todas as concentrações de piperina promoveram aumento significativo da profundidade de cripta.

**Tabela 8.** Histomorfometria de intestino delgado de frangos de corte, submetidos a quatro diferentes tratamentos com piperina por 35 dias: comprimento das vilosidades (CV), largura das vilosidades (LV), Profundidade média das criptas (PV) e superfície de absorção (SA).

Segmentos Intestino Delgado	Piperina (ppm)	CV ( $\mu\text{m}$ )	LV ( $\mu\text{m}$ )	PC ( $\mu\text{m}$ )	SA <sup>2</sup> ( $\text{mm}^2$ )
Duodeno	0	1344 <sup>a</sup> ± 151.70	190.00 <sup>a</sup> ± 45.70	416.90 <sup>a</sup> ± 86.89	0.248 <sup>a</sup> ± 0.060
	60	1323 <sup>a</sup> ± 189.30	229.20 <sup>b</sup> ± 52.56	332.40 <sup>b</sup> ± 94.94	0.316 <sup>b</sup> ± 0.086
	120	1350 <sup>a</sup> ± 288.20	198.6 <sup>a</sup> ± 70.05	317.10 <sup>c</sup> ± 64.52	0.288 <sup>a</sup> ± 0.102
	180	1304 <sup>a</sup> ± 194.20	203.70 <sup>a</sup> ± 62.71	356.40 <sup>b</sup> ± 96.03	0.285 <sup>a</sup> ± 0.111
	CV% <sup>1</sup>	15,46	28,26	19,03	24,96
Jejuno	0	1738 <sup>a</sup> ± 230.80	160.20 <sup>a</sup> ± 44.55	234.00 <sup>a</sup> ± 47.54	0.243 <sup>a</sup> ± 0.037
	60	1024 <sup>b</sup> ± 140.80	179.10 <sup>a</sup> ± 39.68	218.4 <sup>ab</sup> ± 21.93	0.208 <sup>a</sup> ± 0.336
	120	1092 <sup>b</sup> ± 138.40	161.30 <sup>a</sup> ± 43.30	168.60 <sup>b</sup> ± 34.71	0.169 <sup>b</sup> ± 0,036
	180	1012 <sup>b</sup> ± 138.40	145.7 <sup>a</sup> ± 41.04	196.20 <sup>b</sup> ± 29.09	0.147 <sup>b</sup> ± 0,028
	CV%	15,68	26,04	19,07	20,02
Íleo	0	523.10 <sup>a</sup> ± 120.50	129.50 <sup>a</sup> ± 37.13	127.70 <sup>a</sup> ± 36.18	0.062 <sup>a</sup> ± 0.020
	60	752.90 <sup>b</sup> ± 114.0	144.10 <sup>b</sup> ± 42.23	181.30 <sup>b</sup> ± 40.04	0.117 <sup>b</sup> ± 0,030
	120	909.00 <sup>c</sup> ± 155.30	168.30 <sup>b</sup> ± 49.97	246.10 <sup>c</sup> ± 60.83	0.155 <sup>b</sup> ± 0.060
	180	755.10 <sup>b</sup> ± 73.84	111.10 <sup>a</sup> ± 32.97	175.50 <sup>b</sup> ± 55.8	0.078 <sup>a</sup> ± 0.021
	CV%	16,26	28,92	26,27	29,03

<sup>1</sup> Coeficiente de variação. <sup>2</sup> SA ( $\text{mm}^2$ ) = comprimento (mm) x largura (50% do comprimento) da vilosidade (mm). Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 5 vilosidades x 4 dos respectivos segmentos intestinais de frangos distintos. As médias comparadas pelo teste Newman-Keuls. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> Nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

### 5.1.5 Avaliação dos parâmetros zootécnicos

As diferentes concentrações de piperina na ração não provocaram aumento da mortalidade ou modificação significativa no peso vivo final dos frangos, no peso médio absoluto e relativo do fígado e no rendimento de carcaça (Tabela 9).

Em relação ao desempenho (Tabela 10), observou-se uma melhor conversão alimentar e um maior ganho médio de peso no período correspondente a 36 - 42 dias de idade relacionado ao grupo de frangos que receberam a ração com 60 ppm de piperina.

**Tabela 9.** Avaliação dos parâmetros zootécnicos dos frangos de corte tratados com as diferentes concentrações de piperina adicionadas à ração por 35 dias.

Piperina (ppm)	Peso vivo (g)	Peso absoluto (g)	Peso relativo do fígado (g) <sup>1</sup>	Rendimento de carcaça (%) <sup>2</sup>
0	2833 <sup>a</sup> ± 202,9	46,88 <sup>a</sup> ± 5,39	1,648 <sup>a</sup> ± 0,13	71,88 <sup>a</sup> ± 3,96
60	2821 <sup>a</sup> ± 189,2	46,06 <sup>a</sup> ± 5,58	1,618 <sup>a</sup> ± 0,16	72,11 <sup>a</sup> ± 2,31
120	2797 <sup>a</sup> ± 191,40	46,17 <sup>a</sup> ± 4,45	1,638 <sup>a</sup> ± 0,11	73,42 <sup>a</sup> ± 3,17
180	2772 <sup>a</sup> ± 266,20	46,89 <sup>a</sup> ± 5,60	1,693 <sup>a</sup> ± 0,16	72,47 <sup>a</sup> ± 2,29
CV <sup>3</sup> (%)	7,58	11,30	8,5	4,1

<sup>1</sup> Peso relativo do fígado: (Peso médio do fígado / peso médio vivo) × 100. <sup>2</sup> Rendimento médio de carcaça: peso médio da carcaça quente / peso médio vivo após jejum x 100).

<sup>3</sup> Coeficiente de variação. Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 24 animais por grupo. As médias comparadas pelo teste Student- Newman-Keuls.

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

**Tabela 10.** Efeito da piperina sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) nos diferentes períodos de produção.

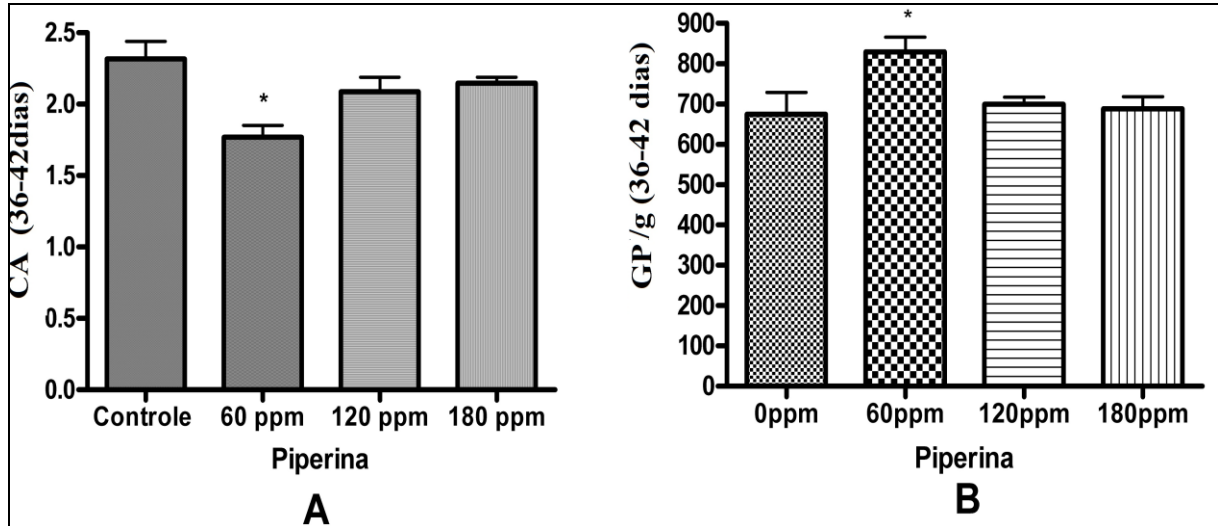
Parâmetros	Piperina				CV% <sup>3</sup>
	0 ppm	60 ppm	120 ppm	180 ppm	
8-21 dias					
CR(g)	1020 <sup>a</sup> ±30,92	1036 <sup>a</sup> ±8,70	976,00 <sup>a</sup> ±40,44	970,40 <sup>a</sup> ±22,67	1,84
GP (g)	700,10 <sup>a</sup> ±39,53	668,50 <sup>a</sup> ±35,30	662,50 <sup>a</sup> ±23,50	655,20 <sup>a</sup> ±14,41	4,17
CA	1,50 <sup>a</sup> ± 0,10	1,59 <sup>a</sup> ± 0,10	1,49 <sup>a</sup> ± 0,05	1,51 <sup>a</sup> ± 0,08	3,54
22-35 dias					
CR (g)	2138 <sup>a</sup> ±219,70	2029 <sup>a</sup> ±139,10	2103 <sup>a</sup> ±203,50	2027 <sup>a</sup> ±1690	8,77
GP (g)	1213 <sup>a</sup> ±39,46	1166 <sup>a</sup> ±64,37	1174 <sup>a</sup> ±73,55	1187 <sup>a</sup> ±71,86	5,27
CA	1,76 <sup>a</sup> ± 0,16	1,74 <sup>a</sup> ±0,10	1,80 <sup>a</sup> ± 0,26	1,71 <sup>a</sup> ± 0,08	8,31
36-42 dias					
CR (g)	1543 <sup>a</sup> ±99,82	1458 <sup>a</sup> ±102,80	1456 <sup>a</sup> ±113,50	1476 <sup>a</sup> ±105,00	7,11
GP (g)	674,60 <sup>a</sup> ± 107,70	829,30 <sup>b</sup> ± 73,32	699,20 <sup>a</sup> ± 34,24	688,30 <sup>a</sup> ±59,04	9,57
CA	2,32 <sup>a</sup> ±0,25	1,77 <sup>b</sup> ±0,165	2,09 <sup>a</sup> ±0,204	2,15 <sup>a</sup> ± 0,08	8,40
CR (g)	4701 <sup>a</sup> ±275,30	4525 <sup>a</sup> ±196,00	4535 <sup>a</sup> ±76,58	4473 <sup>a</sup> ±239,10	4,31
GP (g)	2587 <sup>a</sup> ± 136,30	2663 <sup>a</sup> ±105,10	2536 <sup>a</sup> ±93,44	2531 <sup>a</sup> ±127,30	4,48
CA	1,82 <sup>a</sup> ±0,05	1,70 <sup>a</sup> ± 0,08	1,79 <sup>a</sup> ± 0,09	1,77 <sup>a</sup> ± 0,06	3,85

Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 24 animais.

<sup>3</sup> Coeficiente de variação. As médias comparadas pelo teste Newman-Keuls. <sup>a, b</sup> Nas fileiras: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).



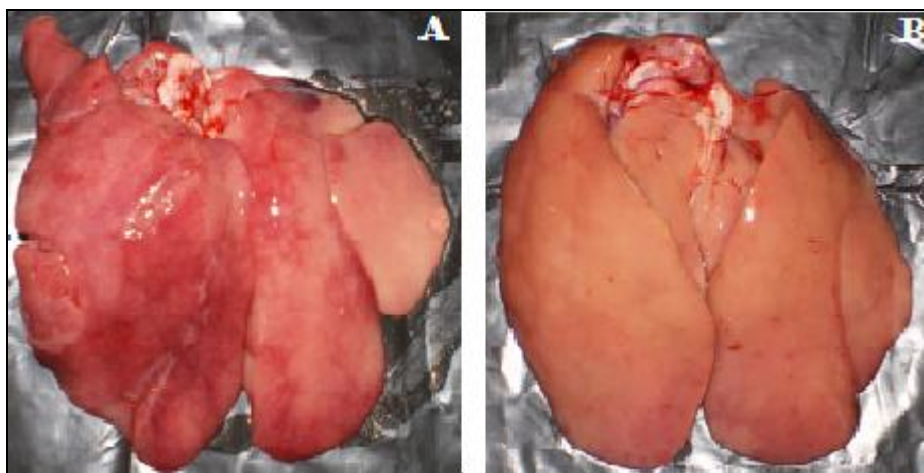
O efeito a piperina nessa fase (36 a 42 dias de idade) pode ser melhor evidenciado na Figura 10.



**Figura 10.** Efeito da piperina sobre a conversão alimentar CA (A) e ganho de peso GP (B) avaliados no período de 36-42 dias de idade de frangos de corte alimentados com diferentes concentrações de piperina na ração. As médias foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls; \*  $p < 0,05$ .

## 5.2 Segundo ensaio

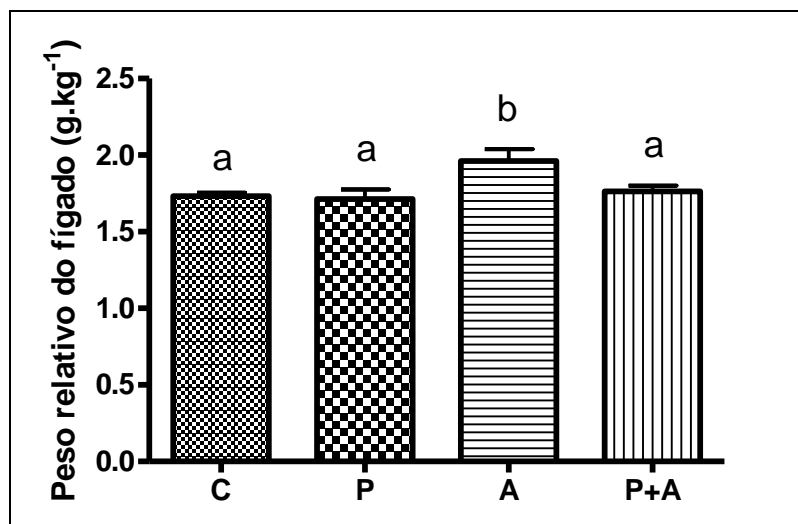
Durante o período de realização deste ensaio, 26 dias, a taxa de mortalidade verificada foi de 3,3% (2/60). Os óbitos observados ocorreram em um frango com 17 e outro com 29 dias de idade, pertencentes aos grupos piperina + AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub>, respectivamente. Após necropsia, verificou-se que os fígados apresentaram um aspecto pálido, friável e com bordas arredondadas. Entretanto o fígado do animal intoxicado apenas com AFB<sub>1</sub> apresentou aspecto pálido e amarelado mais intenso, sugestivo de degeneração gordurosa. (Figura 12).



**Figura 11.** Fígado de frangos que morreram durante o experimento. (A) Fígado de frango do grupo piperina + AFB<sub>1</sub>, óbito aos 17 dias de idade; (B) Fígado de frangos do grupo AFB<sub>1</sub>, óbito aos 29 dias de idade.

### 5.2.1 Análise macroscópica do fígado

Os fígados dos animais dos grupos piperina e piperina associada a AFB<sub>1</sub> apresentaram aspectos semelhantes aos do grupo controle; todavia, os fígados do grupo intoxicado AFB<sub>1</sub> apresentaram-se com aspecto pálido e friável, além de aumento no tamanho e padrão lobular pronunciado, sugestivo de hiperplasia nodular do parênquima hepático. As pesagens deste órgão revelaram aumento significativo do seu peso bruto e do seu peso relativo (peso fígado / peso carcaça resfriada), em relação a todos os grupos experimentais (Figura 12).

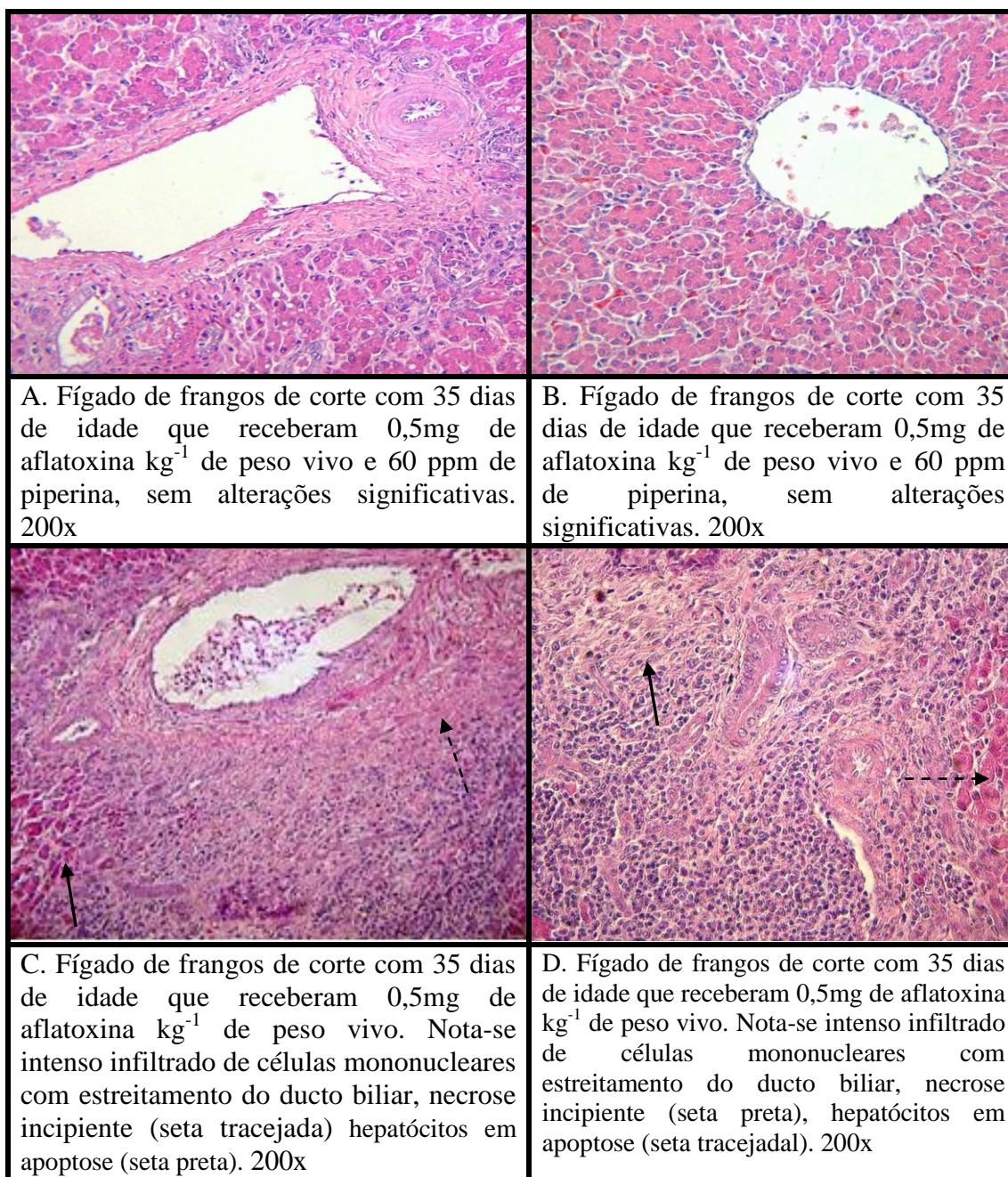


**Figura 12.** Peso relativo dos fígados ( $\text{g.kg}^{-1}$  de peso vivo) de frangos com 36 dias de idade que receberam piperina adicionada à ração e intoxicados por aflatoxina  $\text{B}_1$ . Grupos: controle (C); 60 ppm de piperina (P); 0,5 mg de  $\text{AFB}_1.\text{kg}^{-1}$  de peso vivo (A) e 60 ppm de piperina associada a 0,5mg de  $\text{AFB}_1.\text{kg}^{-1}$  de peso vivo (P+A). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls; <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística, com  $p < 0,05$ .

### 5.2.2 Análise histopatológica do fígado e rim e histomorfometria do intestino delgado

Através da análise histopatológica foram evidenciadas lesões no fígado e intestino delgado com características de intoxicação por  $\text{AFB}_1$ , todavia, lesões no tecido renal nos grupos experimentais não foram evidenciadas nas análises histopatológicas.

No tecido hepático evidenciou-se: fibrose, necrose, apoptose, mitose de hepatócitos, infiltrado mononuclear misto (com presença de linfócitos e em menor número heterófilos) periportais, presença de macrófagos ativados (células de Kupffer) de forma multifocal e intensa vacuolização difusa de hepatócitos, sugestivo de esteatose, sendo considerado severo no grupo que recebeu apenas  $\text{AFB}_1$  e de moderado a leve no grupo que recebeu piperina associada a  $\text{AFB}_1$  (Figura 13). No grupo controle e no grupo que recebeu 60 ppm de piperina foi observado também raros infiltrados de células mononucleares de forma randômica, conforme observado durante o primeiro ensaio sendo estas alterações consideradas não significativas.



**Figura 13.** Alterações em cortes histológicos do fígado dos frangos de corte do segundo ensaio.

Os dados obtidos pela histomorfometria dos segmentos do intestino delgado revelaram que o grupo intoxicado com  $\text{AFB}_1$  apresentou alterações significativas na morfologia das vilosidades onde se observou uma diminuição do comprimento das vilosidades do duodeno, jejuno e íleo, da superfície de absorção e da largura das vilosidades em todos os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) quando comparado aos outros grupos. No entanto o grupo intoxicado com  $\text{AFB}_1$  não apresentou diferença significativa em relação ao comprimento das vilosidades quando comparado ao grupo que recebeu piperina em associação a  $\text{AFB}_1$ . A associação de piperina e  $\text{AFB}_1$  relacionada à profundidade de cripta no duodeno, jejuno e íleo e se mantiveram significativamente de acordo com os grupos controle e piperina.

**Tabela 11.** Histomorfometria de intestino delgado de frangos de corte tratamentos com piperina e aflatoxina B<sub>1</sub>: comprimento das vilosidades (CV) e largura das vilosidades (LV), profundidade de cripta (PA) e superfície de absorção (SA).

Segmentos Intestino Delgado	Grupos	CV µm	LV µm	PA µm	SA <sup>6</sup> mm <sup>2</sup>
Duodeno	C <sup>1</sup>	1294 <sup>ab</sup> ± 136,50	181,30 <sup>a</sup> ± 46,33	330,10 <sup>a</sup> ± 53,78	0,252 <sup>a</sup> ± 0,062
	P <sup>2</sup>	1393 <sup>a</sup> ± 190,20	212,20 <sup>a</sup> ± 64,61	304,40 <sup>a</sup> ± 59,05	0,273 <sup>a</sup> ± 0,078
	A <sup>3</sup>	1145 <sup>c</sup> ± 105,00	194,60 <sup>a</sup> ± 44,78	231,20 <sup>b</sup> ± 83,01	0,194 <sup>b</sup> ± 0,034
	P + A <sup>4</sup>	1198 <sup>c</sup> ± 208,30	190,50 <sup>a</sup> ± 43,78	261,40 <sup>a</sup> ± 60,11	0,237 <sup>a</sup> ± 0,044
	CV% <sup>5</sup>	12,69	25,49	23,67	22,20
Jejuno	C	1173 <sup>a</sup> ± 140,60	158,30 <sup>a</sup> ± 44,50	226,60 <sup>a</sup> ± 51,08	0,1867 <sup>a</sup> ± 0,059
	P	1099 <sup>a</sup> ± 135,80	177,10 <sup>a</sup> ± 38,56	206,60 <sup>a</sup> ± 26,36	0,195 <sup>a</sup> ± 0,050
	A	970,90 <sup>b</sup> ± 126,00	125,40 <sup>b</sup> ± 26,74	173,20 <sup>b</sup> ± 40,74	0,122 <sup>b</sup> ± 0,029
	P + A	1109 <sup>a</sup> ± 113,0	159,30 <sup>a</sup> ± 41,83	205,40 <sup>a</sup> ± 42,82	0,175 <sup>a</sup> ± 0,035
	CV%	11,88	24,37	19,92	25,23
Íleo	C	789,90 <sup>ab</sup> ± 84,50	151,50 <sup>a</sup> ± 34,98	178,30 <sup>a</sup> ± 40,04	0,112 <sup>ab</sup> ± 0,025
	P	819,30 <sup>a</sup> ± 65,6	151,90 <sup>a</sup> ± 40,70	216,50 <sup>a</sup> ± 60,50	0,115 <sup>a</sup> ± 0,026
	A	502,90 <sup>c</sup> ± 88,8	113,30 <sup>b</sup> ± 30,44	118,30 <sup>b</sup> ± 25,36	0,051 <sup>c</sup> ± 0,012
	P + A	746,80 <sup>b</sup> ± 58,5	128,90 <sup>b</sup> ± 20,93	180,50 <sup>a</sup> ± 42,51	0,092 <sup>b</sup> ± 0,012
	CV%	11,05	23,25	23,84	20,24

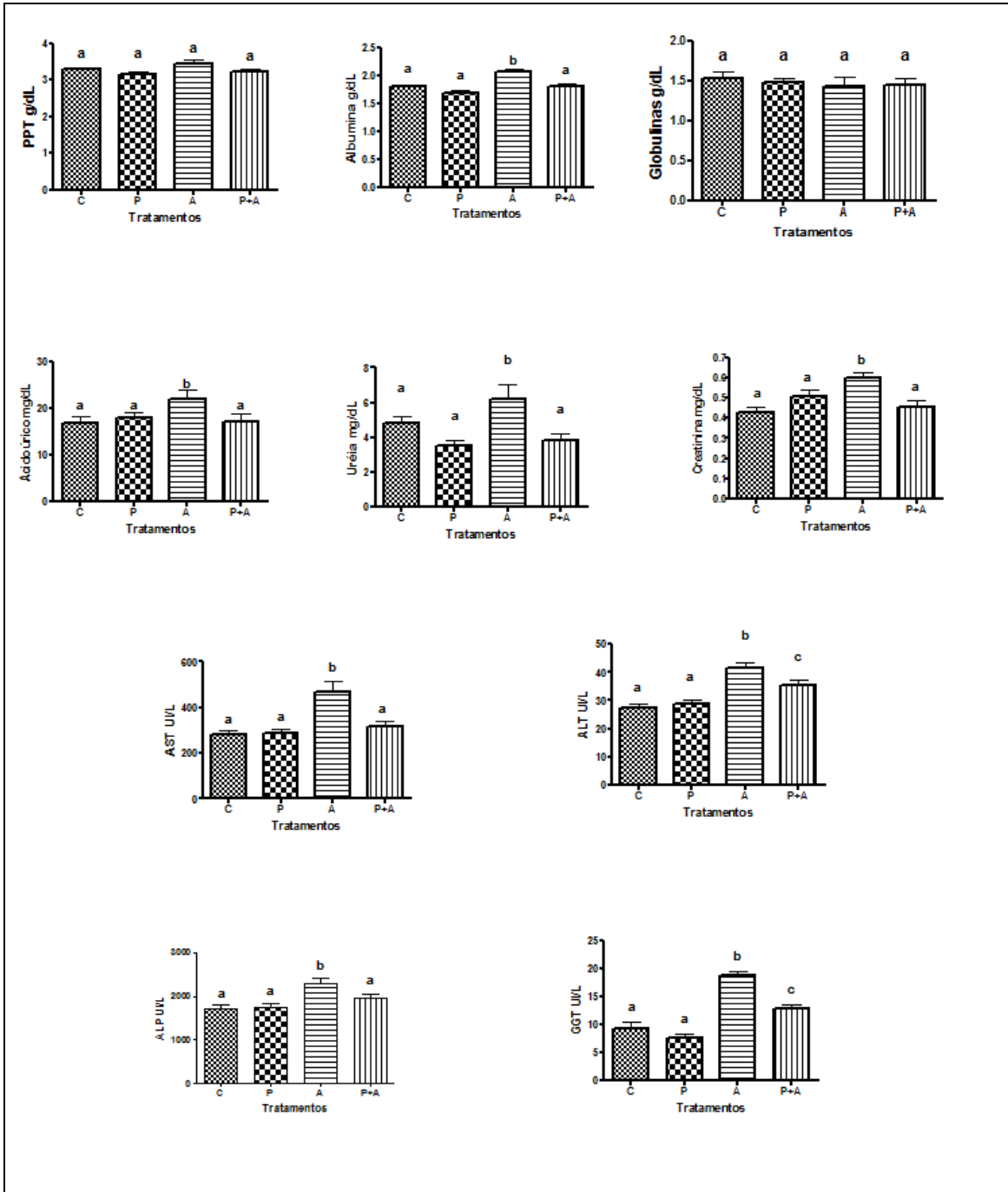
<sup>1</sup> Controle (C); <sup>2</sup> 60 ppm de piperina (P); <sup>3</sup> 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo (A); <sup>4</sup> 60 ppm de Piperina associada a 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo (P + A). <sup>5</sup> Coeficiente de variação. <sup>6</sup> SA (mm<sup>2</sup>) = comprimento (mm) x a largura (50% de altura) microvilosidades (mm). Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 5 vilosidades x 4 dos respectivos segmentos intestinais de frangos distintos. As médias comparadas pelo teste Newman-Keuls. <sup>a, b, c</sup> Nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.3. Análise da bioquímica sérica hepática e renal

Observou-se um aumento significativo de albumina sérica nos frangos intoxicados apenas com AFB<sub>1</sub>, no entanto este aumento não foi observado nas globulinas e não se refletiu na concentração de proteínas plasmáticas totais (Figura 14).

Em relação à função renal, a intoxicação com AFB<sub>1</sub> (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> de peso vivo) promoveu aumento significativo de ácido úrico, uréia e creatinina no soro, biomarcadores de alteração da função renal (figura 14).

A quantificação da enzima AST e ALP indicou um aumento significativo das mesmas, para o grupo da AFB<sub>1</sub>, em relação ao controle e piperina. Já as concentrações das enzimas ALT e GGT no grupo piperina associada a AFB<sub>1</sub> não foram estatisticamente diferentes dos grupos controles e piperina, porém também não foi diferente estatisticamente do grupo AFB<sub>1</sub> (Figura 14).



**Figura 14.** Análise de proteínas plasmáticas totais, albumina, globulinas e perfil hepático e renal das amostras de soros dos grupos controle (C), piperina (P), AFB<sub>1</sub>(A) e tratados com piperina + AFB<sub>1</sub> (P+A). As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls e as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística, com  $p < 0,05$ .



### 5.2.4 Análise hematológica

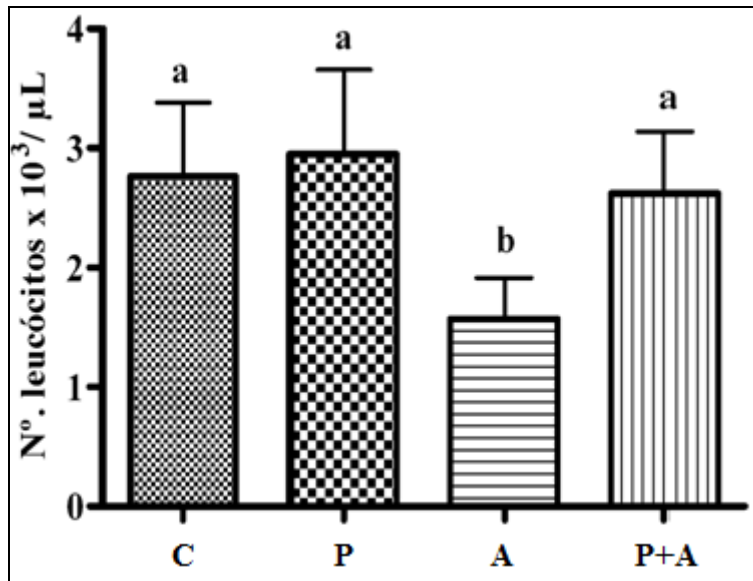
Os parâmetros hematológicos obtidos para os diferentes grupos estão demonstrados na tabela 12 e nas figuras 15 e 16. Os frangos do grupo AFB<sub>1</sub> apresentaram aumento significativo do número de hemácias, com diminuição do VGM (microcitose) sem alteração dos demais parâmetros da hematimetria. Essas alterações não foram observadas no grupo piperina associada a AFB<sub>1</sub>.

**Tabela 12.** Efeito da piperina sobre frangos intoxicados por aflatoxina B<sub>1</sub> sobre os parâmetros hematológicos.

Parâmetros	C <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	A <sup>5</sup>	P+A <sup>6</sup>	CV% <sup>7</sup>
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	2,11 <sup>a</sup> ± 0,33	2,08 <sup>a</sup> ± 0,34	2,53 <sup>b</sup> ± 0,51	2,20 <sup>a</sup> ± 0,35	17,13
Hematócrito (%)	30,50 <sup>a</sup> ± 2,59	29,50 <sup>a</sup> ± 2,50	29,07 <sup>a</sup> ± 3,71	29,93 <sup>a</sup> ± 4,66	11,34
Hemoglobina (g/dL)	10,79 <sup>a</sup> ± 2,86	12,20 <sup>a</sup> ± 2,60	11,40 <sup>a</sup> ± 2,87	11,15 <sup>a</sup> ± 2,73	24,41
VGM <sup>1</sup> (fL)	193,50 <sup>a</sup> ± 32,38	196,40 <sup>a</sup> ± 32,49	157,40 <sup>b</sup> ± 24,42	185,70 <sup>a</sup> ± 30,13	16,25
CHGM <sup>2</sup> (g/dL)	36,85 <sup>a</sup> ± 8,62	39,90 <sup>a</sup> ± 6,05	38,53 <sup>a</sup> ± 10,34	36,51 <sup>a</sup> ± 7,34	21,37

<sup>1</sup> VGM (volume globular médio); <sup>2</sup> CHGM (concentração hemoglobina globular média); <sup>3</sup> Controle (C); <sup>4</sup> 60 ppm de piperina (P); <sup>5</sup> 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo (A); <sup>6</sup> 60 ppm de piperina associada a 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo (P + A). <sup>7</sup> Coeficiente de variação. Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais. As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls; <sup>a, b</sup> Nas fileiras: médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

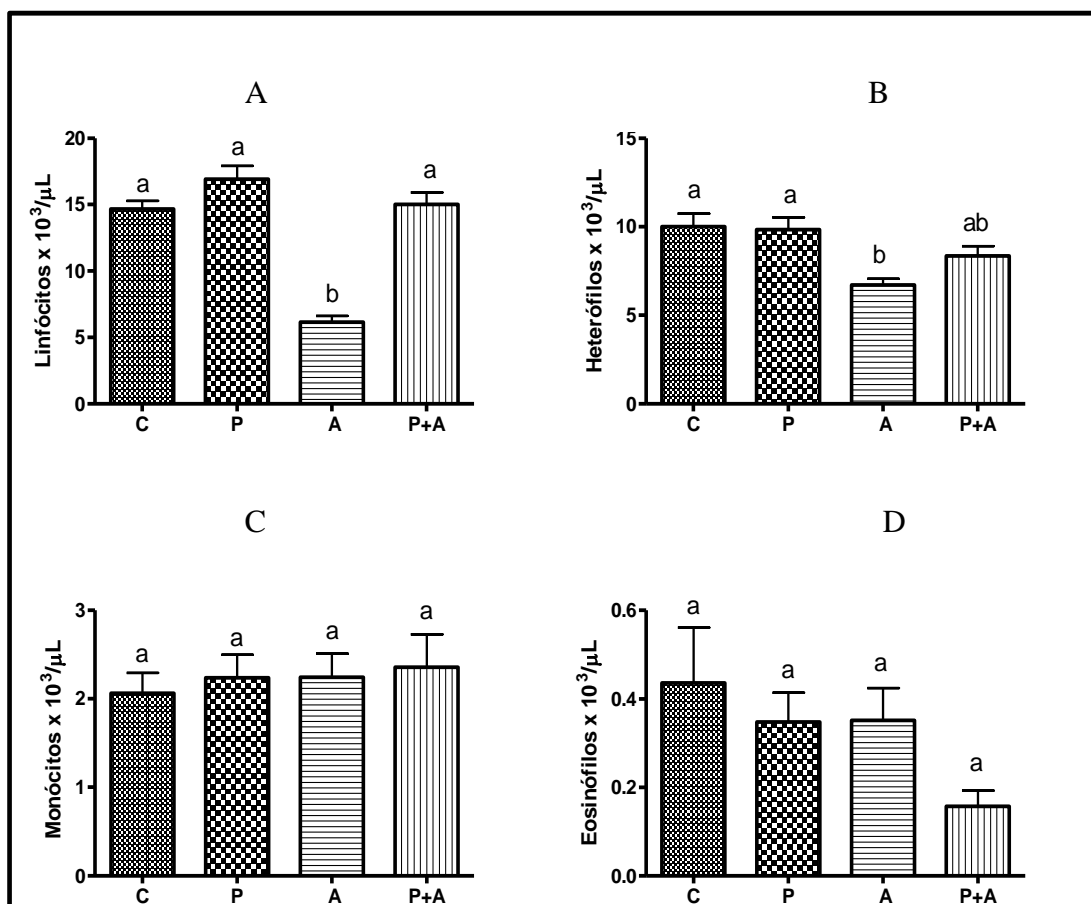
A ação da piperina sobre a leucopenia/linfopenia associadas à intoxicação por AFB<sub>1</sub> foi avaliada através da contagem do número total de leucócitos e contagem diferencial em esfregaço sanguíneo. Na Figura 15 podemos observar que a AFB<sub>1</sub> foi capaz de diminuir significativamente o número total de leucócitos dos animais intoxicados, porém, quando os frangos de corte receberam 60 ppm de piperina adicionada à ração, essa diminuição não foi observada (grupo P+A), não havendo diferença significativa em relação ao grupo controle e piperina.



**Figura 15.** Efeito da piperina sobre a leucopenia induzida através da intoxicação de frangos de corte com aflatoxina B<sub>1</sub>. A alimentação dos frangos de corte com piperina (60 ppm) foi iniciada 24 horas antes da intoxicação com AFB<sub>1</sub>. C- controle; P- 60 ppm de piperina; A- 0,5mg AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo; P+A- 60 ppm piperina associada 0,5mg AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo. Os resultados estão expressos pela média aritmética do grupo ± desvio padrão de 15 animais/grupo. As médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística, com p < 0,05.

Na contagem diferencial dos leucócitos, observou-se diminuição significativa do número de linfócitos (p < 0,001) e heterófilos (p < 0,01) dos animais intoxicados com AFB<sub>1</sub> em relação ao grupo controle. A ração dos frangos contendo 60 ppm de piperina não alterou a contagem das diferentes tipos de leucócitos e, quando alimentados com ração adicionada de piperina, as amostras de sangue apresentaram a contagem diferencial dos leucócitos sem diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 16).





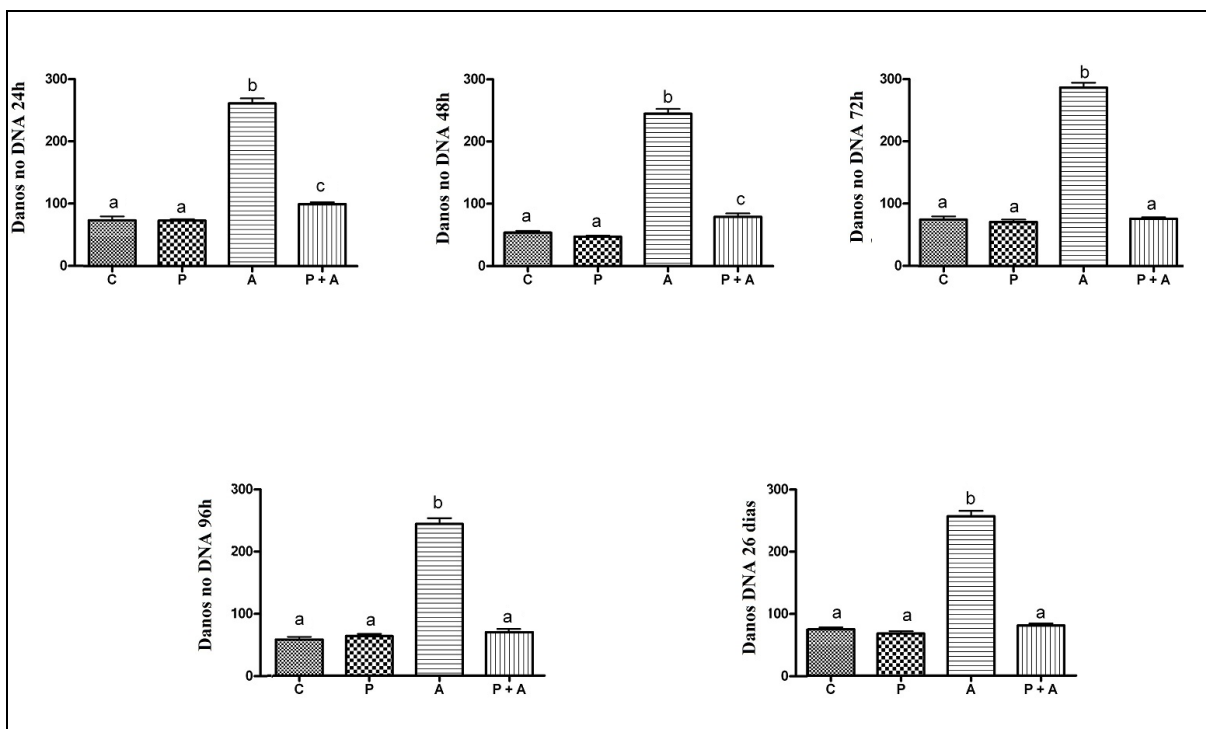
**Figura 16.** Efeito da piperina nos valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B<sub>1</sub>: (A) Linfócitos; (B) Heterófilo; (C) Monócito; (D) Eosinófilo. C- controle; P- 60 ppm de piperina; A- 0,5mg AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo; P+A- 60 ppm piperina associada 0,5mg AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo. Os resultados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais. As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (linfócitos e heterófilos) e pelo teste de Kruskal-Wallis (eosinófilos e monócitos). <sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística, com p < 0,05.

### 5.2.5 Análise genotóxica

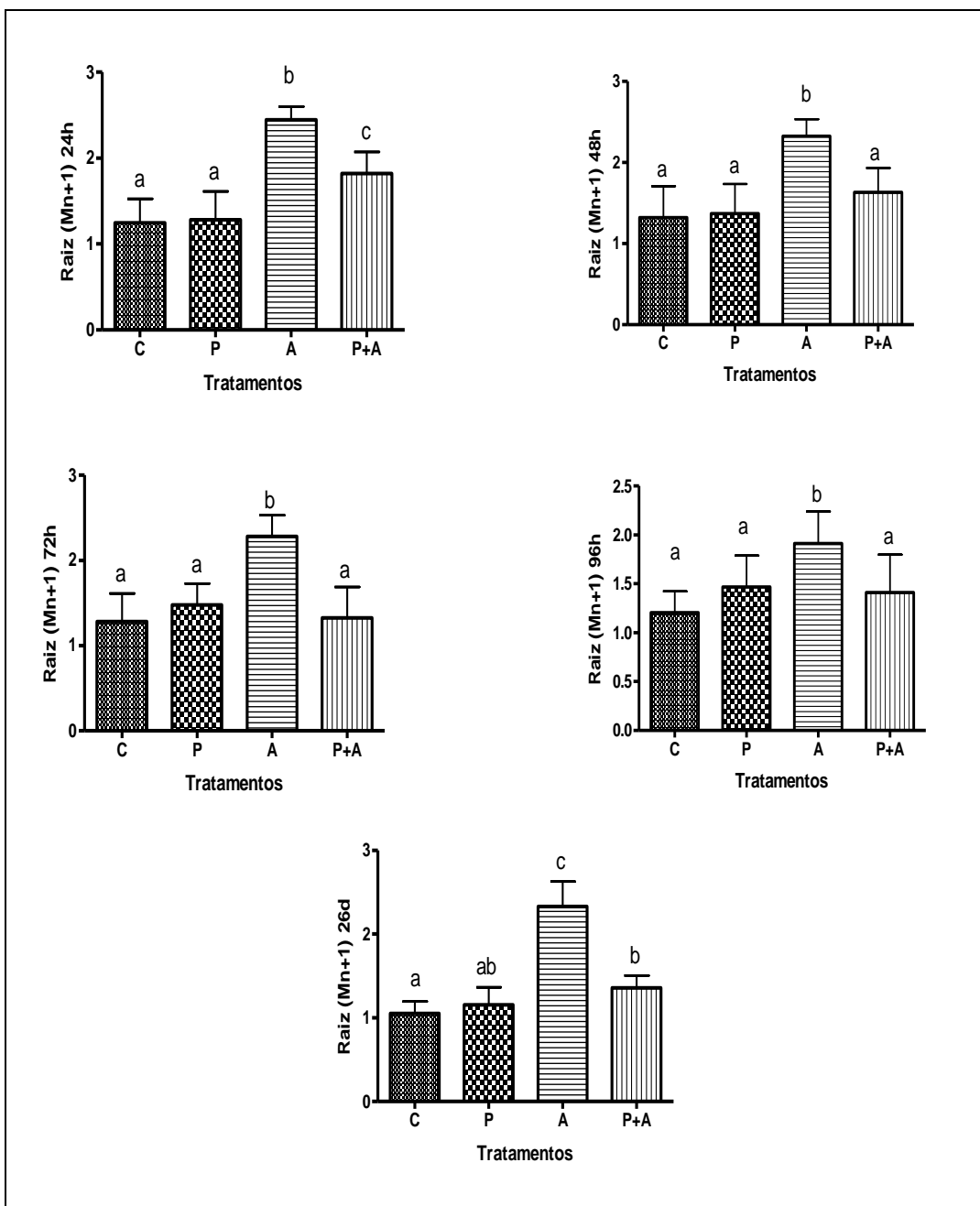
Os resultados da análise genotóxica nos diferentes grupos experimentais foram expressos como média ± desvio padrão e mostrados nas figuras 18 e 19 que mostram os resultados obtidos pelo teste do Cometa e do Micronúcleo, respectivamente. A intoxicação oral e diária com AFB<sub>1</sub> foi capaz de causar danos significativos ao DNA, detectados nas primeiras 24 horas de intoxicação, e mantidos nos demais tempos analisados (48, 72, 96 horas e 26 dias de tratamento).

A piperina adicionada à ração reduziu significativamente os efeitos genotóxicos induzidos pela AFB<sub>1</sub> (grupo P+A), efeito observado na análise realizada com 24 horas de intoxicação e mantido por todo o período de observação.

O grupo de frangos não intoxicados e que receberam piperina não apresentaram danos no DNA das células do sangue periférico (teste do cometa) e eritrócitos (micronúcleo), não havendo diferença significativa entre os grupos controle e piperina.

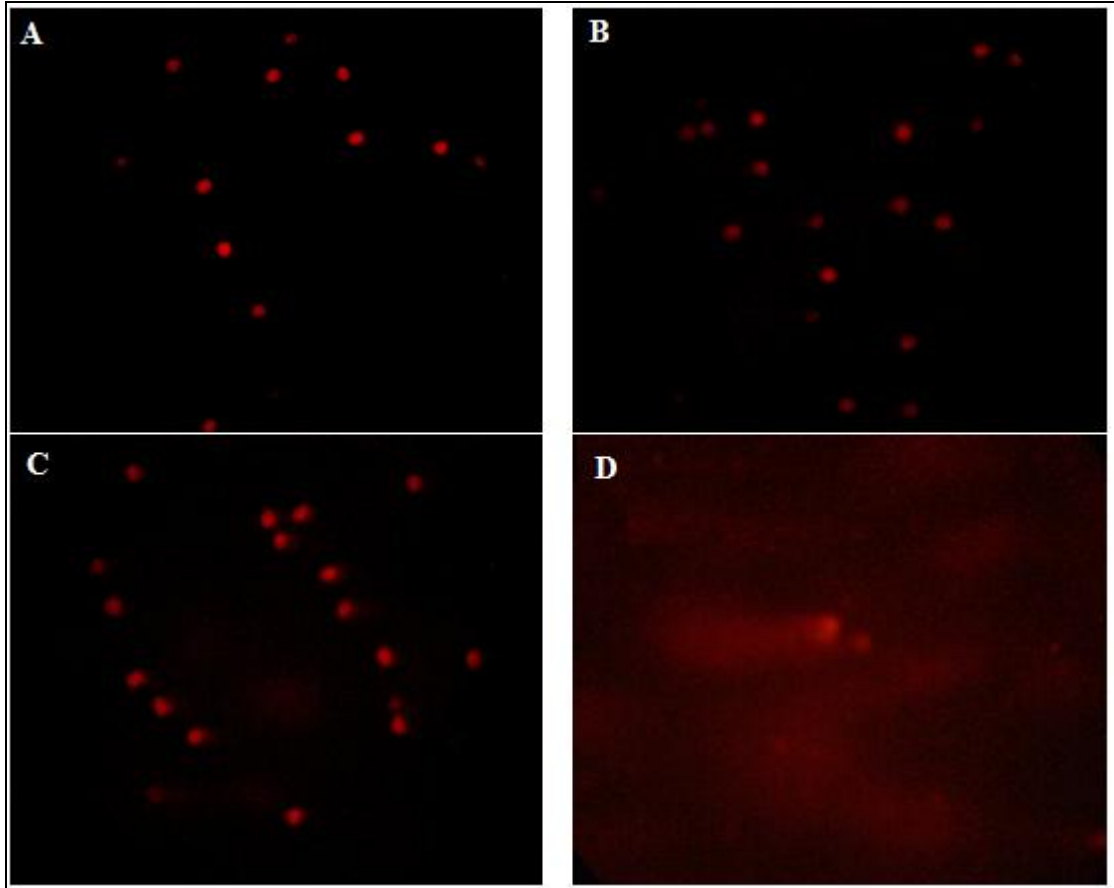


**Figura 17.** Ação da piperina sobre o efeito genotóxico da aflatoxina B<sub>1</sub> pelo teste do Cometa, a partir do sangue periférico de frangos. C- grupo controle; P - 60 ppm de piperina; A - 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo; P+A- 60 ppm de Piperina associada a 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo, após 24, 48, 72, 96 horas e 26 dias. <sup>a, b, c</sup> As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls; médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).



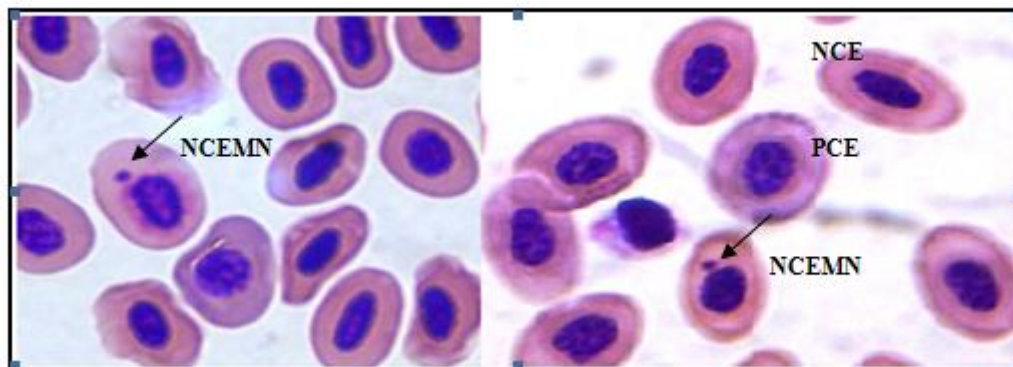
**Figura 18.** Raiz quadrada da média de micronúcleos + 1 em 2000 eritrócitos nos tempos 24, 48, 72, 96 horas e com 26 dias de intoxicação de amostras de sangue periférico de frangos de corte. C- Controle; P- Piperina 60 ppm; A- AFB<sub>1</sub> 0,5mg de AFB<sub>1</sub>.kg de peso vivo; P+A- Piperina + AFB<sub>1</sub>). Os dados foram normalizados após transformação radicial. <sup>a, b, c</sup> As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls; médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).

A Figura 19 exemplifica a visualização dos danos ao DNA das células do sangue periférico obtidos pelo teste de Cometa nos diferentes grupos experimentais.

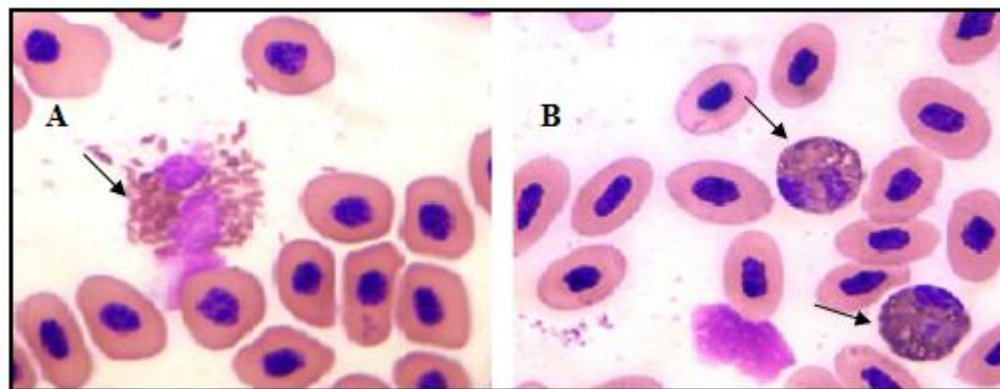


**Figura 19.** Teste do cometa. Os danos ao DNA das células do sangue periférico foram observados em microscópio de fluorescência Olympus, equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm (aumento de 400x). Foram analisadas 100 células de cada animal. Figura A e B- Classe 0 e 1 – grupos controle e 60 ppm de piperina ; Figura C- Classe 2 – grupo Piperina associada a 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>. kg<sup>-1</sup> de peso vivo; Figura D- Classe 3 - Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>).

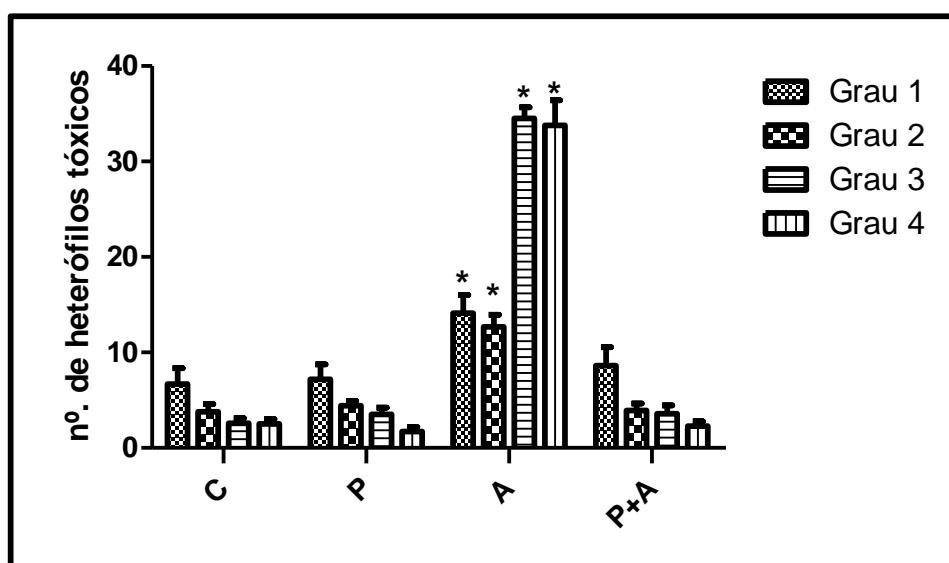
A Figura 20 mostra a identificação de micronúcleos e de eritrócitos normocromáticos e policromáticos dos frangos de corte que receberam a associação de piperina e AFB<sub>1</sub>. Observou-se ainda o aumento de heterófilos tóxicos (grau 3; grau 4) em frangos do grupo que recebeu AFB<sub>1</sub>. O grupo que recebeu piperina associada a AFB<sub>1</sub> não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e piperina em todos os graus de heterófilos tóxicos avaliados (Figura 21 e 22).



**Figura 20.** Fotomicrografia com aumento de 1000 X em microscópio óptico (Olympus<sup>®</sup> CH30). NCEMN: Eritrócitos normocromáticos com micronúcleo indicados pela seta. PCE: eritrócitos policromáticos; NCE: eritrócitos normocromáticos do sangue periférico do grupo de frangos que recebeu aflatoxina B<sub>1</sub> (0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.Kg<sup>-1</sup>) .



**Figura 21.** Fotomicrografia com aumento de 1000 X em microscópio óptico (Olympus<sup>®</sup> CH30). (A) Heterófilo tóxico observados em esfregaço sanguíneo de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B<sub>1</sub>, com grave alteração tóxica (seta); (B) Heterófilos tóxicos observados em esfregaços sanguíneos de frangos de corte que receberam piperina associada aflatoxina B<sub>1</sub>, toxicidade discreta (seta).



**Figura 22.** Contagem de heterófilos tóxicos observada (aumento de 1000x). Foram analisadas 100 heterófilos de amostras do sangue periférico de frangos de corte após 26 dias de experimentação. C- grupo controle; P - 60 ppm de piperina; A - 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo ; P+A- 60 ppm de Piperina associada a 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo. Grau 1(discreta alteração tóxica); Grau 2 (moderada alteração tóxica); Grau 3 e 4 (grave alteração tóxica). As médias comparadas pelo teste Studant-Newman-Keuls; \* As médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).

Foi possível observar, no grupo que recebeu a AFB<sub>1</sub> isolada, que houve redução significativa da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos, em relação aos outros grupos (Tabela 13).

**Tabela 13.** Relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE/NCE) de um total de 1000 eritrócitos de frangos de corte.

Tempo	Tratamento <sup>1</sup> (média ± dp)				CV(%) <sup>5</sup>
	C <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	P+A <sup>4</sup>	
24 horas	0,097 <sup>a</sup> ± 0,027	0,081 <sup>a</sup> ± 0,024	0,045 <sup>b</sup> ± 0,011	0,070 <sup>a</sup> ± 0,016	28,14
48 horas	0,107 <sup>a</sup> ± 0,029	0,089 <sup>a</sup> ± 0,010	0,060 <sup>b</sup> ± 0,017	0,096 <sup>a</sup> ± 0,018	21,57
72 horas	0,130 <sup>a</sup> ± 0,036	0,126 <sup>a</sup> ± 0,027	0,075 <sup>b</sup> ± 0,071	0,116 <sup>a</sup> ± 0,024	27,10
96 horas	0,153 <sup>a</sup> ± 0,036	0,149 <sup>a</sup> ± 0,038	0,084 <sup>b</sup> ± 0,025	0,156 <sup>a</sup> ± 0,021	22,99
26 dias	0,268 <sup>a</sup> ± 0,020	0,263 <sup>a</sup> ± 0,024	0,062 <sup>b</sup> ± 0,018	0,246 <sup>a</sup> ± 0,017	13,68

<sup>1</sup>C- Controle, <sup>2</sup>P- 60 ppm de piperina; <sup>3</sup>A- 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo; <sup>4</sup>P+A- 60 ppm de Piperina associada a 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo. <sup>5</sup>Coeficiente de variação. A análise estatística para os dados foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Studant-Newman-Keuls. <sup>a,b,c</sup> Nas fileiras: médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ( $p<0,05$ ).

### 5.2.6 Avaliação dos parâmetros zootécnicos

O grupo de frangos intoxicados com AFB<sub>1</sub> foi o que apresentou o pior desempenho, em todas as fases avaliadas, quando comparado com os grupos controle e piperina. A administração de ração aditivada com piperina associada à AFB<sub>1</sub> propiciou desempenho semelhante ao do grupo controle e piperina isolada. (Tabela 14).

De acordo com os parâmetros de carcaça avaliados demonstrados na tabela 15 observou-se diminuição significativa no peso vivo pós-jejum, no peso da carcaça fria e no peso absoluto e relativo da coxa referente ao grupo que recebeu AFB<sub>1</sub> quando comparado aos outros grupos. Ainda referente aos cortes pode-se observar um aumento significativo no peso absoluto e relativo do peito nos grupos piperina e piperina associada a AFB<sub>1</sub> quando comparado aos grupos controle e AFB<sub>1</sub> (Tabela 15).

O rendimento de carcaça do grupo que recebeu AFB<sub>1</sub> foi significativamente menor do que os outros grupos experimentais (Tabela 15 e Figura 23).

De forma significativa o peso absoluto e relativo da moela aumentou no grupo que recebeu piperina em associação à AFB<sub>1</sub> e do proventriculo no grupo que recebeu AFB<sub>1</sub>. Alterações significativas também foram observadas no coração onde seu peso absoluto e relativo diminuíram no grupo que recebeu AFB<sub>1</sub> e aumentou no grupo que recebeu 60 ppm de piperina (Tabela 15).

**Tabela 14.** Efeito da piperina adicionada à ração de frangos de corte intoxicados por aflatoxina B<sub>1</sub> sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) nos diferentes períodos de produção.

Parâmetro	Tratamentos				CV% <sup>1</sup>
	C	P	A	P + A	
9 a 21 dias					
CR (g)	1057 <sup>a</sup> ± 36,77	1073 <sup>a</sup> ± 32,91	1059 <sup>a</sup> ± 21,63	1082 <sup>a</sup> ± 13,32	2,46
GP (g)	679,3 <sup>a</sup> ± 43,50	692,0 <sup>a</sup> ± 25,53	609,30 <sup>b</sup> ± 31,39	692,70 <sup>a</sup> ± 16,80	4,42
CA	1,55 <sup>a</sup> ± 0,05	1,55 <sup>a</sup> ± 0,02	1,74 <sup>b</sup> ± 0,06	1,56 <sup>a</sup> ± 0,02	2,38
22a35 dias					
CR (g)	2220 <sup>a</sup> ± 75,42	2270 <sup>a</sup> ± 109,00	2339 <sup>a</sup> ± 82,39	2252 <sup>a</sup> ± 46,87	3,45
GP (g)	1359 <sup>a</sup> ± 20,98	1445 <sup>a</sup> ± 55,51	1320 <sup>a</sup> ± 68,15	1391 <sup>a</sup> ± 48,04	3,50
CA	1,63 <sup>a</sup> ± 0,05	1,57 <sup>a</sup> ± 0,05	1,77 <sup>b</sup> ± 0,06	1,61 <sup>a</sup> ± 0,02	2,80
9 a 35 dias					
CR (g)	3274 <sup>a</sup> ± 98,83	3343 <sup>a</sup> ± 114,50	3365 <sup>a</sup> ± 74,73	3334 <sup>a</sup> ± 59,36	2,61
GP (g)	2039 <sup>a</sup> ± 63,54	2137 <sup>a</sup> ± 35,27	1929 <sup>b</sup> ± 37,00	2064 <sup>a</sup> ± 81,09	2,23
CA	1,60 <sup>a</sup> ± 0,05	1,56 <sup>a</sup> ± 0,04	1,71 <sup>b</sup> ± 0,02	1,61 <sup>a</sup> ± 0,04	2,66

(C) - controle; (P) - 60ppm de Piperina; (A) - 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup>de peso vivo; (P+A) - 60 ppm de piperina associada a 0,5mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup>de peso vivo. Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais. As médias comparadas pelo teste de Student- Newman-Keuls. <sup>1</sup> Coeficiente de variação. <sup>a, b</sup> Nas linhas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).

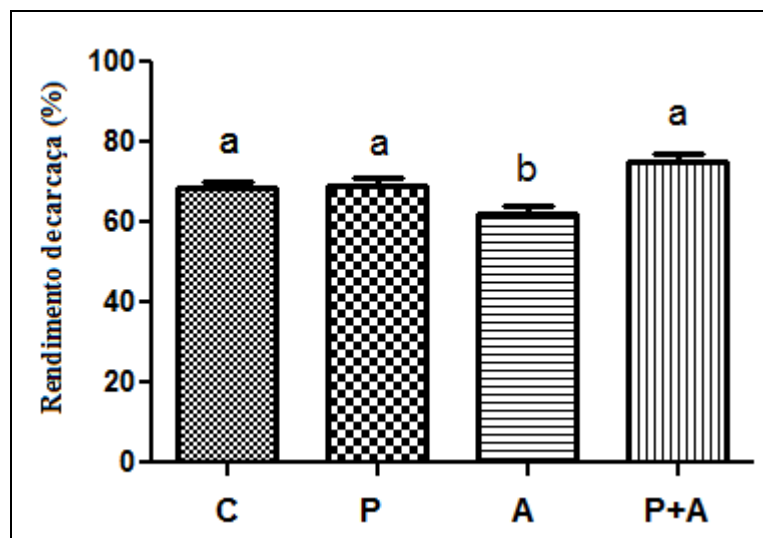
**Tabela 15.** Parâmetros de carcaça avaliados em frangos de corte que receberam piperina adicionada à ração e intoxicados com aflatoxina B<sub>1</sub>.

Parâmetros	Tratmentos				CV(%) <sup>2</sup>
	C	P	A	P+A	
	Peso Vivo Pós Jejum (PV) Peso da Carcaça Fria (PCF) e Pesos Absolutos (g)				
PV	2312 <sup>b</sup> ±178,90	2110 <sup>b</sup> ±165,20	1680 <sup>a</sup> ±229,00	2140 <sup>b</sup> ±137,40	7,81
PCF	1555 <sup>b</sup> ±157,10	1619 <sup>b</sup> ±120,80	1478 <sup>a</sup> ±155,90	1604 <sup>a</sup> ±11,60	8,77
Coxa	473,6 <sup>a</sup> ±43,70	495,00 <sup>a</sup> ±36,22	420,70 <sup>b</sup> ± 35,78	514,60 <sup>a</sup> ±80,87	10,19
Peito	562,90 <sup>a</sup> ±53,52	626,40 <sup>b</sup> ±49,05	527,50 <sup>a</sup> ±56,29	612,90 <sup>b</sup> ±58,63	9,41
Dorso	296,80 <sup>a</sup> ±37,50	319,30 <sup>a</sup> ±43,80	282,9 <sup>a</sup> ±34,63	312,9 <sup>a</sup> ±33,15	11,87
Asa	160,70 <sup>a</sup> ±11,58	164,30 <sup>a</sup> ±18,59	155,00 <sup>a</sup> ±15,81	161,80 <sup>a</sup> ±9,53	8,65
Coração	12,17 <sup>b</sup> ±19,00	14,88 <sup>c</sup> ±1,12	10,26 <sup>a</sup> ±1,12	13,30 <sup>b</sup> ±2,17	12,59
Proventrículo	9,55 <sup>a</sup> ±2,10	9,89 <sup>a</sup> ±15,80	10,84 <sup>b</sup> ±3,90	9,12 <sup>a</sup> ±1,67	13,78
Moela	31,21 <sup>a</sup> ±2,73	34,45 <sup>a</sup> ±2,88	30,28 <sup>a</sup> ± 3,58	37,72 <sup>b</sup> ±6,81	11,74
	Rendimento e Pesos Relativos (%)				
RC <sup>1</sup>	68,55 <sup>b</sup> ±6,19	69,14 <sup>b</sup> ± 8,15	62,17 <sup>a</sup> ±6,26	74,85 <sup>b</sup> ±9,09	10,76
Coxa	30,51 <sup>a</sup> ±0,40	30,60 <sup>a</sup> ± 0,39	28,56 <sup>b</sup> ±0,41	32,00 <sup>a</sup> ±0,94	6,52
Peito	36,24 <sup>a</sup> ±0,45	38,71 <sup>b</sup> ±0,48	35,74 <sup>a</sup> ±0,61	38,19 <sup>b</sup> ±0,56	9,18
Dorso	19,09 <sup>a</sup> ±0,45	19,65 <sup>a</sup> ±0,40	19,23 <sup>a</sup> ±0,63	19,51 <sup>a</sup> ±0,42	9,41
Asa	10,38 <sup>a</sup> ±0,20	10,14 <sup>a</sup> ±0,21	10,52 <sup>a</sup> ±0,20	10,11 <sup>a</sup> ±0,17	7,12
Coração	0,78 <sup>b</sup> ±0,03	0,92 <sup>c</sup> ±0,02	0,70 <sup>a</sup> ±0,02	0,83 <sup>b</sup> ±0,03	12,00
Proventrículo	0,61 <sup>a</sup> ±0,03	0,61 <sup>a</sup> ±0,02	0,73 <sup>b</sup> ±0,06	0,57 <sup>a</sup> ±0,02	18,60
Moela	2,02 <sup>a</sup> ±0,05	2,14 <sup>a</sup> ±0,07	2,06 <sup>a</sup> ±0,07	2,36 <sup>b</sup> ±0,11	12,94

C) - controle; (P) - 60ppm de Piperina; (A) - 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup>de peso vivo; (P+A) - 60 ppm de piperina associada a 0,5mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup>de peso vivo. <sup>1</sup> Rendimento de carcaça (RC).

<sup>2</sup> Coeficiente de Variação. Os dados tabulados estão expressos pela média do grupo ± desvio padrão de 15 animais.As médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. <sup>a,b</sup> Nas linhas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).





**Figura 23.** Rendimento de carcaça de frangos de corte abatido aos 36 dias de idade. Grupos: controle (C); 60 ppm de piperina (P); 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo (A) e 60 ppm de piperina associada a 0,5mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo (P+A). As médias comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls. <sup>a, b</sup> As médias com letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Dada a importância das aflatoxinas para a saúde humana e animal, pesquisas e novas tecnologias que visem reduzir ou eliminar sua atividade tóxica contribuindo para a redução de as perdas econômicas na pecuária têm sido cada vez mais incentivadas. Aflatoxicose que é uma doença resultante da ingestão de aflatoxina a partir de alimentos e rações contaminadas tornou-se uma das enfermidades mais difundidas e importantes no setor avícola (CAST, 2003; OSWALD, et al 2005; TESSARI et al. 2008).

O aumento do consumo de carne de frango trouxe novas exigências ao setor, fazendo com que a indústria avícola tivesse de se adaptar a essa nova realidade. Hoje, grande parte dos consumidores exige produtos seguros e livres de patógenos ou substâncias prejudiciais à saúde. Nesse aspecto, as aflatoxinas causam preocupação, não somente pela diminuição da produção avícola, mas também pela possibilidade de transmissão de resíduos tóxicos para o produto final e que pode gerar sérios problemas de saúde pública (BAILEY et al., 1988; KUBENA et al., 1998; LEDOUX et al., 1996; PARLAT et al., 1999, ROSMANINHO et al., 2001).

A adição de fitobióticos à ração de frangos vem sendo investigada com grande interesse. Alguns deles podem atuar como promotores de crescimento e outros podem neutralizar os efeitos tóxicos de xenobióticos, como por exemplo, a AFB<sub>1</sub> (NAFFETI et al. 2008; YENER et al. 2009; CARDOSO, et al. 2007; GAGINI et al. 2010).

A principal amida extraída da pimenta-do-reino, a piperina, vem sendo descrita na literatura como um potente agente quimioprotetor, contra pró-carcinógenos ativados pelo citocromo P-450 (ATAL et al., 1985; ALLAMEH et al., 1992), e sua ação protetora contra os efeitos tóxicos da AFB<sub>1</sub> já foi descrita em células de mamíferos (REEN et al., 1997, SINGH et al., 1994).

Outros aspectos relevantes da piperina são a sua rápida absorção e eliminação, como descrito por Bhat e Chandrasekhara (1986, 1987), que demonstraram que a piperina é eficientemente absorvida (97%) pelo intestino delgado e apenas traços (< 0,15%) foram detectados no soro, rins e baço, 24 horas após de sua administração. A concentração máxima no sangue, intestino, fígado e rim, ocorrem após 6 horas da administração oral em ratos e diminui drasticamente em 24 horas, conforme estudo realizado por Suresh; Srinivasan (2010).

Portanto, a partir dessas observações, nosso primeiro ensaio destinou-se a analisar os efeitos de diferentes concentrações de piperina adicionadas à ração de frangos de corte. A determinação de enzimas e metabolitos relacionados a danos hepáticos e renais e de parâmetros hematológicas, anatomopatológicas e histopatológicas, bem como as avaliações zootécnicas, foram utilizadas como determinantes de efeitos tóxicos.

A avaliação clínica dos frangos de corte durante o período analisado não evidenciou nenhuma alteração sugestiva de intoxicação nas concentrações de piperina utilizadas, nos grupos alimentados com piperina e o grupo controle. Após o abate dos frangos, a necropsia das aves não revelou qualquer alteração de tamanho, coloração ou lesão nos órgãos. Esses resultados confirmam os resultados obtidos com a utilização da piperina, por via oral, em ratos, onde os autores afirmaram ser uma via segura de administração desta substância (CARDOSO; 2007; SABINA et al. 2010).

De acordo com as análises histopatológicas, a adição de 60 ppm de piperina à ração foi segura, não sendo observada nenhuma lesão ou alteração diferente da observada no grupo controle. Estreitamento dos sinusóides, degeneração vacuolar sugestiva de esteatose, lesões teciduais (necrose e apoptose) e infiltrado inflamatório, com predominância de células mononucleadas, com característica dose-dependente foram observadas no tecido hepático dos frangos, que receberam as concentrações de 120 e 180 ppm de piperina. Estas alterações corroboram com as encontradas por Cardoso et al. (2009), que evidenciaram alterações

semelhantes, no fígado de frangos de corte que receberam diferentes concentrações de piperina, por gavagem, por um período de 14 dias (8 a 21 dias de idade).

A determinação da concentração não tóxica e que simultaneamente seja capaz de estimular o sistema imunológico, em frangos de corte, aliadas às propriedades biológicas e farmacológicas da piperina, já demonstradas em mamíferos, incentivam o estudo dessa amida nesse modelo animal (SUNILA; KUTTAN, 2004; PATHAK; KHANDELWAL, 2007). No setor avícola, estudos sobre a incorporação de substâncias naturais, como fitoterápicos ou promotores de desempenho alternativos, vêm sendo estimulados, principalmente, estudos com substâncias que aumentem a resistência do organismo animal contra diversas doenças, intoxicações ou adversidades ambientais que comprometem o sistema imunológico das aves.

Gagini et al. (2010) observaram que a piperina diminuiu os efeitos tóxicos das aflatoxinas em ratos, evidenciados nas lesões hepáticas dos ratos intoxicados, por gavagem, com piperina (12 mg piperina.Kg<sup>-1</sup>) associada a AFB<sub>1</sub>. Também observaram que o perfil das enzimas hepáticas se manteve dentro dos padrões da normalidade e que também houve redução da leucopenia e linfopenia, sinais clínicos característicos de aflatoxicoses. Cardoso et al. (2007), também observaram o efeito quimioprolifático em frangos de corte, evidenciado na redução das alterações histopatológicas do tecido hepático, como também na leucopenia que é normalmente induzida pela ação das aflatoxinas, no grupo que recebeu 2,25 mg de piperina.kg<sup>-1</sup> de peso vivo.

No intuito de investigar se a piperina era capaz de promover mudanças na ultraestrutura do epitélio do intestino delgado, alterando sua superfície de absorção, foram realizadas análises histomorfométricas dos segmentos intestinais. A administração diária de piperina incorporada à ração por 35 dias consecutivos influenciou nas medidas histomorfológicas das microvilosidades dos segmentos do intestino delgado. Essas alterações se caracterizaram por um aumento significativo da superfície de absorção do duodeno e do íleo, nos frangos que receberam 60 ppm de piperina.

Os frangos que receberam a ração com as concentrações mais elevadas, 120 e 180 ppm de piperina, apresentaram nítidas alterações tanto da superfície de absorção quanto na altura das criptas. Este tipo de alteração morfológica pode implicar no aumento da capacidade de absorção de nutrientes pelo indivíduo afetado. Dados comprovados por Khajuria et al. (2002), que demonstraram em ratos, que administração oral de 10 mg de piperina.Kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo influenciava na permeabilidade da membrana celular e no aumento da síntese de proteínas, associada com a função de citoesqueleto, resultando no aumento da superfície de absorção do intestino delgado, de modo tempo-dependente. Srinivasan, (2007) também descreveu que tanto a pimenta-do-reino como a piperina apresentavam atividade sobre o epitélio gastrointestinal, influenciando na mobilidade intestinal, caracterizando como uma propriedade antidiarréica e o aumento da absorção de nutrientes.

O modo de ação da piperina sobre o epitélio intestinal ainda não é totalmente elucidado (SURESH; SRINIVASAN, 2008).

Nas análises sobre a toxicidade das diferentes concentrações de piperina, testadas no primeiro ensaio, também foram feitas avaliações através da dosagem de enzimas hepáticas e catabólitos renais. A concentração de 60 ppm de piperina não foi tóxica para o fígado ou rim; todavia, concentrações maiores promoveram aumento significativo da enzima AST. Resultado que sugere disfunção hepática recente, apesar de não ser uma enzima específica de lesão hepática (THRALL, 2004; SCHMIDT et al., 2007). Os resultados estão de acordo com os observados na análise histopatológica.

Em algumas das principais provas enzimáticas de função hepática, que refletem lesão hepatocelular como a dosagem de AST, ALP, GGT, o aumento em sua produção pode estar relacionado à lesão hepática grave, neoplasias e colestase, respectivamente. Com relação à enzima ALT, seu valor é limitado como teste para avaliar distúrbios hepatocelulares em aves, por ser encontrada tanto no citosol de hepatócitos como nos músculos e em outros tecidos (SCHMIDT et al., 2007). Não foram observadas diferenças significativas nos valores séricos das outras enzimas hepáticas estando coerentes com os resultados das análises histopatológicas realizadas.

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 por Dogra et al. (2004). Esses pesquisadores inocularam 1,12 mg.kg<sup>-1</sup>, 2,25 mg.kg<sup>-1</sup> e 4,5 mg.kg<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> causaram uma redução significativa na contagem total de leucócitos. Todavia, não houve variação significativa dos diferentes tipos de leucócitos. Os resultados obtidos por Cardoso et al. (2009) 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 em frangos de corte. No entanto no presente trabalho houve diminuição significativa do número total de leucócitos no grupo de frangos que receberam 180 ppm de piperina adicionada a ração. O grupo também apresentou diminuição significativa dos heterófilos e monócitos em relação ao grupo controle. A diminuição de número de monócitos foi significativa em todos os grupos de frangos que receberam piperina adicionada à ração, com características dose-dependente, no entanto sem alteração na leucometria total nos grupos de 60 e 120 ppm. Estes resultados sugerem que a piperina age de forma diferente no sistema hematopoiético de frangos de corte e camundongos e esta ação pode estar relacionada ao modo, via de administração e a dose da amida.

Segundo Cardoso; Tessari (2003) a idade, condições ambientais e diferentes regiões ou países são fatores que podem afetar o estudo dos parâmetros hematológicos, evidenciado pelas diferenças em alguns valores avaliados por estes autores. Assim, foram utilizados controles internos dentro do grupo experimental e do próprio indivíduo, os quais foram submetidos às mesmas condições experimentais, que são considerados mais fidedignos do que valores de referencia externos.

As diferentes concentrações de piperina testadas não foram capazes de alterar, de forma significativa, os valores médios do número total de hemácias, hematócrito, proteínas plasmáticas totais, estando estes dentro dos índices de normalidade de acordo com o controle, com exceção da hemoglobina e do CHGM para a concentração de 120 ppm, sugerindo uma microcitose, porém sem demonstrar diminuição do hematócrito não podendo caracterizar anemia microcítica.

Com a avaliação dos índices de produtividade, muito importantes em um sistema de produção avícola, os resultados mostraram que houve melhor desempenho, com melhor conversão alimentar e maior ganho médio de peso, no período correspondente a 36 - 42 dias de idade relacionado ao grupo de frangos que receberam a ração com 60 ppm de piperina. Esses dados sugerem que a adição de piperina na ração dos frangos de corte pode ser favorável economicamente ao sistema de produção avícola.

Alguns fitobióticos mostraram serem bons promotores de crescimento. Fadlalla, et al. (2010) observaram que a suplementação de alho na dieta de frangos de corte melhoraram o ganho de peso das aves em 21 dias de idade. Biavatti et al. (2003) melhoraram a performance de frangos inoculados com *Eimeria sp.* dos 14 aos 21 dias de idade, empregando extrato de *Alternanthera brasiliana* na alimentação das aves. Do mesmo modo, a adição de 124 ppm de extrato de pomelo (*Citrus maxima*) na ração melhorou o peso corpóreo e o ganho de peso de frangos de corte com 42 dias de idade.

Uma vez estabelecida a concentração de piperina segura a ser adicionada a ração, 60 ppm, foi iniciado o segundo ensaio. Neste verificou-se a capacidade da piperina em reduzir ou impedir os efeitos da intoxicação prolongada por AFB<sub>1</sub>, bem como o comprometimento dos parâmetros de produção dos frangos de corte.

O metabolismo hepático tem importante papel na determinação da toxicidade das aflatoxinas, servindo como parâmetro de intoxicação. Desta forma, alterações como: aumento do tamanho e peso do fígado, alterações na coloração e no seu aspecto macroscópico e, alteração das enzimas hepáticas, são bem evidenciados em animais intoxicados (MEISSONNIER et al. 2007; YENER et al. 2009).

A concentração de 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo dos frangos de corte, administrada diariamente, por via oral, equivale à administração de 2-3 ppm de AFB<sub>1</sub> na ração. Essa quantidade de AFB<sub>1</sub> foi capaz de promover diminuição significativa do ganho médio de peso, aumento significativo do peso relativo do fígado, apresentando aspecto pálido e coloração amarelada. Espada et al. (1992), através da intoxicação oral de frangos de corte com AFB<sub>1</sub>, por 21 dias, nas doses de 0,2 µg.g<sup>-1</sup> e 3,0 µg.g<sup>-1</sup> de peso vivo também observaram alteração de coloração do fígado (coloração amarelada) e aumento significativo do peso bruto desse órgão. Da mesma forma, a alimentação de frangos de corte com 150 e 300 ppb de AFB<sub>1</sub> promoveu alterações no fígado, tornando-se mais friável, pálido e amarelado (ÖZEN et al., 2009).

Com base nestes dados foi estabelecido o valor da dose diária de 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.kg<sup>-1</sup> de peso vivo, administrado por gavagem, durante 26 dias consecutivos. Neste período foi possível observar que os frangos que receberam AFB<sub>1</sub> isolada reproduziram os achados descritos na literatura consultada. Entretanto, aqueles submetidos ao tratamento simultâneo com piperina na dose de 60 ppm, tais lesões não foram observadas. Os órgãos apresentavam aspecto macroscópico (peso, textura e coloração) idêntico ao do grupo controle sugerindo que a piperina foi capaz de minimizar os efeitos da AFB<sub>1</sub>.

Observou-se um aumento significativo de albumina sérica nos frangos intoxicados apenas com AFB<sub>1</sub>, no entanto este aumento não foi observado nas globulinas e não se refletiu na concentração de proteínas plasmáticas totais. Entretanto nas amostras do grupo que recebeu AFB<sub>1</sub> associada à piperina os valores obtidos não diferiram dos observados nos grupos controle e piperina.

Willians et al. (2004), por CLAE e EIA e Jiang et al. (2005), por RIA demonstraram que os adutos de aflatoxina- albumina possuem meia vida de 30 -60 dias e 60-90 dias, respectivamente, no organismo podendo assim refletir a exposição por um longo período após a ingestão de aflatoxina B<sub>1</sub> (GROOPMAN; KENSLER, 1999; BANDO, 2007). Eles também descreveram que as concentrações de albumina se mantêm elevadas, em função dos adutos interferirem no restabelecimento dos padrões normais. Assim, os resultados obtidos, com relação às concentrações de albumina, são sugestivos de que a piperina foi capaz de interferir na formação do aducto albumina-aflatoxina. Entretanto, Bianchi, et al. (2005), em um estudo com frangos de corte, com diferentes concentrações de AFB<sub>1</sub> e 10 mg de FB<sub>1</sub> adicionada à ração, estas associadas ou não, não observou nenhuma diferença significativa nos grupos que receberam apenas AFB<sub>1</sub>, já com a associação de 10 mg de FB<sub>1</sub> e 2,450 µg de AFB<sub>1</sub> observou-se uma diminuição de albumina sérica. Campbell et al. 1983 relatam um decréscimo de

albumina em frangos de corte que receberam ração com  $2,500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  apenas após 3 semanas. Bianchi et al. (2005) ressaltam a possibilidade das aves que recebem altas doses de AFB<sub>1</sub> associada a FB<sub>1</sub> desenvolverem uma disfunção hepática mais rápida quando comparada aos outros tratamentos.

Nos casos de aflatoxicoses, as atividades das enzimas hepáticas ALT, AST, ALP tornam-se elevadas, assim como as concentrações séricas de bilirrubinas. O aumento dos níveis da GGT sanguínea indica lesão hepática ativa, porém, níveis normais não garantem o funcionamento normal do fígado (SCHIMIDT et al., 2007).

As alterações observadas no aspecto do fígado foram confirmadas por Motta (2003) por meio da avaliação histopatológica do órgão e através do aumento das enzimas hepáticas (AST e ALP), características de intoxicação por AFB<sub>1</sub>. Sua ação sobre o fígado promove lesões extensivas nos hepatócitos, com liberação de enzimas hepáticas importantes no sangue periférico aumentando sua concentração no soro. Segundo Schmitd et al. (2007), o aumento significativo da enzima AST em aves sugere lesão hepática grave e difusa, bem como distúrbios musculares. Estes achados estão de acordo os resultados de Bintvihok et al. (2006) que observaram aumento significativo dos níveis séricos das enzimas AST e GGT em frangos de corte intoxicados com AFB<sub>1</sub> (50 e 100 ppb). Da mesma forma, Tessari et al. (2005) durante a intoxicação por AFB<sub>1</sub> ( $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de ração), por 42 dias, em frangos de corte, detectaram um aumento significativo da enzima AST.

Dados que estão de acordo com os que foram obtidos analisando as amostras dos frangos que receberam apenas AFB<sub>1</sub>, demonstraram elevação dos valores de AST e ALP. No entanto, as amostras daqueles que receberam a associação de piperina e AFB<sub>1</sub> apresentaram alteração em relação ao grupo controle e com a piperina isolada.

A GGT é outra enzima que, em nível elevado no sangue, indica lesão hepática ativa em frangos de corte. Essa elevação dos níveis sanguíneos de GGT, segundo Kaneko (1989), indicam colestase biliar e hiperplasia de ductos, alterações comprovadamente provocadas pelas aflatoxinas (BORSA et al., 1998).

Borsa et al. (1998), em seus estudos sobre a função de enzimas hepáticas na aflatoxicose aguda em frangos de corte com faixa etária entre 21 e 42 dias, verificaram que a detecção da hepatotoxicidade pode ser feita através do monitoramento dos níveis das enzimas AST e GGT no soro.

A dose de AFB<sub>1</sub> utilizada em nosso estudo foi capaz de elevar significativamente todas as enzimas citadas como parâmetros de avaliação da hepatotoxicidade para frangos de corte, confirmando as avaliações macroscópicas do órgão. Com a administração simultânea de piperina observou-se a estabilização das concentrações séricas das enzimas avaliadas próximo aos do grupo controle, dados que caracterizam a interferência da piperina no mecanismo de ação da AFB<sub>1</sub>.

O ácido úrico é o principal catabólito do metabolismo de nitrogênio este é produzido no fígado e nos rins, sendo excretado por secreção tubular e praticamente independe da reabsorção tubular de água. Embora este seja um indicador para lesões renais ele pode estar aumentado em casos de necrose tecidual, inanição por causa do metabolismo deficiente de compostos nitrogenados e dietas com alto teor protéico, como as dietas fornecidas de rotina a frangos de corte. A uréia também é produzida no fígado como subprodutos de proteínas, seu aumento pode indicar menor perfusão arterial renal. A creatina apesar de ter pouco valor diagnóstico por ser excretada pelos rins antes de ser biotransformada em creatinina, no entanto como se avaliou a creatinina juntamente com as outras enzimas de avaliação da função renal pode-se sugerir que seria um bom indicador da redução da taxa de filtração glomerular (THRALL et al., 2007).

Apesar de não se observar lesões renais nas análises histopatológicas, e verificar um aumento significativo dos biomarcadores de lesão renal (uréia, ácido úrico), bem como da

creatinina nos frangos intoxicados com AFB<sub>1</sub> pode-se sugerir uma disfunção metabólica, como a diminuição da taxa de filtração glomerular para creatinina, redução da perfusão arterial renal para uréia e redução da secreção tubular de ácido úrico.

Como a taxa de filtração glomerular em aves é mais variável que a de mamíferos em razão da filtração intermitente, que ocorre nos glomérulos de aves, a vasotocina, arginina, hormônio semelhante à vasopressina de mamíferos diminui a taxa de filtração glomerular (THRALL et al., 2007). Assim pode-se não se evidenciar lesões celulares nos tecidos renais em função de alterações fisiológicas no tecido renal ou uma disfunção severa no tecido hepático, por exemplo, onde se produz a vasopressina, uréia, ácido úrico e creatinina influenciando no aumento destes biomarcadores.

A concentração de AFB<sub>1</sub> utilizada foi capaz de promover alterações na mucosa do intestino delgado, provocando a diminuição da superfície de absorção de nutrientes em todos os segmentos do intestino delgado analisados, duodeno, jejuno e íleo.

A má absorção de alimentos é uma das características mais marcantes da aflatoxicose, diminuindo a eficiência alimentar e, conseqüentemente, aumentando os custos de produção (OSBORNE; HAMILTON, 1981).

De acordo com Daafalla et al. (1987), a administração de 0,5 ppm de aflatoxina, durante quatro semanas foi suficiente para diminuir o ganho de peso em comparação ao grupo controle. Ghosh et al. (1990) observaram que 300 ppb de AFB<sub>1</sub> em ração para frangos causava imunossupressão sem efeitos clínicos aparentes, mas poderia resultar em morbidade e/ou mortalidade, causada por infecções secundárias.

Outros parâmetros, como inibição do crescimento e da eficiência alimentar, diminuição da produção de ovos e inibição dos mecanismos de resistência da imunidade, são atribuídos à intoxicação de aves por aflatoxinas (CRUZ, 1995, ANDREATTI FILHO, 2006).

A concentração de 0,5 mg de AFB<sub>1</sub>.Kg<sup>-1</sup> de peso vivo utilizada neste ensaio foi suficiente para promover queda acentuada do desempenho neste grupo, em todas as fases de crescimento, quando comparado com os demais. O grupo de piperina associada a AFB<sub>1</sub> apresentou desempenho semelhante ao grupo controle e ao que recebeu 60 ppm de piperina adicionada à ração, mostrando a interferência positiva da piperina em inibir os efeitos tóxicos da AFB<sub>1</sub>, com melhora do desempenho dos frangos que foram intoxicados e receberam ração com 60 ppm de piperina. Quanto a conversão alimentar, a associação de piperina com AFB<sub>1</sub> manteve resultados semelhantes ao grupo controle, estes dados são importantes para a indústria avícola, onde se busca o abate em menos tempo, com maior peso e menor custo.

Com relação ao rendimento de carcaça, o grupo da AFB<sub>1</sub> foi significativamente menor do que os outros grupos avaliados. O rendimento de cortes mostrou que o grupo AFB<sub>1</sub> apresentou diminuição significativa do peso relativo da coxa quando comparado aos outros grupos, observou-se um aumento significativo no peso relativo do peito, nos grupos piperina e piperina associada a AFB<sub>1</sub>, quando comparado aos grupos controle e AFB<sub>1</sub> isolada. O peso relativo do coração diminuiu significativamente no grupo dos frangos que receberam somente AFB<sub>1</sub> e aumentou de forma significativa no grupo piperina. Já o proventriculo apresentou um aumento do peso relativo significativo no grupo AFB<sub>1</sub>, e na moela observou-se um aumento no grupo piperina associada a AFB<sub>1</sub> em relação aos outros grupos. Evidenciando assim, que piperina além de interferir na toxicidade da AFB<sub>1</sub> promoveu um aumento do peso relativo do peito e do coração.

As micotoxinas podem levar à condenação de todo o plantel na avicultura, significando um enorme prejuízo ao produtor. Os efeitos negativos das aflatoxinas estão intimamente relacionados à imunossupressão que aumenta a suscetibilidade às infecções e diminui a proteção conferida pela vacinação (GHOSH, et al., 1990; BORDIN, 1995).

Noriega, (2000) e Cardoso; Tessari (2003) ressaltam que provas hematológicas isoladas nem sempre dão informações suficientes para determinar a natureza e severidade de

um quadro clínico, por isso é importante complementar o diagnóstico paralelamente com outras avaliações, como realizado no presente estudo para verificar a toxicidade das aflatoxinas e a possível toxicidade da piperina.

A dose de AFB<sub>1</sub> empregada foi capaz de diminuir significativamente o número de leucócitos totais, devido à diminuição significativa de linfócitos e heterófilos no sangue. Estes dados estão de acordo com Tessari et al. (2008) que relataram que concentrações baixas de toxina acarretariam imunossupressão, como um sintoma subclínico, por inibição da síntese protéica e, com isso, diminuição de imunoglobulinas, e redução de linfócitos. Esta influência sobre a resposta imune pode levar a um aumento da suscetibilidade a infecções.

A AFB<sub>1</sub> promoveu o comprometimento da eritropoiese, verificado através da redução da relação PCE/NCE, e promoção de danos no DNA. Detectado a partir do primeiro período de determinação, nas primeiras 24 horas após a intoxicação.

Segundo Ribeiro (2003) a porcentagem de PCE (eritrócitos imaturos) entre o total de eritrócitos deve ser determinado a fim de se avaliar a citotoxicidade na medula óssea (ensaio feito em mamíferos). Em camundongos, a toxicidade da medula óssea está associada, geralmente, com a depressão medular de eritrócitos em torno de 80% ou mais do valor do controle. Embora não existam dados na literatura para tal análise em aves, e estimando o mesmo cálculo teríamos o que seria uma depressão medular de 73,6 % no grupo da AFB<sub>1</sub>, indicando um possível efeito tóxico medular.

Um efeito tóxico na medula pode ser avaliado pela diminuição da frequência de PCE (eritrócitos imaturos), indicando falha de produção de eritrócitos pela medula óssea. Portanto, a análise da frequência de PCE pode fornecer um parâmetro indicador de falha na produção de eritrócitos pela medula óssea (WOLF; LUEPKE, 1997).

O aumento no número de heterófilos imaturos caracteriza o desvio à esquerda. O desvio à esquerda ocorre principalmente na infecção bacteriana severa, micobacteriose, aspergilose, clamidiose e necrose tecidual severa resultante de trauma ou neoplasia. A presença de heterófilos tóxicos sugere toxemia. Quanto maior o grau de toxicidade, pior o prognóstico (FUDGE; JOSEPH, 2000, SCHIMIDT, et al. 2007)

O grau de heterófilos tóxicos pode ser estimado subjetivamente numa escala 1 a 4, conforme descrito por Thrall, et al. (2007). Em nossos estudos, foi possível observar o aumento de heterófilos tóxicos, tendo sido encontrado heterófilos tóxicos de grau 3, com grave alteração tóxica no grupo intoxicado com AFB<sub>1</sub> e de discreta alteração tóxica, grau 1, no grupo que recebeu piperina e AFB<sub>1</sub>, demonstrando que a piperina teve um efeito citoprotetor.

A formação de micronúcleos tem sido amplamente empregada na epidemiologia molecular, como um biomarcador dos danos cromossômicos e da instabilidade do genoma, sendo aplicada como teste de genotoxicidade em animais intoxicados por xenobióticos (IAMARCOVAI et al., 2007).

Micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros deixados para trás durante a anáfase. A quantificação dos micronúcleos permite a detecção de danos cromossômicos tanto por perda de cromossomos, como pela sua quebra. O teste do micronúcleo determina efeitos genotóxicos e pode ser utilizado, não somente para a detecção de danos genéticos agudos, mas também de danos crônicos (FENECH, 2000).

Segundo UDROIU (2006), a análise de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico é indicada para condições onde haja exposição crônica a um produto genotóxico. Neste sentido, a quantificação do micronúcleo em eritrócitos normocromáticos informa sobre eventos genotóxicos que ocorreram em um tempo igual ao tempo de vida dos eritrócitos circulantes. Portanto, o aumento significativo de micronúcleos, em eritrócitos



normocromáticos, no grupo de frangos de corte tratado com AFB<sub>1</sub> indica um efeito genotóxico crônico.

A intoxicação oral e diária dos frangos com AFB<sub>1</sub> foi capaz de causar danos significativos ao DNA. Tais danos ocorreram em um breve intervalo de tempo, uma vez que foi observado após 24 horas de intoxicação, e sendo detectado em 48, 72, 96 horas e 26 dias de intoxicação. A piperina adicionada à ração reduziu significativamente os efeitos genotóxicos induzidos pela AFB<sub>1</sub>.

Através da análise comparativa entre o grupo de frangos intoxicados com AFB<sub>1</sub> e o grupo de frangos intoxicados que receberam piperina adicionada na ração (piperina associada a AFB<sub>1</sub>) podemos sugerir que a AFB<sub>1</sub> provocou uma supressão da medula óssea com comprometimento da eritropoiese e dano significativo do DNA, e constatar que a concentração de 60 ppm de piperina foi capaz de reduzir ou mesmo eliminar os efeitos citotóxicos e genotóxicos da intoxicação por AFB<sub>1</sub>.

Os frangos que receberam apenas piperina apresentaram resultados semelhantes ( $p < 0,05$ ) aos frangos que foram alimentados com ração sem adição de piperina. A piperina (60 ppm) adicionada à ração de frangos de corte foi aparentemente segura, não exibindo nenhum efeito citotóxico ou genotóxico nos ensaios avaliados.

As avaliações realizadas no presente trabalho apontaram um potencial muito interessante a ser explorado em estudos posteriores. No entanto, devido aos altos coeficientes de variação frequentemente observados é importante que se utilize o maior número possível de repetições por tratamento.

## 7 CONCLUSÕES

A adição de 60 ppm de piperina na ração de frangos de corte foi segura e promoveu melhor desempenho na fase final (36-42 dias de idade).

Concentrações maiores que 60 ppm de piperina testadas provocam alterações histopatológicas e bioquímicas no tecido hepático características de intoxicação.

A concentração de 60 ppm aumentou a superfície de absorção no duodeno e no íleo.

A intoxicação prolongada dos frangos de corte com aflatoxina B<sub>1</sub> causou lesões características de aflatoxicose, como: alterações na superfície de absorção e no ganho de peso; lesões hepáticas e no intestino delgado; alterações do perfil bioquímico hepático, redução do número de leucócitos (linfócitos e heterófilos); danos ao DNA e medula óssea e diminuição dos índices de produção.

A concentração de 60 ppm na ração de frangos de corte foi capaz de melhorar o desempenho, rendimento de carcaça e de cortes de frangos intoxicados com aflatoxina B<sub>1</sub>.

A suplementação da ração com 60 ppm de piperina, fornecida diariamente aos frangos de corte, foi capaz de reduzir ou mesmo impedir os efeitos tóxicos causados pela aflatoxina B<sub>1</sub>.

A concentração de 60 ppm de piperina foi capaz de promover quimioproteção em frangos de corte intoxicados com aflatoxina B<sub>1</sub>.

.  
.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHHAB, M. A.; ALY, S. E. Antioxidants and Radical Scavenging Properties of Vegetable Extracts in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p. 2409-2414, 2003.

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 B<sub>1</sub> in rat tissue. **Cancer Letters**, v. 3, p. 195-199, 1992.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water **Mutation Research/Genetic Toxicology** , v. 343, p. 121-135, 1995.

ALTUG, T.; YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide **Journal of food protection**, v. 53, n.7, p. 581-582, 1990.

AMMAR, R. B.; SGHAIER, M. B.; BOUBAKER, J.; BHOURI, W.; NAFFETI, A.; SKANDRANI, I.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; GHEDIRAA, K.; CHEKIR-GHEDIRAA, L. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub>-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p. 1-10, 2008.

ANDREATTI- FILHO, R. L. Doenças fúngicas. **In: Andreatti Filho R.L. (Ed). Saúde Aviária e Doenças.** São Paulo: Roca. p. 236-245, 2006.

AOAC- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST – **In: Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists**, Washington, 2000.

ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; DA CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C.; GRAY, A. I. Piperdardina, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.44, n.3, p. 559-561, 1997.

ARAVIND, K. L.; PATIL, V. S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE, S. P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical, haematological parameters in broilers. **Poultry Science**, v. 82, p. 571–576, 2003.

ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M. M.; SHANG, S. B.; WICK, E. L.; WOGAN, G. N. Aflatoxin B and G. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 85, p.1706-1707, 1963.

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.

BADIALE-FURLONG, E. Toxicidade de micotoxinas: O conhecimento e sua aplicação, In: **14<sup>th</sup> National Mycotoxin Meeting**, Abstract Book p.Santa Catarina, Florianópolis, p. 90, 2010.

BADMAEV, V.; MAJEED, M.; NORKUS, E. Piperine, an alkaloid derived from black pepper increases serum response of beta-carotene during 14-days of oral beta-carotene supplementation. **Nutrition Research**, v. 19, n. 3, p. 381-388, 1999.

BADMAEV, V.; MAJEED, M.; PRAKASH, L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v.11, p. 109-113, 2000.

BAE, G. S.; KIM, M. S.; JUNG, W. S; SEO, S. W.; YUN, S. W; KIM, S. G. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, p. 154-162, 2010.

BAILEY, G. S.; WILLIAMS, D. E.; WILCOX, J. S.; LOVELAND, P. M.; COULOMBE, R. A.; HENDRICKS, J. D. Aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 1919-1926, 1988.

BAJAD, 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 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.

BANDO, E.; GONCALES, L. N.; TAMURA, N. K.; MACHINSKI, JR. M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.3, p. 175-180, 2007.

BANO, G.; RAINA, R.K.; ZUTSHI, U., BEDI, K.L.; JOHRI, R.K.; SHARMA, S.C. The effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in health volunteers **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.41, p. 615-617, 1991.

BELPAEME, K; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, n. 415. p. 167-184, 1998.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516 2003.

BEZERRA D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo

growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medicine Biology and Research**, v. 39, p. 801– 807, 2006.

BHAT, G.; CHANDRASEKHARA, N. Metabolic disposition of piperine in the rat. **Toxicology**, v. 44, p. 99-106, 1987.

BHAT, B. G.; CHANDRASEKHARA, N. Studies on the 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**, v. 84, p. 1835-1840, 2005.

BIAVATTI, M. W., BELLAVER, M. H., L. VOLPATO, C.; BELLAVER C. Preliminary studies of alternative feed additives for broilers: *Alternanthera brasiliana* extract, propolis extract and linseed oil. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v.5, :p.147-151, 2003.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, p. 1058-1075, 1987.

BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p.265–282, 2007.

BINTVIHOK, A; KOSITCHAROENKUL, S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Toxicon**, v. 47, p. 41–46, 2006.

BONSI, P.; AUGUSTI-TOCCO, G.; PALMERY, M.; GIORGI, M. Aflatoxin B<sub>1</sub> is an inhibitor of cyclic nucleotidephosphodiesterase activity, **General Pharmacology**, v. 32, p. 615-619, 1999.

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.

BORSA, A.; LOPES, S.T.A.; SANTURIO, J.M. Enzimas de função hepática na aflatoxicose aguda experimental em frangos de corte. **Ciência Rural**, v.28, p.587-590, 1998.

BRASIL, 1998. Portaria n.911, de 12 de novembro de 1998 – Dispõe sobre documentos necessários à instrução de pedidos de autorização para realização de pesquisa clínica. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.

BRASIL, 2000. Resolução-RDC n.17, de 24 de fevereiro de 2000 – Dispõe sobre registro de fitoterápicos. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.

BUENO, D. J.; SILVA, D. O.; OLIVER, G. Mycoflora in commercial pet foods. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p.741-743, 2001.

BUSBY, J; NOTELOVITZ, M.; PUTNEY, K.; GROW, T. Exercise, high-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular function in climacteric woman. **South medicine Journal**, v. 78, p. 769-763, 1985.

CABASSI, E. The immune system and exposure to xenobiotics in animals. **Veterinary Research Communications**, v.31, p. 115-120, 2007.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p. 447-459, 2002.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. N.. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, nº438. p. 155-161, 1999.

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.

CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of birds. In: THRALL, M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, p. 479-492, 2004.

CARDOSO, V. S. efeitos da piperina em frangos de corte (*Gallus gallus*) com intoxicação experimental por aflatoxinas, [Dissertação]. Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

CARDOSO, V. S.; LIMA, C. A. R.; LIMA, M. E. F.; DORNELES, L. E. G.; LEIRA FILHO, W. T; LISBOA, R. S.; GUEDES JUNIOR, D. S.; DIREITO, G. M.; DANELLI, M. G. M. Administração oral de piperina em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1521-1526, 2009.

CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and humans. In Richard J.L, Payne, G.A. (Eds.), **Council of Agricultural Science and Technology (CAST) Task Force Report No. 139**, Ames, Iowa, p. 199, 2003.

CHEN, J.; RAYMOND, K. The role of CYP3A4 and p-glycoprotein in food –drug and herb-drug interactions. **Pharmacist**, v. 25, n. 9, p. 732-738, 2006.

CLIFORD, J. I.; REES, K. R. Aflatoxin in site of action in the rat liver cell. **Nature**, v. 209, p.312-313, 1996.

COLES, E. H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ª edição, Editora Manole, São Paulo, 566p, 1984.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K. **Mycotoxins and Phytoalexins**. BocaRaton: CRC Press, p.103-143, 1991.

CRUZ, L. C. H. 2010. **Micologia Veterinária**. Editora Revinter, 2ª edição, 2010. 348 p.

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.

CUCCIOLONI, M.; MOZZICAFREDDO, M.; BAROCCI, S.; CIUTI, F.; R. E., L.; ELEUTERI, A. M.; ANGELETTI, M. Aflatoxin B<sub>1</sub> misregulates the activity of serine proteases: Possible implications in the toxicity of some mycotoxins. **Toxicology in Vitro**, v.23, n. 3, p. 393-399, 2009.

DAFALLA, R.; YAGI, A. I.; ADAM, S. E. I. Experimental aflatoxicosis in hybro-type chicks; sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. **Veterinary and Human Toxicology**, v.29, p.222–225, 1987.

DALVI, R. R.; DALVI, P. S. Differences in the effects of piperine and piperonyl butoxide on hepatic drug-metabolizing enzyme system in rats, **Drug Chemistry Toxicology**, v. 14, p.219–229, 1991

DENLI, M.; OKAN, F. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler diets. **South African Journal of Animal Science**, v. 36, p. 222–228, 2006.

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKOS, R. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 19-27, 1995.

DOGRA, R. K.; KHANNA, S; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v. 196, n. 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 (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n.2, 2003.

FADLALLA, I. M. T.; MOHAMMED, B. H.; BAKHIET, A. O. Effect of Feeding Garlic on the Performance and Immunity of Broilers. **Asian Journal Poultry Science**, v. 4; p. 182-189, 2010.

FAO- Food and Nutrition, paper 45. **World Regulation for Mycotoxins**, 1995. A compendium, Rome, 1996.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHENG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. Humn project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**. n. 534, p. 65-75p. 2003.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FOSTER, P. L., EISENSTADT, E., MILLER, J. H. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B<sub>1</sub>. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A. v. 80, n. 9, 2645–2648, 1983.

FUDGE, A. M; JOSEPH, V. Avian Complete Blood Count. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine –avian and exotic pets**; W.B. SAUNDERS, p. 19-27, 2000.

GAGINI, T. B.; SILVA, R. E.; CASTRO, I. S.; SOARES, B. A.; LIMA, M. E. F.; BRITO, M. F.; MAZUR, C.; DIREITO, G. M.; DANELLI, M. G. M. Oral administration of piperine for the control of aflatoxin intoxication in rats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.2, p. 345-348 **2010**.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals, **Revue. Médecine. Vétérinaire**. v.149, p. 549-554, 1998.

GEYIKOGLU, F.; TURKEZ, H. Protective effect of sodium selenite on genotoxicity to human whole blood culture induced by aflatoxin B<sub>1</sub>. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n. 6, p. 905-910, 2006.

GHANEM, I.; ORFI, M.; SHAMMA, M. Efeito da radiação gama na inativação de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos e ração. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 787-791, 2008.

GHOSH, R. C.; CHAUHAN, H. V. S.; JHA, G. J. Suppression of cell-mediated immunity by purified aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chicks. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 28, n.2, p.165-172, 1991.

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.

GIACOMINI, L.; FICK, F. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; RAUBER, R. H.; ALMEIDA, C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Ciência Rural**. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**. n. 518, p. 145-150, 2002.



GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. The light and the end of the tunnel for chemical-specific biomarkers: daylight or headlight? **Carcinogenesis**, v. 20, n. 1-11, 1999.

GUO, B; CHEN, Z. Y.; LEE, R. D.; SCULLY, B. T. Drought Stress and Preharvest Aflatoxin Contamination in Agricultural Commodity: Genetics, Genomics and Proteomics. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n.10, p. 1281–1291, 2008.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, PH; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.18, p. 277 – 291, 1991.

HOERR, F. J. Mycotoxins. In: CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**, Iowa: Iowa State University Press, n. 199, p. 884-915, 1991.

HUFF, W. E.; WYATT, R. D.; HAMILTON, P. B. Effects of dietary aflatoxin on certain egg yolk parameters. **Poultry Science**, n. 54, p.2014-2018, 1975.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.

IAMARCOVAI, G.; BOTTA, A.; ORSIÈRE, T. Number of centromeric signals on micronuclei and mechanisms of aneuploidy. **Toxicology Letter**, v.166, p.1-10, 2007.

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.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- In: **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2003**.

IKAN, R. In Natural Products. A Laboratory Guide 2<sup>a</sup>. ed. **New York Academic Press.**, p. 233-238, 1991.

Image J, National Institute Mental of Health - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

JAIN, N. C. Essential of Veterinary Hematology, Lea & Febiger: Philadelphia, 1993, 417 p.

JIANG, Y.; JOLLY, P. E.; ELLIS, W. O. J. S. WANG, PHILLIPS, T. D.; WILLIAMS, J. H. Aflatoxin B<sub>1</sub> albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians **International Immunology**, v.17, n.6 p. 807-814, 2005.

KANEKO, J. J. Appendixes. In: KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4<sup>a</sup>. ed. San Diego: Academic Press, 1989. p.877-901.

KARAN, R. S.; BHARGAVA, V. K.; GARG, S. K. Effect of trikatu, an Ayurvedic prescription on the pharmacokinetic profile of rifampicin in rabbits. **Journal of Ethnopharmacological**, v. 64, p. 259-264, 1999.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U.; Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: Influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. **Phytomedicine**, v. 9, p. 224-231, 2002.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U.; BEDI, K. L. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa, **Molecular Cellular Biochemistry**, v.189, p. 113–118, 1998.

KIM, J. E.; BAUER, M. M.; MENDOZA, K. M.; REED, K. M.; COULOMBE Jr. R. A. Comparative genomics identifies new alpha class genes within the avian glutathione S-transferase gene cluster. **Gene**, v. 452, p. 45-53, 2010.

KIM, S. H.; LEE, Y. C. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 353-359, 2009.

KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis** v. 16, p. 51-58, 2001.

KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MARZ, R.; SHINDLER, G.; GRAEFE, E. U.; VEIT, M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. **Planta Medica**, v. 66, p. 495-505, 2000.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gell electrophoresis. **MMS Communications**, v. 3, p. 103-115, 1995.

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 Ciência e Tecnologia Avícolas. Prêmio José Maria Lamas da Silva, supl. 3, p.82, 2001.

KOUL, I. B.; KAPIL, A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. **Planta Medica**, v.59, n.5, p. 413-417, 1993.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BAILEY, R. H.; BUCKLEY, S. A.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind<sup>TM</sup>) on mycotoxicosis in young broiler chickens. **Poultry Science**, v.77, p. 1502-1509, 1998.

KUBENA, L. F.; BAILEY, R. H.; BYRD, J. A.; YOUNG, C. R.; CORRIER, D. E.; STANKER, L. H.; ROTTINGHAUS, G. E. Cecal volatile fatty acids and broiler chick susceptibility to *Salmonella typhimurium* colonization as affected by aflatoxins and T-2 toxin. **Poultry Science**, v.80, p.411-417, 2001.

KUMAR, M. S.; LU, J.; KIM, L. M.; GOLUB, T. R.; JACKS, T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. **Nature Genetics**, v. 39, p. 673 – 677, 2007.

LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ A.J.; ROTTINGHAUS G. E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub>, in young turkey poult. **Poultry Science**. v. 75, n.12, p.1472-8, 1996.

LEE, C. S.; HAN, E. S.; KIM, Y. K. Piperine inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v.537, p.37–44, 2006.

LEESON, S., DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. University Books, Guelph, Ontario. p. 249-280, 1995.

LEGATOR, M. biological effects of aflatoxin in cell culture. **Bacteriological Reviews**, v. 30, n. 2, p. 471-477, 1966.

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

LIN, W. C.; LIAO, Y. C.; LIAU, M. C.; LII, C. K.; SHEEN, L. Y. Inhibitory effect of cda-11, a urinary preparation, on aflatoxin B<sub>1</sub>- induced oxidative stress and DNA damage in primary cultured rat hepatocytes. **Food Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 546-551, 2006.

LODER, J. W.; MOORHOUSE, A.; RUSSELL, G. B. Tumor inhibitory plants: amides of pepper *novaehollandiae*, **Australian Journal of Chemistry**, v. 22, p.1531–1538, 1969.

LUMEIJ, J. T. Avian Clinical Biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5<sup>th</sup> edition. San Diego, Academic Press, 1997. 932p.

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

MABROUK, S. S.; EL-SHAYEB, N. M. A. 1980. Inhibition of aflatoxin formation by some spices. In: Golob, P., Moss, C., Dales, M., Fidgen, A., Evans, J. & Gudrups, I. (eds.). The use of spices and medicinals as bioactive protectants for grains. FAO Agric. Serv. Bull., 137p. **Lebensm. Unters. Forsch.** v.171, p. 344-347, 1980.

MADHYASTHA, M. S.; BHAT, R. V. *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, 1984.

MALINI, T.; MANIMARAN, R. R.; ARUNAKARAN, J.; ARULDHAS, M. M.; GOVINDARAJULU, P. Effects of piperine on testis of albino rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 64, p. 218-225, 1999.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. Critérios para um bom sequestrante para micotoxinas. **In: Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 213-224, 2006.

MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; MENON, V. P.; ALIAS, L. M.; REENA, A. R. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis **Medicine Journal**, v. 50, n. 2, p.139, 2009.

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

MCCANN, J.; SPINGARN, N. E.; KOBORI, J.; AMES, B. N. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A., v. 72, p. 979-983, 1975.

MEISSONNIER, G. M.; LAFFITTE, J.; LOISEAU, N.; BENOIT, E.; RAYMOND, I.; PINTON, P.; COSSALTER, A. M.; BERTIN, G.; OSWALD, I. P.; GALTIER, P. Selective impairment of drug-metabolizing enzymes in pig liver during subchronic dietary exposure to aflatoxin B<sub>1</sub>. **Food Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2145–2154, 2007.

MERKLEY, J. W.; MAXWELL, R. J.; PHILLIPS, J. G.; HUFF, W. E. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens, **Poultry Science**, v. 66, p. 59-64, 1987.

MINAMI, L.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 207-224, 2004.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential values of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research** n.399, p.135-147, 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.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; GARASHISOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Research**, v. 418, p. 131-140, 1998.

MORAES, L. B. **Estabelecimento de escores histopatológicos de lesão hepática e determinação dos valores normais das Enzimas aspartatoaminotransferase e creatinina quinase em frangos de corte.** [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

MOTTA, V. T. Enzimas. In: **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações.** 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. p. 90-120.

MUJUMDAR, A. M.; DHULEY, J. N.; DESHMUKH, V. K., RAMAN, P. H. NAIK, S. R. Anti-inflammatory activity of piperine. **Japonise Journal of Medical and Science Biology**, v. 43, p. 95–100, 1990.

NACCI, D. F.; CAYULA, S.; JACKIM, F. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v.35, p.197-210, 1996.

NAIDU, K. A.; THIPPESWAMY, N. B. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices, **Molecular Cellular Biochemistry**, v.229, p. 9–23, 2002.

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.

NESSLANY, F.; ZENNOUCHE, N.; SIMAR-NEINTIERES, S.; TALAHARI, I.; NKILIMBOUI, E. N.; MARZIN, D. In vivo comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, **Mutation Research**, p. 28–41, 2007.

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.

OLIVEIRA, M. C.; MARQUES, R. H.; GRAVENA, R. A.; MORAES, V. M. B. Morfometria do intestino delgado de frangos tratados com dietas adicionadas de mananoglicossacarídeo e complexo enzimático. **Biotemas**, v.21, n.3, p. 135-142, 2008.

OGUZ, H.; KEÇECI, T.; BIRDANE, Y. O.; ÖNDER, F.; KURTOG, L. U. V. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 89–93, 2000.

ONO, E. Y. S.; MENDES, A. M.; MEIRELLES P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, M. A. Micotoxinas em alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.32, 2004.

ORTATALI, M., OGUZ H., Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological on broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, v. 71, n. 1, p. 59-66, 2001.

ORTATATLI, M.; OGUZ, H.; HATIPOGLU, 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 2005.

OSBORNE D. J.; HAMILTON, P. B. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. **Poultry Science**. v.60, p. 1818-1822, 1981.

OSWALD, I. P.; MARIN, D. E.; BOUHET, S.; PINTON, P.; TARANU, I.; ACCENSI, F. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n. 4, p. 354-360, 2005.

ÖZEN, H.; KARAMAN, M.; ÇIGREMIS, Y.; TUZCU, M.; ÖZCAN, K.; ERDAG, D. Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks. **Research in Veterinary Science**, v.86, p. 485–489, 2009.

PARLAT, S.S. YILDIZ, A.O.; OGUZ, H. Effects of clinoptilolite on fattening performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, v.40, p.495-500, 1999.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Comparative efficacy of piperine, curcumin and picroliv against Cd immunotoxicity in mice. **Biomedical and Life Sciences**, v. 21, n. 6 p. 649-661, 2008.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Cytoprotective and immunomodulating properties of piperine on murine splenocytes: An in vitro study. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p.160-170, 2007.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Immunomodulatory role of piperine in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p. 52–60, 2009.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Modulation of cadmium induced alterations in murine thymocytes by piperine: Oxidative stress, apoptosis, phenotyping and blastogenesis. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 486 – 497, 2006.

PEI, Y. Q. A review of pharmacology and clinical use of piperine and its derivatives. **Epilepsia**, v.24, n.2, p.177-182, 1983.

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.

PINTO, L. R. F.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. IN: RIBEIRO, L. R.; SALVATORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**, 1ª ed., 2003, 356p.

PITT, I. J. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p. 184-192, 2000.

PÓVOA, H. C. C. **Efeito da talidomida e da pentoxifilina na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e gama inteferon (INF- $\gamma$ ) na carcinogênese mamária em ratas wistar.** [Dissertação] Universidade Federal Fluminense, Niterói 2008. 94p.

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.

PRASAD, N. S.; RAGHAVENDRA, R.; LOKESH B. R.; AKHILENDER NAIDU, K.A. K. Spice phenolics inhibit human PMNL5-lipoxygenase. **Prostaglandins, Leukotrienes. Essential Fatty Acids**, v. 70, p. 521–528, 2004.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A. G.; REYES, 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: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology** v. 125, p. 265-272, 2000.

RAUBER, R. H.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L.Z.; ARAUJO DE ALMEIDA, C. A.; MALLMANN, C. A. Performance of turkey poult fed different doses of aflatoxins in the diet. **Poultry Science**, v. 86, p. 1620–1624, 2007.

RAUSCHER, F. M.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Biochemistry and Molecular Toxicology**, v. 14, p. 329–334, 2000.

RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE Jr., R. Aflatoxin B<sub>1</sub> in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, In Press, Corrected Proof, Available online 11 May 2010.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. **Biology Chemistry**, v. 387, n.1, p. 87-93, 2006.

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.

REEN, R. K.; JAMWAL, D. S.; TANEJA, S. C.; KOUL, J. L.; DUBEY, R. K.; WIEBEL, F. J.; SINGH, J. Impairment of UDP-glucose dehydrogenase and glucuronidation activities in liver and small intestine of rat and guinea pig *in vitro* by piperine, **Biochemical Pharmacology**, v.46, p.229–238, 1993.

REEN, R. K.; SINGH, J. *In vitro* and *in vivo* inhibition of pulmonary cytochrome P450 activities by piperine, a major ingredient of piper species, **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 29: p.568–573,1991.

REEN, R. K.; ROESCH, S. F.; KIEFER, F.; 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.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. In: **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA. Canoas-RS., p. 247-271, 2003, 356p.

RIBEIRO, T. S.; LIMA, L. F.; PREVIATO, J. O.; PREVIATO, L. M.; HEISE, N.; LIMA, M. L. F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 3555-3558, 2004.

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

ROSMANINHO, J. F., OLIVEIRA, C. A. F., BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das Micotoxicoses Crônicas na Produção Avícola. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.2, p.107-114, jul./dez., 2001.

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

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SABINA, E. P.; NAGAR, S.; RASOOL, M. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation-an experimental model of gouty arthritis. **Inflammation, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.971-976, 2010.

SABINO, M. **Aflatoxinas B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> e Aflatoxicol: extração, caracterização em tecidos e urina**, [Tese]. Ciências do Alimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1990.

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.

SALWA, A. A.; ANWER, W. Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of aflatoxin B<sub>1</sub> residues in table eggs. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, p.181-186, 2009.

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



SANTURIO, J. M. Micotoxicoses e micotoxinas na avicultur. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n. 1, p. 1-12, 2000.

SCHAEFFER, J. L.; HAMILTON, P. B. Interactions of mycotoxins with feed ingredients. Do safe levels exist? In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S., **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Raton, FL, p.827-43, 1991.

SCHMITD, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILO, A. C. Patologia clínica em aves de produção- uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola-Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clinica Chimica Acta**, v. 350, p. 73–78, 2004.

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

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Oral supplementation of piperine leads to altered phase II enzymes and reduced DNA damage and DNA-protein cross links in benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.268, n.1-2, p.141-147, 2005a.

SELVENDIRAN, K.; THIRUNAVUKKARASU, C.; SINGH, J. P.; PADMAVATHI, R.; SAKTHISEKARAN, D. Chemopreventive effect of piperine on mitochondrial TCA cycles and phase-I and GSH-metabolizing enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 271, n. 1-2, p. 101-106, 2005 b.

SHEN, H.; SHI, C.; SHEN, Y.; ONG, C. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B<sub>1</sub>. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 2, p.139-146, 1996.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P.S.S.R. Influence of piperine on pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v. 64, p. 353-356, 1998.

SIDDIQUI, B. S. et al. An amide from fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v.45, v.8, p. 1617-1619, 1997

SINGH, J.; DUBEY, R. K.; ATAL, C. K. Piperine-mediated inhibition of glucuronidation activity in isolated epithelial cells of the guinea-pig small intestine: evidence that piperine lowers the endogenous UDP-glucuronic acid content. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 236, p.488–493, 1986.

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

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, n. 175. p. 184-191. 1988.

SINGH, Y. N. Kava an overview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p.18-45, 1992.

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.

SOTOMAYOR, R. E.; WASHINGTON, M.; NGUYEN, L.; NYANG'ANYI, R.; HINTON, D. M.; CHOU, M. Effects of Intermittent Exposure to Aflatoxin B1 on DNA and RNA Adduct Formation in Rat Liver: Dose-Response and Temporal Patterns. **Toxicological Sciences**, v.73, p. 329–338, 2003.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, p. 87-93, v. 605, 2006.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 735–748, 2007.

STICH, H. F.; SAN, R. H.; ROSIN, M. P. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus test to human cell suspensions and exfoliated cells. **American New York Academic Science**, 407, p. 93-105, 1983.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn.and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p 339–346, 2004.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Tissue distribution and elimination of capsaicin, piperine and curcumin following oral intake in rats. **Journal of Medicine Research**, v. 131, p. 682-691, 2010.

TESSARI, E. N. C; CARDOSO, A. L. S. P. Aflatoxina em frangos de corte. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_3/aflatoxina/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/aflatoxina/index.htm)>.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B<sub>1</sub> e fumonisina B<sub>1</sub>. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, Santa Maria, June, 2006.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G.E. Efeitos da aflatoxina B<sub>1</sub> e fumonisina B<sub>1</sub> sobre os níveis séricos de Aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.2, p.185-189, 2005.

THRALL, M. A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Veterinária**, 1ª edição, Editora ROCA, 2007. 592p.

THRALL, M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 2004. 518p.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n. 35, p. 206-21, 2000.

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.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 201-204, 2006.

UNNIKRISHNAN, M. C.; KUTTAN, R. Tumor reducing and anticarcinogenic activity of selected spices, **Cancer Letters**, v.51, p.85-89, 1990.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E., Review article Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, **Environmental Toxicology Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, p. 57-149, 2003.

VIJAYAKUMAR, R. S.; SURYA, D.; NALINI, N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress, **Redox Report**, v. 9, p. 105-110, 2004.

VIRINDER, S. P.; SUBASH, C. J.; KIRPAL, S. B.; RAJANI, J. Phytochemistry of genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, p.597-673, 1997.

WANG, J.; GROOPMAN, J.D. DNA damage by mycotoxins. **Mutation Research**, v.424, p.167-181, 1999.

WILD, C. O.; TURNER, P. C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenese**, v. 17, n. 6, p. 471-481, 2002.

WILD, C. P.; Dietary intake of aflatoxins and the level of albumin-bound aflatoxin in peritpheral blood in The Gambia, West. Africa. **Cancer Epidemiology Biomarkers Previews**, v. 1, n. 3, p. 229-234, 1992.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n.5, p. 1106-1122, 2004.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of eritrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica. Internationales Magazin fur Slutforschung**, Leipzig, v. 51, p. 31, 1933.

WOLF, T; LUEPKE, N. P. Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of Genotoxicity, **Mutation Research**, v.394, p 163–175,1997.

WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH, J. E.; HENDERSON R.S., ed. **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Raton, FL., p. 553-605 1991.

YENER, Z.; CELIK, I.; ILHAN, F.; BAL, R. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 418–424, 2009.

YOO, S. A.; YOON, H. J.; KIM, H. S.; CHAE, C.B.; FALCO, S.; CHO, C. S.; KIM, W. U. Role of placenta growth factor and its receptor flt-1 in rheumatoid inflammation: A link between angiogenesis and inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v.60, p. 345-354, 2009.

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIEMAN, W. C.; BENNETT, J. W. Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases **Revista Iberoamericana de Micologia** v. 22, p.194-202, 2005.

ZIRINGUE-JUNIOR, H. J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. C15H24 volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of Aspergillus flavus. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2264-2270, 1993.

## ANEXO 1

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

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

## ANEXO 2

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

<i>Solução de Natt e Herrick</i>	
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>	7,3

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).