



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

# Efeito da Mono-Semi-Carbazona do Adrenocromo sobre o Metabolismo de Frangos de Corte

JOSÉ LUCIANO ANDRIGUETTO

Tese apresentada à Universidade Federal  
do Paraná para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Veterinárias.

CURITIBA  
1 9 8 9

*A meus pais e meu irmão.*

**AGRADECIMENTOS**

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e Orientador Prof. Dr. Metry Bacila por sua inestimável orientação.

Ao Prof. Dr. Luimar Perly, pela orientação inicial e eterna disposição.

Ao Prof. Dr. Pedro Hélio Lucchiari, do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, pela orientação, fundamental ao trabalho aqui apresentado, na técnica polarográfica, e pela generosa hospitalidade em Botucatu.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clotilde Lourdes Branco Germiniani, membro da banca examinadora, pela revisão crítica do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, através da Coordenadoria de Zootecnia e Veterinária, pelos recursos financeiros fornecidos.

A João Gilberto Biora, do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia, pelo grande auxílio nos trabalhos com as aves.

Ao pessoal do Laboratório SUREHMA/UFPr (Helena, Kátia, Marvina, Thalma, Lotte) pelo auxílio nos experimentos laboratoriais e pelo ambiente de trabalho, e a Tânia M. Schrank, secretária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Aos amigos, muitos para serem nominados, pelo constante apoio.

A meu irmão Milton, pela orientação em vários pontos do trabalho e pela amizade irrestrita; e a meus pais, Mariza e Milton, por constante amor, compreensão e estímulo.

## CONTEUDO

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAL E METODOS.....	12
2.1. Material biológico.....	12
2.2. Acondicionamento das aves.....	12
2.3. Administração da MSCA por via intramuscular.....	14
2.4. Administração da MSCA através da água.....	14
2.5. Administração da MSCA através da ração.....	15
2.6. Alimentação das aves.....	16
2.7. Métodos para estudo de atividade respiratória....	17
2.7.1. Preparação de mitocôndria hepática e de músculo cardíaco.....	17
2.7.2. Técnica de respirometria de Warburg.....	18
2.7.3. Medida polarográfica de consumo de oxigênio.....	21
2.8. Determinação do efeito da MSCA sobre a turbidez de uma suspensão de mitocôndria.....	24
2.9. Métodos analíticos.....	25
2.9.1. Determinação de proteína.....	25
2.9.2. Parâmetros físico-químicos da MSCA.....	26
2.10. Equipamentos.....	27
2.11. Reagentes.....	27

III. RESULTADOS.....	28
3.1. Efeito da MSCA sobre o desempenho produtivo de frangos de corte.....	28
3.1.1. Administração por via intramuscular.....	28
3.1.2. Administração através da água.....	29
3.1.3. Administração através da ração.....	32
3.2. Efeito da MSCA sobre a atividade respiratória da mitocôndria.....	39
3.2.1. Estudos por respirometria com a técnica de Warburg.....	39
3.2.1.1. Fígado.....	39
3.2.1.2. Músculo cardíaco.....	41
3.2.2. Estudos por respirometria pela técnica polarográfica.....	42
3.2.2.1. Fígado.....	42
3.2.2.2. Músculo cardíaco.....	44
3.3. Parâmetros físico-químicos da MSCA.....	46
3.4. Efeito da MSCA sobre a turbidez de uma suspensão de mitocôndria.....	47
IV. DISCUSSÃO.....	50
V. SUMARIO E ABSTRACT.....	62
VI. CONCLUSOES.....	66
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	70

## I. INTRODUÇÃO

O adrenocromo constitui o produto da oxidação e da ciclização da adrenalina, e foi identificado inicialmente por KISCH, em 1927. Estudando a oxidação de aminoácidos catalisada pela adrenalina, KISCH observou que este efeito não era devido à adrenalina propriamente dita, mas ao produto de sua oxidação, uma quinona de coloração vermelha, que Kisch denominou de Omega (KISCH, 1947).

A denominação de adrenocromo foi proposta por GREEN & RICHTER, em 1937. Estes autores estudaram o efeito catalisador da adrenalina sobre os sistemas das desidrogenases dos ácidos málico e láctico isoladas de músculo cardíaco e observaram que ela só exercia seu efeito após sua oxidação, o que levava à produção do adrenocromo. GREEN & RICHTER (1937) demonstraram então que, constituindo um sistema redox, o adrenocromo aumentava o "turnover" dos sistemas enzimáticos daquelas desidrogenases.

GREEN & RICHTER (1937) demonstraram ainda que a adrenalina é facilmente oxidada à adrenocromo por vários componentes químicos e enzimáticos, destacando-se o sistema da citocromo-indofenol oxidase, presente em todos os tecidos.

KISCH (1947), em extensa revisão sumarizou os efeitos bioquímicos do adrenocromo, mencionando sua atividade

como catalisador da oxidação da adrenalina, do sistema da desidrogenase dos ácidos láctico e málico, e da desaminação e da descarboxilação de aminoácidos.

O adrenocromo foi inicialmente descrito como uma o-quinona (Figura 1.A), constituindo um sistema redox de dois elétrons (GREEN & RICHTER, 1937; WIESNER, 1942 e KISCH, 1947). Porém mais tarde, considerando suas propriedades físico-químicas, verificou-se que a estrutura molecular do adrenocromo é a de um ion anfótero p-quinonaimina, constituindo um sistema redox de um elétron (Figura 1.B) (HARLEY-MASON, 1948; KOELLE e FRIEDENWALD, 1951; SOBOTKA et alli, 1957 e HEACOCK, 1959). Atualmente, o adrenocromo é aceito como um ion anfótero pertencente ao grupo das 2,3-dihidroindol-5,6-quinonas, resultante da oxidação da adrenalina por quatro elétrons (PRABHANANDA et alli, 1985).

A oxidação da adrenalina *in vitro*, por uma série de agentes físicos e químicos, levando à produção de adrenocromo, entre outros produtos da sua oxidação, foi demonstrada por diversos autores (GREEN & RICHTER, 1937; MARQUARDT, 1947; KISCH, 1947; FRIEDENWALD et alli, 1951; SOBOTKA, 1957; HEACOCK, 1959; KALYANARAMAN et alli, 1984). Porém a demonstração da ocorrência de vias metabólicas que levassem à produção do adrenocromo *in vivo* só foi realizada mais tarde, pois a grande reatividade desse composto dificultou sua identificação no meio biológico. WAJZER (in HOFFER, 1957) reporta a existência do sistema adrenalina-adrenocromo em músculo esquelético de mamífero em concentração de  $10^{-7}M$ . AXELROD (1964) demonstrou a presença de uma catecol oxidase na glândula salivar do gato, capaz de



produzir adrenocromo a partir de adrenalina, porém animais que receberam adrenalina injetada diretamente na artéria carótida não apresentaram, após cinco minutos, quantidades consideráveis de adrenocromo. Em 1968, HEGEDUS & ALTSCHULE demonstraram que adrenalina incubada em plasma humano transformava-se em adrenocromo, adrenolutina e finalmente num composto de estrutura não identificada, porém semelhante à melanina. Mais recentemente, GUARNIERI et alli (1985) demonstraram a capacidade do sarcolema de bovino de sintetizar adrenocromo a partir de adrenalina, em reação dependente de  $O_2$  e catalisada pelo ácido araquidônico. Também MATTHEWS et alli (1985) demonstraram que os leucócitos polimorfonucleares apresentam um mecanismo de oxidação da adrenalina via adrenocromo, responsável pelo catabolismo de 80% da adrenalina presente no sistema.

Quanto ao catabolismo do adrenocromo, sua oxidação *in vitro* leva ao surgimento de dois produtos, o 5,6-dihidroxi-N-metilindoxil ou adrenolutina e o 5,6-dihidroxi-N-metilindol (HARLEY-MASON, 1948; HEACOCK, 1959) (Figura 2). Aparentemente os mesmos produtos resultam do catabolismo *in vivo*. NOVAL et alli (1961), trabalhando com injeção de adrenocromo em animais experimentais, observou o surgimento de três metabólitos diferentes na urina desses animais. Estes metabólitos foram identificados como um conjugado de adrenolutina com sulfato, um conjugado de 5,6-dihidroxi-N-metilindol com sulfato e o terceiro parece também ser um conjugado de 5,6-dihidroxi-N-metilindol. FISCHER & LECOMTE (in NOVAL et alli, 1961) reportam ainda a excreção de adrenocromo inalterado na urina de cães e gatos.

A estrutura molecular do adrenocromo também permite a formação de radicais livres semi-quinona, com potencial citotóxico, responsável por sua atividade anti-tumores e pelo efeito de necrose do miocárdio, o que ocorreria pela redução do adrenocromo na posição 5, catalisada por várias flavoenzimas, incluindo a enzima microsossomal NADPH-citocromo P-450 redutase. Esta forma reduzida poderia ser suficientemente estável para penetrar no núcleo celular e provocar a destruição do DNA. Porém sabe-se que esta forma é altamente reativa e tende a desaparecer por interação mútua, interação com outros constituintes celulares ou por transferir um elétron ao oxigênio molecular formando o ânion superóxido (SVINGEN & POWIS, 1981; PRABHANANDA et alli, 1985).

Sendo um derivado da adrenalina e um contaminante freqüente em soluções desse agente simpaticomimético, o adrenocromo teve seus efeitos fisiológicos extensamente estudados. SOBOTKA et alli (1957) já mencionam que não se poderia excluir a possibilidade de que o adrenocromo constituísse um membro de uma cadeia metabólica normal e além disso tivesse alguma função metabólica específica, pois o adrenocromo introduzido no organismo como agente farmacológico, é efetivo em quantidades inferiores à miligrama, tal qual pode ser formado como um intermediário efêmero no catabolismo das catecolaminas.

KISCH (1947) menciona que a quinona derivada da oxidação da adrenalina não apresentou efeito sobre a pressão sanguínea, sobre glicosúria ou efeito similar ao estímulo de fibras nervosas simpáticas, porém parece inibir a

acetilcolinesterase. SOBOTKA et alli (1957) mencionam um efeito de redução da pressão arterial em ratos artificialmente hipertensos, porém afirmam que este efeito inexistente em animais normais. A ausência de efeito sobre a glicemia, de forma similar à da insulina ou antagônica à da adrenalina, foi demonstrada por SNYDER et alli (1947). INGLE et alli (1948) demonstraram reduzido efeito do adrenocromo sobre a glicosúria de ratos diabéticos, efeito esse que se mostrou relacionado a uma diminuição na ingestão de alimento. Uma poderosa ação hemostática foi descrita por DEROUAUX (1939), ROSKAM & DEROUAUX (1944) e confirmada por PREVOST et alli (1947). SOBOTKA et alli (1957) mencionam que esta ação se deve a um aumento da resistência da parede dos capilares, sem que haja alteração no mecanismo de coagulação. HOFFER (1957) sugere uma possível influência da produção de níveis elevados de adrenocromo no organismo e o desenvolvimento de esquizofrenia. Menciona ainda uma alteração característica no padrão de construção de teias de aranhas tratadas com adrenocromo. BULLOUGH (in HOFFER, 1957) descreve uma atividade antimitótica do adrenocromo, tanto *in vivo* como *in vitro*. HEACOCK (1959) menciona ainda atividades anti-hialuronidase e semelhante à do ACTH.

Efeitos importantes sobre a atividade cardíaca também têm sido relatados. KISCH (1947) já menciona uma redução na frequência cardíaca e na contratilidade do miocárdio, bem como retardo na condutividade átrio-ventricular. Atualmente vários autores confirmam o efeito inotrópico negativo (redução na contratilidade) e incluem uma ação de necrose do miocárdio (SINGAL et alli, 1982; MATTHEWS et alli, 1985). Porém WHEATLEY

et alli (1985) citam que esses efeitos, bem como vasoconstrição arterial coronária, só ocorrem em concentrações de adrenocromo superiores a  $10^{-4}M$ , tendo então significado patofisiológico questionável.

No que diz respeito a possíveis interferências sobre o metabolismo celular, a primeira observação pertinente é de GREEN & RICHTER (1937), demonstrando um efeito catalisador sobre os sistemas das desidrogenases dos ácidos málico e láctico, isoladas do músculo cardíaco do porco. Afirmam que o adrenocromo é um eficiente carreador de hidrogênio em concentrações de  $6 \times 10^{-7}M$ . KISCH, em sua revisão de 1947, menciona um efeito catalisador da oxidação em vários tecidos e células, especialmente fígado e rins, onde tal efeito está provavelmente ligado ao catabolismo de aminoácidos. Também cita que outros processos onde ocorre consumo de oxigênio são igualmente catalisados. RANDALL (1946) e MEYERHOF & RANDALL (1948), estudando a glicólise anaeróbica do cérebro de rato, observaram um efeito inibitório do adrenocromo sobre a hexoquinase e a fosfohexoquinase. WOODFORD (in HOFFER, 1957) afirma que o adrenocromo inibe o metabolismo aeróbico da glicose, do piruvato, do succinato e do malato, em estudos *in vitro* de metabolismo cerebral. HOFFER (1957) descreve um efeito de redução de ganho de peso em ratos albinos e a existência de propriedades semelhantes às da auxina. SOBOTKA et alli (1957) relatam ainda um efeito inibitório sobre a tirosinase e inibição completa da hidrólise do glicerofosfato pela fosfatase sérica. Mais recentemente, PAINE & MCLEAN (1974) demonstraram um aumento na atividade da aril-hidrocarbono hidroxilase em cultivo de células de fígado de rato.

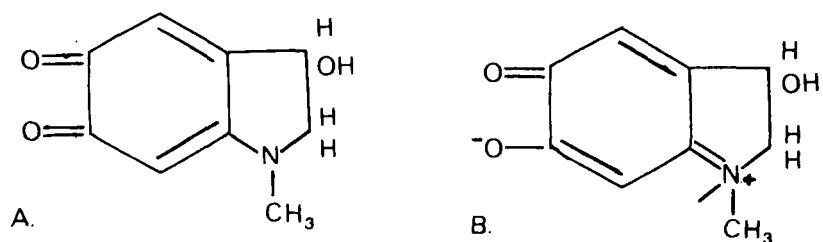


Figura 1. Fórmula estrutural do adrenocromo. A: N-metil-2:3-dihidro-3-hidroxiindol-5:6-quinona. B: p-quinonaimina - ion anfótero.

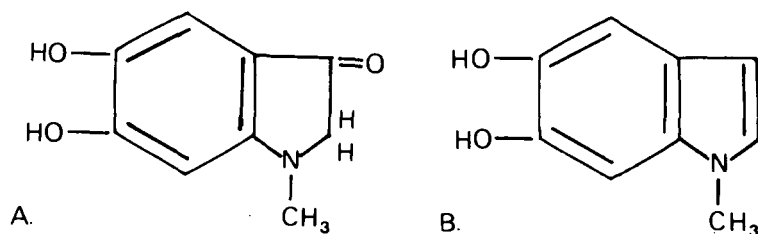


Figura 2. Produtos do catabolismo do adrenocromo: A: adrenolutino; B: 5,6-dihidroxi-N-metilindol.

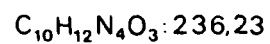
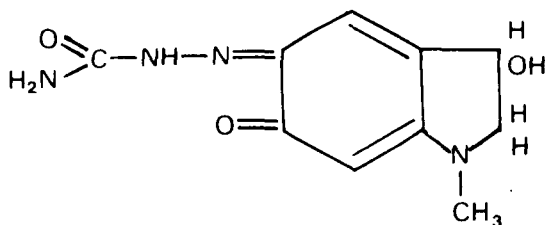


Figura 3. Fórmula estrutural da mono-semicarbazona do adrenocromo.

Atualmente, com a verificação da ocorrência de radicais livres formados a partir da redução do adrenocromo, outros efeitos têm sido relatados. PRABHANANDA et alli (1985) mencionam uma ação citotóxica, potencial atividade antitumor e promoção de necrose de miocárdio. Esses efeitos seriam devidos à peroxidação dos fosfolipídios das membranas pelos radicais livres, o que levaria a alterações na permeabilidade bem como a uma sobrecarga intracelular de cálcio. Esta levaria a célula a uma depleção de ligações fosfato de alta energia, por ativar as ATPases cálcio-dependentes e por comprometer o metabolismo energético mitocondrial. Esta depleção levaria à necrose celular. Foi demonstrado que este efeito pode ser minimizado pelo tratamento dos animais experimentais com vitamina E e zinco, que apresentam reconhecida ação antioxidante e protetora de membranas (SINGAL et alli, 1982).

Devido à grande instabilidade da molécula do adrenocromo, sua aplicação prática só é possível após a estabilização, por bloqueio da função quinona, na posição 5, por reação com uma semi-carbazida, resultando na mono-semi-carbazona do adrenocromo (MSCA) (Figura 3). Esta tem sido usada na terapêutica humana desde 1957, por via intramuscular, associada ao ácido salicílico, para aumentar sua solubilidade. Apresenta-se estável por pelo menos cinco anos (SOBOTKA et alli, 1957).

A MSCA é totalmente desprovida de qualquer ação simpaticomimética sobre o coração e sobre a musculatura lisa (BACQ, 1947); porém possui acentuado efeito hemostático, aumentando a resistência capilar (PREVOST et alli, 1947; HAGERTY et alli, 1951; STANGL, 1951). STANGL (1951) descreve ainda uma

redução na permeabilidade capilar e um efeito dinamogênico, favorecendo a contração muscular através de catalisação dos processos de óxido-redução, inibição da glicólise, estímulo da oxidação do ácido láctico e aceleração da síntese do glicogênio. Estes efeitos surgiram após a administração da MSCA tanto por via oral como parenteral. HOFFER (1957) cita que a MSCA não tem efeito específico sobre o padrão de construção da teia de aranha e se apresenta inerte em relação ao metabolismo cerebral *in vitro*. FISCHER & LECOMTE (in HOFFER, 1957) observaram que a MSCA não é hidrolisada a adrenocromo no organismo, cerca de um quarto da quantidade aplicada sendo excretado inalterado.

No que diz respeito a estudos dos efeitos do adrenocromo ou seus derivados estáveis em frangos de corte, a bibliografia disponível é extremamente restrita. JANATOVA et alli (1986), estudando os efeitos da isoprenalina oxidada e adrenocromo comercial sobre o coração do embrião de pinto observaram que o adrenocromo não apresenta qualquer efeito, ao contrário do observado com a isoprenalina intacta e oxidada, e do observado em outras espécies.

CUNNINGHAM (1963) estudou o desenvolvimento e a composição da carcaça de frangos de corte tratados com adrenalina e noradrenalina, por via parenteral, e nicotina, por via oral. Observou que doses baixas de adrenalina (0,02 e 0,10 mg/kg de peso vivo) levaram a pequenos aumentos na taxa de crescimento, enquanto noradrenalina e níveis mais altos de adrenalina (0,2 e 0,5 mg/kg de peso vivo) provocaram reduções na taxa de ganho. Nicotina, em doses de 2,5 e 5,0 mg/kg de ração produziu significativo aumento na taxa de crescimento sem

alterar a composição da carcaça. DENBOW et alli (1981) testando a resposta de frangos de corte, em termos de ingestão de água e alimento e variação da temperatura corporal, frente à injeção intraventricular de catecolaminas, observaram que a adrenalina provocou um aumento na ingestão de alimentos e uma redução na temperatura corporal. Mencionam ainda que as catecolaminas são encontradas em altas concentrações no sistema nervoso central das aves.

Em vista do que foi descrito inicialmente, permanece a dúvida de que esses efeitos sejam decorrentes da adrenalina propriamente dita ou de um produto de seu catabolismo, como por exemplo o adrenocromo.

Um fator importante considerado na decisão por realizar este trabalho é o estágio atual em que se encontra a produção de frangos de corte. O melhoramento genético realizado nesta espécie levou a grande aumento na eficiência alimentar. Em 1934, as aves eram abatidas com 95 dias, 1300g de peso e uma conversão alimentar de 4,30. Atualmente o abate é realizado aos 47 dias, com aves pesando 1890g e conversão alimentar de 1,96. Para 1994 espera-se produzir aves de 2050 g aos 42 dias e conversão alimentar de 1,82 (WABECK, 1987). Porém a estrutura anatômica das aves não foi grandemente alterada, resultando em reduzida capacidade cardíaco-respiratória e digestiva frente a uma grande demanda metabólica. Isso cria dificuldades em termos da concentração de nutrientes na dieta fornecida a essas aves, principalmente no que diz respeito ao aporte energético. Outro fator que evidencia essa limitação metabólica ao avanço na performance do frango de corte é a ocorrência, atualmente, do



síndrome da morte súbita e do síndrome ascítico. Observa-se então a necessidade de uma otimização no comportamento metabólico dessas aves, de modo a viabilizar seu melhoramento futuro, com vistas a atender à crescente demanda de proteína de origem animal.

Considerando então o efeito que a mono-semi-carbazona do adrenocromo exerce sobre várias reações metabólicas, em especial aquelas relacionadas com o metabolismo energético, e seus efeitos farmacológicos, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre o metabolismo de frangos de corte, avaliado em termos de performance produtiva e atividade mitocondrial.

## II. MATERIAL E METODOS

**2.1. Material biológico:** as aves utilizadas nos experimentos para verificação do efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo *in vivo*, bem como aquelas das quais foi coletado o material para a preparação de suspensões de mitocôndria, foram frangos de corte de linhagens comerciais, adquiridos à idade de um dia, junto à Cooperativa Agropecuária Batavo, situada na cidade de Carambei, distante aproximadamente 120 km de Curitiba. Todas as aves utilizadas eram da linhagem Hubbard, com exceção das fêmeas que receberam a droga via água de bebida, que pertenciam à linhagem Ross.

**2.2. Acondicionamento das aves:** nos testes em que o produto foi administrado por via intramuscular e através da água de bebida, as aves permaneceram em gaiolas durante todo o período. As gaiolas utilizadas nestes testes são confeccionadas em ferro revestido com zinco, com 50 cm de frente por 45 cm de profundidade e 53 cm de altura. São construídas com barras transversais de 0,5cm de espessura e vão de 2,0 cm. A face superior é fixada com dobradiças, representando a porta da gaiola. Nas paredes frontais, barras fixas são intercaladas com barras móveis, as quais podem ser suspensas de modo a permitir o acesso da cabeça da ave ao comedouro e ao bebedouro definitivos,

ambos externos e situados em faces opostas. Estes equipamentos são constituídos por calhas de PVC e são utilizados a partir do 21º dia de vida das aves. Até este dia são empregados comedouros e bebedouros iniciais internos. O comedouro inicial é do tipo copo, com capacidade para aproximadamente 450g de ração e o bebedouro é do tipo garrafa, de aproximadamente 350 ml, ambos de plástico. São colocados sobre o piso, tipo gaveta de metal forrada com maravalha de pinho. Como fontes de calor são empregadas lâmpadas incandescentes de 60 watts, de altura regulável, uma para cada gaiola. As gaiolas foram dispostas em três filas, apoiadas sobre cavaletes de madeira, em uma sala de 4,70m de largura por 10,30m de comprimento e 2,70m de altura, com ventilação natural, através de quatro janelas. Após o desligamento das lâmpadas de aquecimento, as aves foram mantidas em regime de 24 horas de luz, provida por 12 lâmpadas fluorescentes de 60 watts.

Quando da administração da droga através da ração, as aves foram alojadas no galpão experimental da Estação Experimental do Canguiri, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. Este galpão mede 8m de largura por 66m de comprimento e é subdividido em 36 boxes de 3,50m por 3m, previstos para uma capacidade de 100 aves, em uma densidade aproximada de 10 aves por metro quadrado. Neste teste não foram utilizados os quatro boxes dos cantos. As aves foram criadas por um período de 42 dias. Na fase inicial foram utilizadas campânulas à gás, círculos de proteção de eucatex, comedouros tipo bandeja e bebedouros tipo copo. Na sequência foram utilizados comedouros tubulares e bebedouros pendulares, em

número suficiente. No sétimo dia, as aves foram vacinadas contra doença de Newcastle e Bronquite infecciosa, por via ocular.

**2.3. Administração da mono-semi-carbazona do adrenocromo por via intra-muscular:** o primeiro teste *in vivo* consistiu na aplicação da mono-semi-carbazona do adrenocromo em solução aquosa por via intra-muscular, na musculatura peitoral, a intervalos de cinco dias, sendo a primeira aplicação no primeiro dia de vida. O delineamento experimental adotado foi do tipo completamente casualizado, sendo as aves distribuídas em quatro grupos, cada um formado por seis machos e seis fêmeas, alojadas duas a duas em gaiolas e distribuídas aleatoriamente. Um grupo serviu de testemunha, recebendo injeções placebo de solução fisiológica estéril, enquanto em cada um dos outros três grupos foi aplicada uma dose diferente da droga. As doses testadas foram 0,035 mg/kg de peso vivo; 0,070 mg/kg e 0,105 mg/kg. As aves foram pesadas nos dias de aplicação e as doses calculadas com base no peso médio do grupo. O período de vida foi de 42 dias, sendo a última aplicação feita aos 35 dias de vida. Os resultados foram estatisticamente avaliados por análise de variância e teste de Tukey. Neste caso foi considerado apenas o peso médio final.

**2.4. Administração da mono-semi-carbazona do adrenocromo através da água:** o segundo teste *in vivo* consistiu na administração via água de bebida da MSCA. Neste experimento, machos e fêmeas foram testados em ocasiões diferentes, mas com delineamentos iguais, do tipo completamente casualizado. Foram utilizados

quatro grupos de nove aves cada um, alojadas individualmente em gaiolas, em distribuição aleatória. Como veículo para a mono-semi-carbazona do adrenocromo foi utilizada a dextrose, na proporção de 1,17g de MSCA para 998,83g de dextrose. O grupo testemunha recebeu 0,5g de dextrose pura por litro de água enquanto os três grupos-teste receberam 0,5g ; 1,0g; e 2,0g da mistura dextrose/adrenocromo por litro de água respectivamente. As aves foram pesadas semanalmente até o 42º dia.

A avaliação estatística dos resultados foi feita através de análise de variância e teste de Tukey. As variáveis consideradas foram o peso médio aos 21 e aos 42 dias; o ganho de peso diário de 0 a 21 dias, de 21 a 42 dias e de 0 a 42 dias; e a conversão alimentar de 21 a 42 dias. O ganho de peso diário foi calculado subtraindo o peso inicial do peso final e dividindo o resultado pelo período considerado; a conversão alimentar foi calculada dividindo a quantidade de ração consumida pelo peso ganho, representando então a quantidade de ração necessária para que ave ganhe um quilograma de peso vivo. Não foi considerada a conversão alimentar da primeira fase pelo fato de os comedouros iniciais permitirem grande desperdício de ração, sobretudo entre 15 e 21 dias.

**2.5. Administração da mono-semi-carbazona do adrenocromo através da ração:** no terceiro teste *in vivo* a MSCA foi acrescentada à ração, na forma de uma premistura composta de 2,55g de mono-semi-carbazona do adrenocromo e 997,45g de farelo de milho (Famyl). Foram testados três níveis da droga, correspondentes ao acréscimo de 0,5kg; 1,0kg e 2,0kg de premistura por tonelada de

ração, o que equivale a 1,275 ppm, 2,550 ppm e 5,100 ppm, em delineamento completamente casualizado. Foram empregadas 3200 aves, alojadas em boxes de 100 aves cada, com um total de oito boxes para cada tratamento.

Os resultados foram avaliados através de análise de variância e teste de Tukey. As variáveis consideradas foram a mortalidade, o peso médio, o ganho de peso diário, a conversão alimentar e o índice de produção. A mortalidade foi medida em percentual da população; o ganho de peso diário foi calculado subtraindo o peso inicial do peso final e dividindo o resultado pelo número de dias; a conversão alimentar foi calculada dividindo a quantidade de ração consumida pelo peso final, representando então a quantidade de ração necessária para que a ave ganhe um quilograma de peso vivo; o índice de produção foi calculado segundo a seguinte fórmula:

$$I.P. = \frac{V\% \times GPD}{C.A.} \times 100$$

C.A.

onde: I.P. = índice de produção; V% = percentual de viabilidade, obtido subtraindo-se o percentual de mortalidade de 100%; GPD = ganho de peso diário; C.A. = conversão alimentar.

**2.6. Alimentação das aves:** em todas os testes, as aves foram alimentadas com ração balanceada, a base de milho e soja, fornecida pela empresa Nuvital Nutrientes Ltda.

Quanto aos níveis nutricionais, foram consideradas duas fases: fase inicial, do primeiro ao vigésimo-primeiro dia;

e fase de crescimento, do vigésimo-segundo ao quadragésimo-segundo dia. As rações foram calculadas conforme os níveis nutricionais prescritos por ANDRIGUETTO et alli (1986).

As rações de cada teste foram fabricadas com lotes homogêneos de matérias-primas, cujos níveis nutricionais foram controlados segundo os métodos preconizados pela A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 12ª edição (1975).

## 2.7. Métodos para estudo de atividade respiratória.

**2.7.1. Preparação de mitocôndria hepática e de músculo cardíaco:** nos testes *in vitro* o material utilizado foi suspensão de mitocôndria, obtida a partir de fígado e de músculo cardíaco de frango de corte. Estas suspensões foram obtidas por técnica de centrifugação fracionada (JOHNSON & LARDY in ESTABROOK & PULLMAN, 1963; VILLELA et alli, 1973; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1979). O tampão extrator utilizado compôs-se de manitol 0,25M; TRIS  $10^{-3}$ M; e EDTA  $10^{-3}$ M; pH 7,4.

As aves foram sacrificadas por luxação da articulação occipital, sendo o fígado e o coração rapidamente retirados e transferidos para recipientes contendo solução fisiológica gelada. Estes recipientes, bem como todos os outros utilizados no processo, foram mantidos em caixas de isopor contendo gelo picado, de modo a manter os tecidos em temperatura aproximadamente de 4°C.

Os órgãos foram picados e lavados com solução fisiológica e com o tampão extrator. Após a lavagem, os fragmentos foram homogeneizados com homogeneizador de Potter-

Elvehjem. O homogenado foi filtrado em funil com gase quádrupla. Este filtrado foi então levado a centrifuga refrigerada, mantida a 0°C, e centrifugado por duas vezes. A primeira centrifugação foi feita em baixa rotação, de 960 g. O precipitado resultante foi desprezado e o sobrenadante foi novamente centrifugado, desta vez a 11300 g. O sobrenadante, que corresponde à fração microssomal, foi desprezado e o precipitado, contendo basicamente mitocôndria, foi suspenso em volume suficiente do mesmo tampão extrator. O volume empregado variou em função da técnica de respirometria.

**2.7.2. Técnica de respirometria de Warburg:** a clássica técnica respirométrica de Warburg baseia-se na medida da variação de pressão em um sistema fechado, a temperatura constante, provocada pela variação na quantidade de gás resultante de atividade metabólica.

O respirômetro constitui-se de um manômetro graduado em milímetros e de um frasco que a ele se adapta. As áreas de contato são vedadas com vaselina siliconada.

O manômetro é composto de duas colunas capilares comunicantes, contendo líquido de densidade conhecida, neste caso, solução de Brodie, composta de cloreto de sódio 23g; coleato de sódio, 5g; água destilada até 500 ml; e como corante 200mg de azul de metileno por litro. Uma coluna é ligada ao sistema fechado onde ocorre a atividade respiratória e a outra é aberta. A variação de pressão no sistema fechado provoca a movimentação das colunas. Para a leitura, a coluna aberta é



ajustada em um ponto padrão, neste caso 150, e pode-se então ler a variação da coluna do lado fechado.

Para corrigir variações de origem externa, é utilizado um frasco adicional, o termobarômetro, contendo apenas água. Qualquer variação neste sistema é proveniente apenas de alterações na pressão atmosférica ou na temperatura do banho. Estas variações são anotadas no momento da leitura e utilizadas para correções posteriores.

O frasco empregado, de volume útil aproximado de 5cc, apresenta um braço lateral, para o substrato, e um poço central, para o álcali (hidróxido de potássio a 20%). Este tem por função absorver o gás carbônico produzido, mantendo a zero sua pressão parcial, permitindo assim a medida da variação de pressão decorrente do consumo de oxigênio. Para aumentar a superfície de contato é colocado no poço central um fragmento de papel de filtro de tamanho padrão (30 x 6 mm). O frasco é mantido em banho de temperatura constante, a 37°C, com agitação de 100 ciclos por minuto.

A conversão da leitura em milímetros para microlitros de oxigênio consumido é feita através do cálculo de uma constante,  $kO_2$ , segundo a expressão:

$$kO_2 = \frac{Vg[273/(T+t)]}{P_0} + aO_2$$

onde:  $kO_2$  = constante do frasco para quando se mede consumo de  $O_2$ ;  $Vg$  = volume da fase gasosa do sistema (volume do frasco mais o volume do manômetro, previamente calibrados, menos o

volume do sistema);  $T$  = temperatura absoluta ( $273^{\circ}\text{C}$ );  $t$  = temperatura do teste ( $37^{\circ}\text{C}$ );  $a_{\text{O}_2}$  = coeficiente de solubilidade do oxigênio no líquido usado à temperatura do teste (0,0237);  $P_0$  = 760mm de mercúrio expresso em termos de fluido manométrico; se o fluido tem densidade 1033,  $P_0 = 10$ .

Os sistemas testados continham suspensão de mitocôndria, ácido succínico como substrato, MSCA, hidróxido de potássio (no poço central) e tampão extrator, em quantidade suficiente para completar o volume de 3ml. O tampão foi o mesmo empregado para a obtenção de mitocôndria. Quando da preparação dos sistemas, o substrato foi colocado no braço lateral do frasco, sendo acrescentado ao meio de reação somente após um período de cinco minutos, durante o qual ocorria o equilíbrio da temperatura dos sistemas com a do banho.

O acréscimo do substrato é uma manobra delicada. Para realizá-la deve-se vedar a saída da coluna aberta, de modo que esta não se altere, e inclinar o conjunto formado pelo frasco e o manômetro de modo que o substrato passe do braço lateral para o meio de reação. É imprescindível evitar que o álcali contido no poço central venha a contaminar o meio de reação, pois a alteração no pH é fatal para a mitocôndria.

A primeira leitura foi realizada aos cinco minutos de reação, a segunda aos dez minutos, e a partir de então a intervalos de dez minutos até um total de noventa minutos.

Sabendo-se a quantidade de oxigênio consumida e a quantidade de material biológico presente no sistema, foi calculado então o coeficiente metabólico  $\text{QO}_2$ , que representa a

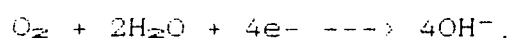
taxa de consumo de oxigênio por unidade de material biológico. Este foi quantificado em miligramas de proteína.

A técnica é descrita com maiores detalhes nas publicações de SLATER (in ESTABROOK & PULLMAN, 1967) e VILLELA et alli (1973).

A influência da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre a atividade respiratória da mitocôndria foi avaliada por regressão linear. A significância da equação de regressão foi verificada por análise de variância e teste t de Student.

**2.7.3. Medida polarográfica de consumo de oxigênio:** nesta técnica foi empregado um modelo de polarógrafo desenhado e construído pelo Prof. Pedro Hélio Lucchiari, do Departamento de Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista " Júlio de Mesquita Filho ", campus de Botucatu.

A técnica se baseia na medida da variação da corrente elétrica no sistema em função do consumo de oxigênio. Foi utilizado um eletrodo sólido de Clarke, composto por um eletrodo de platina (pólo negativo) e um de prata (pólo positivo), revestidos por uma membrana de diálise. Aplicada uma diferença de potencial entre os eletrodos, a corrente é fechada pela redução do oxigênio molecular  $O_2$  no eletrodo de platina, segundo a equação:



Sendo assim há uma relação direta entre a intensidade de corrente e a velocidade de consumo de oxigênio. A diferença de potencial empregada foi de 0,6V.

O eletrodo é ligado a um polarógrafo, que é o aparelho que regula a voltagem e que transfere a leitura a um registrador gráfico. Estes três elementos compõem o circuito polarográfico.

O eletrodo é inserido numa câmara de reação de acrílico, de volume aproximado de 2ml. Esta câmara conta com um sistema de escoamento, ligado a uma trompa de vácuo, e é construída dentro de outra câmara, também de acrílico, por onde circula água a temperatura constante, proveniente de um banho circulante, de modo a manter a câmara de reação a uma temperatura constante, que foi de 37°C. A câmara é montada sobre um agitador magnético, de modo a garantir a homogeneidade do sistema de reação. Na face superior da câmara, ao lado da entrada do eletrodo, há uma abertura capilar, com 1cm de comprimento e 45° de inclinação, através da qual se faz a introdução dos elementos do sistema, com seringas de 1ml de capacidade e pipetas de Hamilton, neste caso de 10, 25 e 100 microlitros.

A velocidade de consumo de oxigênio é dada em micromoles de  $O_2$  por segundo conforme a equação:

$$V_c = \frac{d \times 209 \times VF}{A \times 1000 \times l \times 3.149}$$

onde:  $V_c$  = velocidade de consumo;  $d$  = cateto adjacente ao ângulo de inclinação da curva de atividade metabólica, paralelo à

largura do papel, em milímetros; 209 = valor constante da saturação de  $O_2$  em um litro de meio aquoso, em micromoles de  $O_2$ , extrapolado da coluna de clorinidade 0% para 37°C do Handbook of Marine Science (1974); VF = volume total de fluido na câmara de reação; A = amplitude de leitura no papel do registrador, do nível de saturação ao nível zero de  $O_2$ , em milímetros; l = cateto oposto ao ângulo de inclinação da curva de atividade metabólica, em milímetros; 3,149 = tempo, em segundos, em que o papel percorre um milímetro no registrador gráfico, em segundos por milímetro.

De modo a se obter uma solução saturada de oxigênio, antes de cada sessão os tampões foram ligados a um sistema de aeração. Este consistiu de um pequeno compressor de ar ligado a um primeiro frasco contendo água destilada, conectado a um segundo frasco, contendo o tampão, de modo que este recebesse ar saturado de água, o que evitou alterações na concentração decorrentes de evaporação (KNAPP in GNAIGNER & FORSTNER, 1983). Durante o processo, o frasco contendo tampão foi mantido em banho a 37°C.

Nas determinações de consumo de oxigênio foi utilizado o mesmo tampão extrator usado na técnica manométrica, composto de manitol 0,25M, TRIS  $10^{-3}$ M, e EDTA  $10^{-3}$ M, pH 7,4; e como substrato foi empregado o ácido succínico 0,5M pH7,4.

Sabendo-se a quantidade de proteína presente nas suspensões de mitocôndria, foi possível calcular a quantidade presente na câmara de reação e conseqüentemente calcular o coeficiente de consumo de oxigênio por miligrama de proteína.

Ao início de cada sessão procedeu-se a uma lavagem e desinfecção da câmara com etanol 70%, de modo a evitar a interferência de possíveis contaminações bacterianas (DALLA VIA in GNAIGNER & FORSTNER, 1983).

A interferência da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre a atividade respiratória da mitocôndria foi analisada por regressão linear. A significância da equação de regressão foi avaliada por análise de variância e teste *t* de Student.

Maiores detalhes sobre a técnica podem ser encontrados nas publicações de ESTABROOK in ESTABROOK & PULLMAN (1963), VILLELA et alli (1973) e FATT (1976).

**2.8.Determinação do efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre a turbidez de uma suspensão de mitocôndria:** de modo a se verificar possíveis alterações físico-químicas na mitocôndria, procedeu-se ao controle espectrofotométrico da evolução de uma suspensão de mitocôndria hepática em presença de diferentes concentrações de MSCA.

Foram utilizadas seis cubetas de quartzo. A primeira serviu para zerar o aparelho, contendo apenas 3,0ml de tampão extrator. A segunda continha 2,9ml de tampão e 0,1ml de suspensão de mitocôndria. As outras quatro continham 0,1ml de suspensão, quantidades crescentes de solução de mono-semi-carbazona do adrenocromo 400  $\mu$ M, e tampão em quantidade suficiente para 3ml. As quantidades de solução empregadas foram 0,01; 0,05; 0,10 e 0,20 ml. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 600nm, a intervalos regulares até 15 minutos.

## 2.9. Métodos analíticos.

**2.9.1. Determinação de proteína:** a determinação de proteína foi levada a efeito segundo a técnica descrita por LOWRY et alii (1961), que se processa em duas etapas. Inicialmente o cobre presente na mistura reativa forma um complexo de coordenação com o nitrogênio das ligações peptídicas; posteriormente a hidroxila da tirosina reduz, em pH 10,0, os sais de fosfomolibdato do reativo de Folin e Ciocalteu, produzindo óxido de molibdênio, de cor azul, cuja intensidade é proporcional à quantidade de tirosina presente, o que é um indicativo da quantidade de proteína, visto que este aminoácido aparece regularmente nas moléculas protéicas.

O método prevê a construção de uma curva espectrofotométrica a partir de uma solução padrão de concentração conhecida (400 $\mu$ g de albumina bovina/ml). Variando-se a alíquota tomada desta solução constrói-se uma curva variando de 40 a 280  $\mu$ g de proteína. Com base nesta curva é calculado, por regressão linear, um fator de conversão de densidade óptica em concentração de proteína.

Para determinação da concentração de proteína em uma solução desconhecida, é tomada uma alíquota de 0,1ml e diluída em 0,9ml de água destilada. Soluções com alta concentração podem ser previamente diluídas, geralmente a 1:10, tomando-se então uma alíquota desta solução. Acrescenta-se a seguir 5ml de solução reativa. Esta é composta de 1ml de sulfato de cobre 2%, 2ml de tartarato de sódio 4% e 100ml de solução alcalina,

composta de 20g de carbonato de sódio anidro, 4g de hidróxido de sódio e água destilada em quantidade suficiente para 1000ml. A solução reativa deve ser preparada no momento do uso. Após dez minutos é acrescentado 0,5ml de reativo de Folin-Ciocalteu. O reativo comercial (Labtest) é diluído em duas partes de água destilada. Após vinte a trinta minutos faz-se a leitura em cubeta de vidro e comprimento de onda de 660nm, luz de tungstênio.

A absorbância encontrada é então multiplicada pelo fator e por dez (ou cem, no caso de soluções previamente diluídas), obtendo-se a concentração de proteína em microgramas por mililitro.

**2.9.2. Parâmetros físico-químicos da mono-semi-carbazona do adrenocromo:** a curva espectrofotométrica bem como a curva padrão de solubilidade da mono-semi-carbazona do adrenocromo foram determinadas dentro das condições experimentais do presente trabalho.

A fim de traçar a curva espectrofotométrica da MSCA, foram diluídos alguns cristais em 3ml de água destilada, em cubeta de vidro, formando uma solução verdadeira. Procedeu-se então à leitura da absorbância desta solução em comprimentos de onda variando de 340 a 600 nm, observando-se um pico de absorbância máxima a 355nm.

Esse dado foi utilizado como base para se determinar a curva padrão de solubilidade dessa substância, através da leitura espectrofotométrica de soluções com concentrações crescentes de mono-semi-carbazona do adrenocromo.



**2.10. Equipamentos:** foram empregados os seguintes equipamentos:

- Rotor marca Eberle de 1700 rpm;
- Centrífuga refrigerada KS 70 com multiplicador de velocidade;
- Respirômetro de Warburg modelo circular marca Braun-Melsungen;
- Polarógrafo associado a agitador magnético;
- Registrador gráfico marca Texas Instruments modelo Rectiriter;
- Banho circulante marca Etica;
- Espectrofotômetro modelo DU marca Beckman adaptado com leitura digital;
- Potenciômetro Micronal;
- Balança analítica eletrônica marca Sartorius.

**2.11. Reagentes:** foram utilizados os seguintes reagentes: manitol Reagen; EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) QEEL; TRIS (hidroximetil metano) Carlo Erba; ácido succínico Merck; mono-semi-carbazona do adrenocromo (carbazocromo) Tanabe Seiyaku; e demais reagentes inorgânicos, todos de fonte idônea.

### III. RESULTADOS

3.1.Efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre o desempenho produtivo de frangos de corte.

3.1.1.Administração por via intra-muscular: verificou-se o efeito de três níveis diferentes de mono-semi-carbazona do adrenocromo, quando injetada por via intra-muscular a cada cinco dias, a partir do primeiro dia. Foram avaliadas as diferenças entre os pesos médios finais de machos e de fêmeas, criados até 42 dias, através de análise de variância simples e teste de Tukey. A Tabela 1 mostra as probabilidades encontradas e a Tabela 2 os pesos médios finais.

Tabela 1.  
Análise de variância do experimento em 3.1.1.

Variável (Peso médio)	f	Probabilidade	Significância
Machos	3,468	0,0796	NS (P<0,1)*
Fêmeas	2,460	0,1373	NS

\*P<0,1 indica significância ao nível de 10%.  
NS = não significativo.

Tabela 2.

Peso médio aos 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA por via intramuscular.

Dose (mg/kg)	peso médio $\pm$ desvio padrão-machos (g)	peso médio $\pm$ desvio padrão-fêmeas (g)
0,000	1780,00 $\pm$ 219,91 ab*	1386,67 $\pm$ 86,22
0,035	1640,00 $\pm$ 100,37 ab*	1498,33 $\pm$ 18,93
0,070	1907,50 $\pm$ 144,96 b*	1513,33 $\pm$ 85,05
0,105	1483,33 $\pm$ 150,86 a *	1506,67 $\pm$ 53,46

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas, ao nível de 10%.

3.1.2. Administração através da água: verificou-se o efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo quando administrada através da água de bebida, diariamente, do primeiro ao 42º dia. Foram testados três níveis, quais sejam 0,585; 1,170 e 2,340 mg/l de água. Foram utilizados 36 machos e 36 fêmeas, testados em ocasiões diferentes. Os resultados foram avaliados por análise de variância simples e teste de Tukey. A Tabela 3 mostra o resultado da análise estatística de cada variável considerada. Foram considerados separadamente os períodos de 1 a 21 dias, 21 a 42 dias e 1 a 42 dias.

Tabela 3.

Análise de variância do experimento em 3.1.2.

Variável	f	Probabilidade	Significância
MACHOS			
PM 21d.	0,730	0,5419	NS
GPD 21d.	0,734	0,5399	NS
PM 42d.	3,757	0,0207	P<0,05
GPD 42d.	4,009	0,0160	P<0,05
CA 42d.	2,710	0,0620	NS (P<0,10)
GPD total	3,774	0,0203	P<0,05

Tabela 3. Continuação.

## FEMEAS

PM 21d.	1,242	0,3113	NS
GPD 21d.	1,285	0,2968	NS
PM 42d.	0,693	0,5630	NS
GPD 42d.	1,191	0,3295	NS
CA 42d.	0,104	0,9569	NS
GPD total	0,694	0,5628	NS

-----  
 NS = não significativo;  $P < 0,05$  = significativo ao nível de 5%;  $P < 0,10$  = significativo ao nível de 10%;  
 Variáveis: PM = peso médio; GPD = ganho de peso diário; CA = conversão alimentar; 21d refere-se ao período de 1 a 21 dias; 42d ao período de 21 a 42 dias e total ao período de 1 a 42 dias.

As Tabelas 4 a 9 mostram os resultados obtidos com a administração da MSCA através da água de bebida, para cada uma das variáveis consideradas. Aquelas variáveis que apresentaram diferenças significativas foram ordenadas pelo teste de Tukey.

Tabela 4.

Peso médio aos 21 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através da água.

Dose(mg/l)	Média(g) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	546,56 $\pm$ 60,94	562,22 $\pm$ 22,79
0,585	546,89 $\pm$ 71,48	535,00 $\pm$ 35,05
1,170	535,67 $\pm$ 38,38	534,44 $\pm$ 72,48
2,340	510,37 $\pm$ 55,04	513,33 $\pm$ 66,52

Tabela 5.

Ganho de peso diário de 1 a 21 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através da água.

Dose(mg/l)	Média(g) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	23,95 $\pm$ 2,89	24,67 $\pm$ 1,11
0,585	23,95 $\pm$ 3,43	23,24 $\pm$ 1,75
1,170	23,42 $\pm$ 1,83	23,33 $\pm$ 3,50
2,340	22,20 $\pm$ 2,68	22,29 $\pm$ 3,13

Tabela 6.

Peso médio aos 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através da água.

Dose(mg/l)	Média(g) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	1845,56 $\pm$ 134,36 ab *	1574,44 $\pm$ 43,62
0,585	1925,56 $\pm$ 230,77 b *	1712,50 $\pm$ 67,98
1,170	1764,44 $\pm$ 131,64 ab *	1700,00 $\pm$ 118,95
2,340	1655,00 $\pm$ 179,76 a *	1737,78 $\pm$ 33,03

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 7.

Ganho de peso diário dos 21 aos 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através da água.

Dose(mg/l)	Média(g) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	61,88 $\pm$ 5,68 ab *	56,78 $\pm$ 1,63
0,585	65,66 $\pm$ 8,66 b *	56,07 $\pm$ 3,07
1,170	58,51 $\pm$ 5,05 ab *	55,50 $\pm$ 4,23
2,340	54,51 $\pm$ 7,80 a *	58,31 $\pm$ 3,76

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 8  
 Conversão alimentar dos 21 aos 42 dias de machos e fêmeas  
 tratados com MSCA através da água.

Dose(mg/l)	Média ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	1,99 ± 0,08 ab *	2,07 ± 0,12
0,585	1,88 ± 0,13 b *	2,07 ± 0,10
1,170	2,00 ± 0,13 ab *	2,06 ± 0,15
2,340	2,10 ± 0,26 a *	2,09 ± 0,14

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 9.  
 Ganho de peso diário de 1 a 42 dias de machos e fêmeas tratados  
 com MSCA através da água.

Dose(mg/l)	Média(g) ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	42,90 ± 3,18 ab *	40,71 ± 1,03
0,585	44,80 ± 5,46 b *	39,65 ± 1,64
1,170	40,98 ± 3,12 ab *	39,42 ± 2,86
2,340	38,36 ± 4,29 a *	40,28 ± 2,10

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

3.1.3. **Administração através da ração:** verificou-se o efeito de três níveis de mono-semi-carbazona do adrenocromo na ração sobre a performance produtiva de frangos de corte. As aves receberam o produto diariamente, incorporado à ração farelada, do primeiro até o 42º dia. Foram utilizados 1600 machos e 1600 fêmeas, alojados em boxes de 100 aves, sendo utilizados quatro boxes de machos e quatro boxes de fêmeas para cada tratamento. Os níveis testados foram 1,275 ppm; 2,550 ppm e 5,100 ppm.

As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados da análise estatística de cada variável considerada para machos e fêmeas.

Foram considerados separadamente os períodos de 0 a 21 dias, 21 a 42 dias e 0 a 42 dias.

Tabela 10.  
Análise de variância dos resultados dos machos do  
experimento em 3.1.3.

Variável	f	Probabilidade	Significância
De 0 a 21 dias			
Mort.	2,000	0,1678	NS
Peso	0,482	0,7010	NS
GPD	0,532	0,6689	NS
CA	1,903	0,1830	NS
IP	1,553	0,2517	NS
De 21 a 42 dias			
Mort.	2,617	0,0991	NS (P<0,10)
Peso	0,910	0,4649	NS
GPD	0,983	0,4333	NS
Conv.	2,349	0,1240	NS
IP	2,689	0,0934	NS
De 0 a 42 dias			
Mort.	2,617	0,0991	NS (P<0,10)
GPD	0,934	0,4545	NS
CA	2,801	0,0852	NS (P<0,10)
IP	3,285	0,0583	NS (P<0,10)

NS = não significativo; P<0,10 = significativo ao nível de 10%. Variáveis: Mort. = mortalidade; Peso = peso médio; GPD = ganho de peso diário; CA = conversão alimentar; IP = índice de produção.

Tabela 11.  
Análise de variância dos resultados das fêmeas no  
experimento em 3.1.3.

Variável	f	Probabilidade	Significância
De 0 a 21 dias			
Mort.	1,224	0,3434	NS
Peso	0,713	0,5629	NS
GPD	0,902	0,4688	NS
Conv.	0,353	0,7875	NS
IP	0,363	0,7810	NS
De 21 a 42 dias			
Mort.	3,054	0,0697	NS (P<0,10)
Peso	0,855	0,4904	NS
GPD	0,512	0,6816	NS
Conv.	0,297	0,8272	NS
IP	1,263	0,3311	NS
De 0 a 42 dias			
Mort.	3,054	0,0697	NS (P<0,10)
GPD	0,932	0,4552	NS
Conv.	0,064	0,9776	NS
IP	1,529	0,2576	NS

NS = não significativo; P<0,10 = significativo ao nível de 10%. Variáveis: Mort. = mortalidade; Peso = peso médio; GPD = ganho de peso diário; CA = conversão alimentar; IP = índice de produção.

As Tabelas 12 a 25 mostram os valores médios obtidos com machos e fêmeas, para cada uma das variáveis consideradas. Aquelas variáveis que apresentaram diferenças significativas foram ordenadas pelo teste de Tukey.



Tabela 12.  
Mortalidade de 1 a 21 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média(%) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	2,00 $\pm$ 1,41	3,00 $\pm$ 2,58
1,275	2,25 $\pm$ 0,50	1,00 $\pm$ 1,41
2,550	1,75 $\pm$ 0,96	1,75 $\pm$ 0,50
5,100	4,50 $\pm$ 1,48	2,00 $\pm$ 0,00

Tabela 13.  
Peso médio aos 21 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média(g) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	692,58 $\pm$ 16,96	646,26 $\pm$ 7,36
1,275	685,14 $\pm$ 11,14	634,73 $\pm$ 22,59
2,550	697,80 $\pm$ 19,08	635,59 $\pm$ 14,10
5,100	696,35 $\pm$ 17,01	630,10 $\pm$ 16,88

Tabela 14.  
Ganho de peso de 1 a 21 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média(g) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	30,94 $\pm$ 0,86	26,95 $\pm$ 2,20
1,275	30,61 $\pm$ 0,59	25,63 $\pm$ 0,50
2,550	31,23 $\pm$ 0,90	27,25 $\pm$ 3,68
5,100	31,19 $\pm$ 0,77	27,45 $\pm$ 1,68

Tabela 15.  
Conversão alimentar de 1 a 21 dias de machos e fêmeas tratados  
com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	1,53 $\pm$ 0,05	1,68 $\pm$ 0,10
1,275	1,56 $\pm$ 0,03	1,64 $\pm$ 0,06
2,550	1,52 $\pm$ 0,05	1,64 $\pm$ 0,05
5,100	1,59 $\pm$ 0,02	1,67 $\pm$ 0,05

Tabela 16.  
Índice de produção de 1 a 21 dias de machos e fêmeas tratados  
com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	198,60 $\pm$ 12,48	166,65 $\pm$ 7,89
1,275	191,70 $\pm$ 8,28	170,26 $\pm$ 10,66
2,550	201,48 $\pm$ 11,80	169,48 $\pm$ 8,90
5,100	187,67 $\pm$ 6,85	164,20 $\pm$ 9,11

Tabela 17.  
Mortalidade de 21 a 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA  
através de ração.

Dose(ppm)	Média(%) $\pm$ desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	4,25 $\pm$ 2,06 a *	4,50 $\pm$ 1,73 b*
1,275	4,25 $\pm$ 1,50 a *	1,50 $\pm$ 1,73 a *
2,550	3,75 $\pm$ 0,96 a *	2,50 $\pm$ 1,29 ab*
5,100	7,25 $\pm$ 2,87 b*	3,75 $\pm$ 1,26 ab*

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 18.

Peso médio aos 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média(g) ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	1940,25 ± 43,64	1679,00 ± 11,86
1,275	1940,50 ± 32,56	1674,25 ± 30,01
2,550	1987,00 ± 57,40	1660,25 ± 10,24
5,100	1961,75 ± 48,77	1665,25 ± 14,22

Tabela 19.

Ganho de peso dos 21 aos 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	59,41 ± 1,60	49,18 ± 0,56
1,275	59,78 ± 1,34	49,50 ± 1,00
2,550	61,39 ± 2,06	48,79 ± 1,12
5,100	60,26 ± 1,85	49,29 ± 0,44

Tabela 20.

Conversão alimentar dos 21 aos 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	2,20 ± 0,07	2,31 ± 0,03
1,275	2,17 ± 0,05	2,30 ± 0,03
2,550	2,12 ± 0,08	2,32 ± 0,04
5,100	2,22 ± 0,02	2,29 ± 0,07

Tabela 21.  
Índice de produção de 21 a 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	259,31 ± 15,67 a *	203,27 ± 7,56
1,275	263,11 ± 12,19 a *	211,95 ± 7,14
2,550	279,63 ± 20,65 b*	205,37 ± 5,64
5,100	251,41 ± 4,46 a *	207,47 ± 5,85

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 22.  
Mortalidade de 1 a 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose	Média(%) ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	4,25 ± 2,06 a *	4,50 ± 1,73 b*
1,275	4,25 ± 1,50 a *	1,50 ± 1,73 a *
2,550	3,75 ± 0,96 a *	2,50 ± 1,29 ab*
5,100	7,25 ± 2,88 b*	3,75 ± 1,25 ab*

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 23.  
Ganho de peso diário de 1 a 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose(ppm)	Média(g) ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	45,17 ± 1,06	38,99 ± 0,26
1,275	45,19 ± 0,81	38,86 ± 0,71
2,550	46,31 ± 1,36	38,54 ± 0,26
5,100	45,72 ± 1,15	38,64 ± 0,31

Tabela 24.  
Conversão alimentar de 0 a 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose (ppm)	Média ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	1,97 ± 0,04 ab*	2,06 ± 0,02
1,275	1,97 ± 0,04 ab*	2,06 ± 0,02
2,550	1,92 ± 0,06 a *	2,07 ± 0,02
5,100	2,00 ± 0,00 b *	2,06 ± 0,05

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 25.  
Índice de produção de 0 a 42 dias de machos e fêmeas tratados com MSCA através de ração.

Dose	Média ± desvio-padrão	
	machos	fêmeas
0,000	219,99 ± 10,29 ab*	180,78 ± 4,65
1,275	219,89 ± 7,30 ab*	185,63 ± 2,78
2,550	232,85 ± 14,74 a *	181,67 ± 2,62
5,100	211,38 ± 2,24 b*	180,18 ± 5,18

\*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

3.2. Efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre a atividade respiratória da mitocôndria: experimentos para verificar um possível efeito da MSCA sobre a atividade de mitocôndria isolada de fígado e de músculo cardíaco de frango de corte foram levados a efeito por respirometria pelo clássico método de Warburg e por polarografia com eletrodo de oxigênio.

### 3.2.1. Estudos por respirometria com a técnica de Warburg.

3.2.1.1. Fígado: a tabela 26 mostra o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado frente a diferentes

concentrações de MSCA, conforme observado no Respirômetro de Warburg.

Tabela 26.  
Efeito da MSCA sobre a respiração de mitocôndria hepática.

Concentração ( $\mu$ moles/mg proteína)	OO <sub>2</sub> ( $\mu$ l O <sub>2</sub> /mg prot.)	Inibição (%)
sem MSCA	57,26	-----
com MSCA	-----	-----
0,0305	50,45	11,89
0,0590	44,46	22,35
0,0690	50,19	12,35
0,1050	51,55	9,97
0,1100	42,10	26,47

Sistema: o meio de reação era composto de 0,2ml de solução de ácido succínico 0,125 M; 0,2 ml de solução de KOH 20% no poço central; 0,5ml de suspensão de mitocôndria hepática obtida por centrifugação fracionada, a partir de aproximadamente 16g de tecido, sendo o "pellet" final suspenso em 3ml do tampão empregado no meio de reação; volumes variando de 0,1 a 0,4ml de solução 400  $\mu$ M de mono-semi-carbazona do adrenocromo; e tampão composto de TRIS  $10^{-3}$  M, EDTA  $10^{-3}$  M e manitol 0,25 M pH 7,4 em quantidade suficiente para 3ml; a temperatura foi mantida em 37°C com 100 agitações por minuto; após o tempo de equilíbrio de 5 minutos, o ácido succínico foi transferido do braço lateral para o meio de reação. Os valores correspondem à leitura obtida aos 60 minutos de reação. As concentrações de proteína nos diferentes sistemas variaram de 0,486 a 1,520 mg/ml.

Considerando-se a concentração de MSCA (A) como variável independente e o consumo de oxigênio (O) como variável dependente, foi calculada a equação de regressão linear que prediz a influência da droga sobre o consumo. O coeficiente angular calculado foi de  $-37,732 \mu\text{l O}_2/\mu\text{mol}$  de MSCA e o intercepto foi igual a  $50,5686 \mu\text{l O}_2$ , gerando a seguinte equação:

$$O = 50,5686 + (-37,732)A.$$

A significância da equação de regressão foi avaliada por análise de variância e teste *t* de Student e a probabilidade encontrada foi de 0,62612, o que significa que não se pode afirmar que o coeficiente de regressão seja diferente de zero. Sendo assim não há relação de causa e efeito entre a concentração de mono-semi-carbazona do adrenocromo e o consumo de oxigênio por miligrama de proteína de mitocôndria hepática, medido no respirômetro de Warburg.

3.2.1.2. **Músculo cardíaco:** a tabela 27 mostra o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de músculo cardíaco frente a diferentes concentrações de MSCA, conforme observado no Respirômetro de Warburg.

Tabela 27.  
Efeito da MSCA sobre a respiração de mitocôndria de músculo cardíaco.

Concentração ( $\mu$ moles/mg proteína)	QO <sub>2</sub> ( $\mu$ l O <sub>2</sub> /mg prot.)	Inibição (%)
sem MSCA	52,47	-----
com MSCA	-----	-----
0,0236	45,37	13,53
0,0462	46,18	11,97
0,1074	51,16	2,48

Sistema: o meio de reação era composto de 0,2 ml de KOH 20%, no poço central; 0,2 ml de solução de ácido succínico 0,125 M; 0,5ml de suspensão de mitocôndria de músculo cardíaco obtida por centrifugação fracionada, a partir de aproximadamente 15 g de tecido, correspondente a dois corações, sendo o "pellet" final suspenso em 3ml do mesmo tampão empregado no meio de reação; 0,1

a 0,4ml de solução de mono-semi-carbazona do adrenocromo  $400 \mu\text{M}$  e tampão de reação composto de TRIS  $10^{-3} \text{ M}$ , EDTA  $10^{-3} \text{ M}$  e manitol  $0,25 \text{ M}$  pH 7,4 em quantidade suficiente para 3ml; a temperatura foi mantida a  $37^{\circ}\text{C}$  com 100 agitações por minuto; após o tempo de equilíbrio de 5 minutos, o ácido succínico foi acrescentado ao meio de reação. Os valores correspondem às leituras obtidas aos 60 minutos. As concentrações de proteína nos diferentes sistemas variaram de 0,80 a 1,856 mg/ml.

Considerando a concentração de MSCA (A) como variável independente e o consumo de oxigênio (O) como variável dependente, foi calculada a equação de regressão linear que prediz o efeito da concentração da MSCA sobre a atividade da mitocôndria. O coeficiente angular calculado foi de  $71,665 \mu\text{l O}_2/\mu\text{mol}$  de MSCA e o intercepto foi igual a  $43,337 \mu\text{l O}_2$ , logo a equação resultante é:

$$O = 43,337 + 71,665A.$$

Analisando-se a significância do coeficiente angular por análise de variância e teste  $t$  de Student, obtem-se uma probabilidade de 0,08540, o que permite aceitar a hipótese de que o coeficiente é diferente de zero, ao nível de 10%, porém não ao nível de 5%. O erro padrão da estimativa, que indica a acurácia com que a equação prediz a dependência de O em relação a A, foi de  $0,592989 \mu\text{l O}_2$ . O coeficiente de determinação  $r^2$ , que indica a proporção percentual da variação total em O que é explicada pela equação encontrada, foi de 98,21%.

### 3.2.2. Estudo por respirometria pela técnica polarográfica.

**3.2.2.1. Fígado:** a tabela 28 mostra os valores de consumo de oxigênio na unidade de tempo de suspensões de mitocôndria de



figado , frente a várias concentrações de MSCA, em medidas levadas a efeito em eletródio de oxigênio.

Tabela 28.  
Efeito da MSCA sobre a respiração de mitocôndria hepática.

Concentração ( $\mu$ moles/mg proteína)	Consumo de $O_2$ (nmoles $O_2$ /seg.mg prot.)	Inibição (%)
<b>sem pré-incubação</b>		
sem MSCA	0,128	-----
com MSCA	-----	-----
0,0059	0,113	11,72
0,0118	0,103	19,53
0,0177	0,122	4,68
0,0237	0,118	7,81
0,0296	0,104	18,75
0,0444	0,117	8,59
<b>com pré-incubação</b>		
sem MSCA	0,310	-----
com MSCA	-----	-----
0,0092	0,210	32,25
0,0230	0,208	32,90
0,0461	0,207	33,23

Sistema: o meio de reação era composto de 1,5ml de tampão constituído de TRIS  $10^{-3}$  M, EDTA  $10^{-3}$  M e manitol 0,25 M, pH 7,4; 0,1ml de suspensão de mitocôndria hepática obtida por centrifugação fracionada a partir de aproximadamente 16g de tecido, sendo o "pellet" final suspenso em 3ml do tampão de reação; 20 $\mu$ l de ácido succínico 0,22M e volumes variando de 20 a 170  $\mu$ l de solução de mono-semi-carbazona do adrenocromo  $10^{-3}$  M; a temperatura na câmara de reação foi mantida em 37°C; a velocidade de deslocamento do papel foi de 0,75 polegadas por minuto. As concentrações de proteína nos diferentes sistemas variaram de 29,70 a 33,75 mg/ml. Nos experimentos com pré-incubação a MSCA foi adicionada ao sistema junto com a mitocôndria e o succinato aproximadamente 1 minuto após.

Considerando a velocidade de consumo de oxigênio (O) como variável dependente e a concentração de MSCA (A) como variável independente, foi calculada a equação de regressão linear que prediz a influência da MSCA sobre a atividade respiratória da mitocôndria hepática, referente aos experimentos sem pré-incubação. A declividade calculada foi de 0,09872 nmoles  $O_2$ .seg.<sup>-1</sup>/μmol de MSCA e o intercepto foi de 0,11064 nmoles  $O_2$ /seg. mg proteína, gerando a seguinte equação:

$$O = 0,11064 + 0,09872A$$

A significância da declividade foi avaliada por análise de variância e teste *t* de Student, e a probabilidade encontrada foi de 0,74122, o que nos leva a aceitar a hipótese de que a declividade não difere de zero, ao nível de 5%.

A velocidade de consumo de oxigênio correspondente à ausência da droga não foi incluída no cálculo de regressão pois entende-se que este valor não faz parte da demonstração estatística da atividade da droga, visto que representa uma variação qualitativa no meio da mitocôndria e não quantitativa; expressando de outra forma, pode-se dizer que o intercepto calculado representa a velocidade de consumo de oxigênio em presença de uma quantidade infinitamente pequena da droga, mas não igual a zero.

**3.2.2.2. Músculo cardíaco:** a tabela 29 mostra os valores de consumo de oxigênio, na unidade de tempo, de suspensões de mitocôndria de músculo cardíaco frente a várias concentrações de

mono-semi-carbazona do adrenocromo, em medidas levadas a efeito em eletródio de oxigênio.

TABELA 29.  
Efeito da MSCA sobre a respiração de mitocôndria cardíaca.

Concentração ( $\mu$ moles/mg proteína)	Consumo de $O_2$ (nmoles $O_2$ /seg.mg prot.)	Inibição (%)
<b>sem pré-incubação</b>		
sem MSCA	0,93	-----
com MSCA	-----	-----
0,0317	0,92	1,07
0,0635	0,97	-4,30
0,0952	1,05	-13,44
0,1269	0,84	9,67
0,1587	1,00	-7,52
<b>com pré-incubação</b>		
sem MSCA	0,69	-----
com MSCA	-----	-----
0,0272	0,79	-14,49
0,0679	0,69	0,00

Sistema: o meio de reação era composto de 1,5ml de tampão constituído por TRIS  $10^{-3}$  M, EDTA  $10^{-3}$  M e manitol 0,25 M, pH 7,4; 0,2ml de suspensão de mitocôndria cardíaca obtida por centrifugação fracionada a partir de um coração de 7g, sendo o "pellet" final suspenso em 1,5ml de tampão de reação; 20 $\mu$ l de ácido succínico 0,22M; e volumes variando de 20 a 170  $\mu$ l de mono-semi-carbazona do adrenocromo  $10^{-3}$ M; a temperatura na câmara de reação foi mantida em 37°C e a velocidade de deslocamento do papel foi de 0,75 polegadas por minuto. As concentrações de proteína nos diferentes sistemas variaram de 6,300 a 10,580 mg/ml. Nos experimentos com pré-incubação a MSCA foi adicionada ao sistema juntamente com a mitocôndria e o succinato aproximadamente 1 minuto após.

Considerando a concentração da MSCA (A) como variável independente e a velocidade de consumo de oxigênio (O) como

variável dependente, foi calculada a equação de regressão linear que prediz a influência da MSCA sobre a atividade respiratória da mitocôndria cardíaca, referente aos experimentos sem pré-incubação. A declividade calculada foi de 0,09519 nmoles  $O_2$  .seg<sup>-1</sup>/μmol de MSCA e o intercepto foi de 0,9469 nmoles  $O_2$ /seg. mg proteína, compondo a seguinte equação:

$$O = 0,9469 + 0,09519A.$$

Avaliando-se a significância da declividade por análise de variância e teste *t* de Student, obtem-se a probabilidade de 0,92419, o que nos leva a afirmar que a declividade não difere de zero, ou seja, não há relação de dependência entre a atividade respiratória da mitocôndria cardíaca, medida no polarógrafo de oxigênio, e a concentração de mono-semi-carbazona do adrenocromo.

A velocidade de consumo de oxigênio correspondente à ausência da droga não foi incluída no cálculo de regressão pois entende-se que este valor não faz parte da demonstração estatística da atividade da droga, visto que representa uma variação qualitativa no meio da mitocôndria e não quantitativa; expressando de outra forma, pode-se dizer que o intercepto calculado representa a velocidade de consumo de oxigênio em presença de uma quantidade infinitamente pequena da droga, mas não igual a zero.

**3.3. Parâmetros físico-químicos da mono-semi-carbazona do adrenocromo:** a figura 4 mostra a curva espectrofotométrica da MSCA, no espectro da luz visível, de 340 a 600 nm. Observa-se um pico em 355nm e um patamar na faixa de 410 a 450 nm.

A figura 5 mostra a curva padrão de solubilidade da MSCA, conforme leitura espectrofotométrica realizada em 355 nm. A absorvância (D.O.) pode ser prevista, em função da concentração de MSCA (C), através da seguinte equação:

$$D.O. = 0.0171 + 0,0327C.$$

Observa-se que a solubilidade só se apresenta linear até a solução 20 $\mu$ M, intervalo para o qual é válida a equação descrita. O coeficiente de determinação para este intervalo é de 99,98%.

**3.4.Efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre a turbidez de uma suspensão de mitocôndria:** as figuras 6.A e 6.B mostram a variação na leitura espectrofotométrica de uma suspensão de mitocôndria, ao longo do tempo, em presença de diferentes concentrações de MSCA. A figura 6.C mostra a variação ocorrida na absorvância da suspensão ao longo do tempo. As abcissas correspondem à diferença entre a absorvância observada em determinado momento e a inicial, do tempo zero.

Observa-se que, nas concentrações mais baixas de MSCA (1,33 e 6,67  $\mu$ M), não ocorreram alterações notáveis na absorvância da suspensão, porém nas concentrações mais altas, de 13,33 e 26,67  $\mu$ M, ocorreram quedas bruscas na absorvância e de forma proporcional à quantidade da droga existente, denotando então uma provável alteração estrutural da mitocôndria.

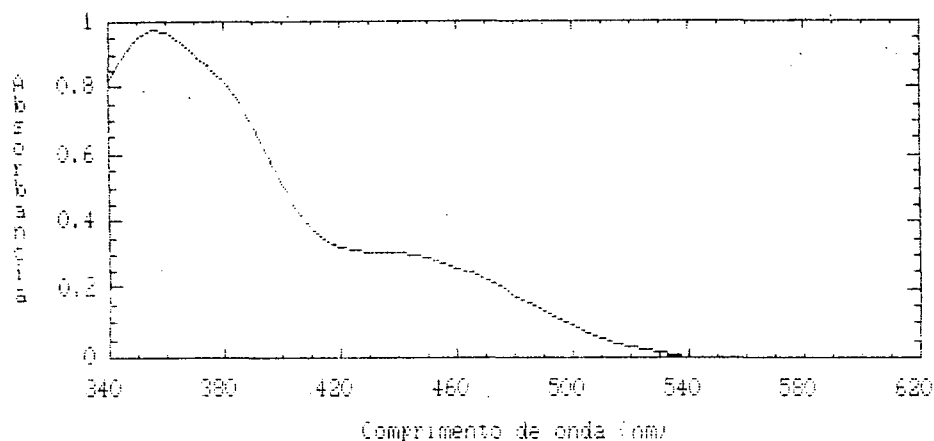


Figura 4. Curva espectrofotométrica da mono-semi-carbazona do adrenocromo. Sistema: cristais de mono-semi-carbazona do adrenocromo dissolvidos em água destilada.

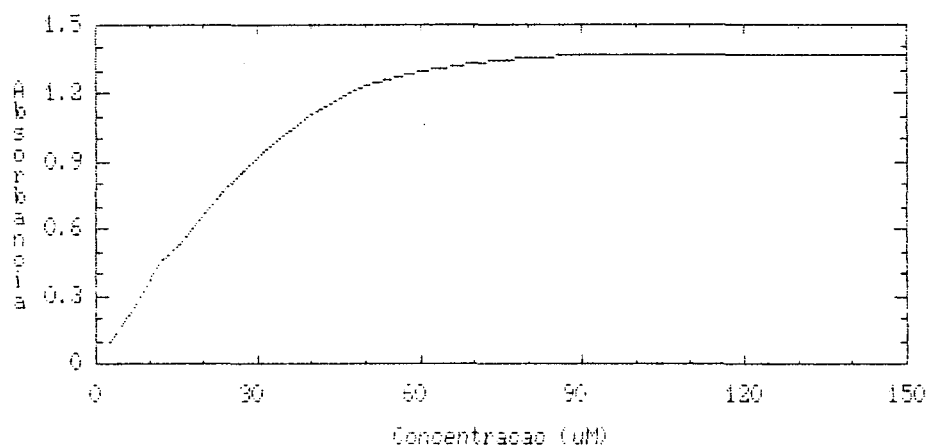


Figura 5. Curva padrão da mono-semi-carbazona do adrenocromo. Sistema: absorvância de soluções aquosas de MSCA em concentrações de 0 a 150 µM lidas a 355 nm.

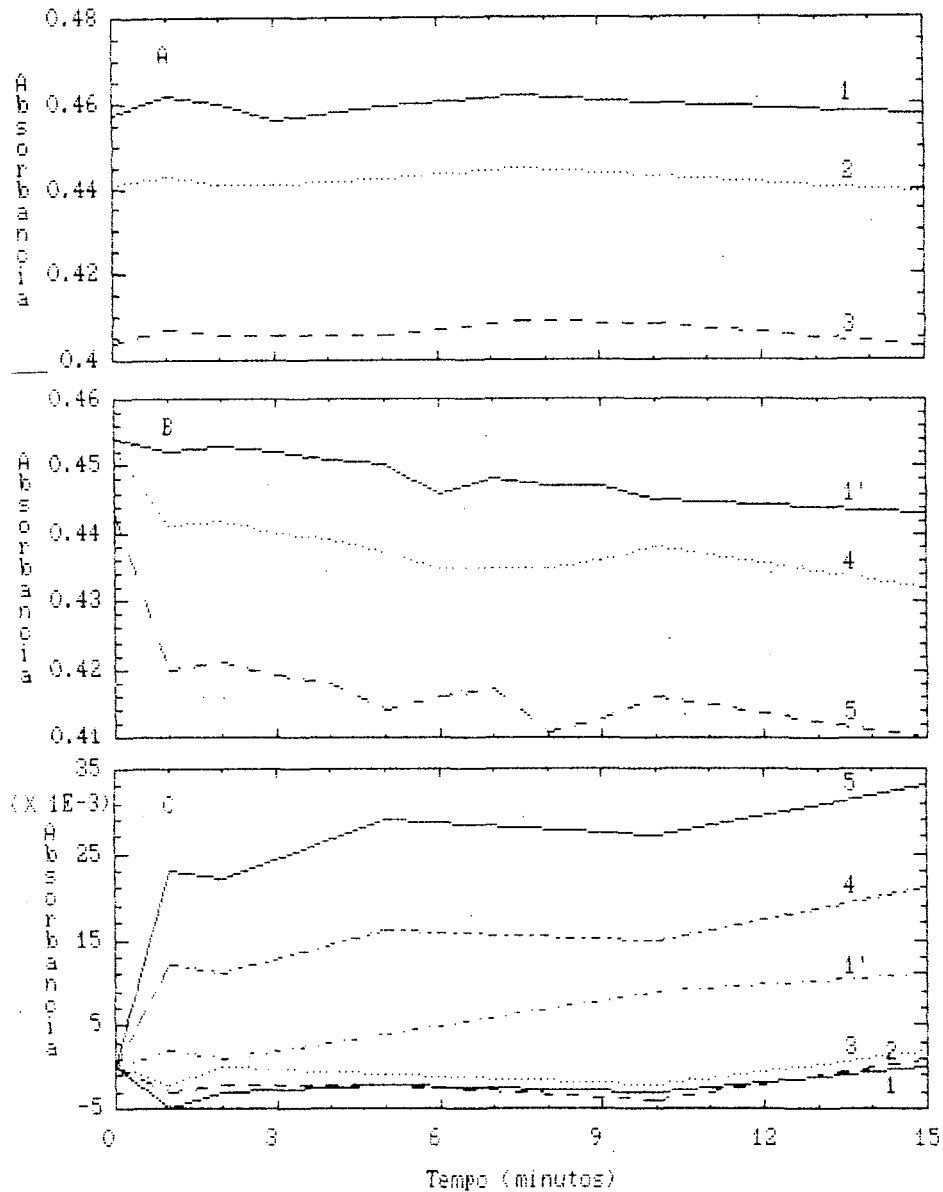


Figura 6. Efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre as propriedades físicas da mitocôndria isolada de fígado de frango de corte. Sistema: tampão manitol 0,25M, TRIS  $10^{-3}$ M, EDTA  $10^{-3}$ M, pH 7,4, 2,7 a 2,9 ml; suspensão de mitocôndria 0,1 ml; MSCA 400 $\mu$ M 0,01 a 0,20 ml. A: 1, controle; 2, 0,0131  $\mu$ moles de MSCA/mg de proteína; 3, 0,0533  $\mu$ moles de MSCA/mg de proteína. B: 1', controle; 4, 0,1662  $\mu$ moles de MSCA/mg de proteína; 5, 0,3627  $\mu$ moles de MSCA/mg de proteína. C: Registro dos valores das diferenças em absorbância das curvas experimentais em A e B, medidas a 600 nm. Intensidade da turbidez medida imediatamente após a adição de MSCA e durante 15 minutos.

#### IV. DISCUSSÃO

Os resultados de experimentos preliminares sobre os parâmetros físico-químicos da MSCA concordam com os dados encontrados na bibliografia. Confirmaram a ocorrência de um pico de absorvância em 355 nm (Figura 4), e solubilidade linear até uma concentração de 20  $\mu$ M (Figura 5), com forte tendência a precipitar em solução saturada ( $1,4 \times 10^{-3}$ M), atingindo o equilíbrio somente após 20 horas, a temperatura ambiente (BEAUDET et alli, 1951; SOBOTKA et alli, 1957).

A ação da MSCA sobre a absorvância da suspensão de mitocôndria (Figura 6) é provavelmente explicada pelo efeito de peroxidação de ácidos graxos insaturados da membrana, conforme sugerido por SINGAL et alli (1981).

Em experimento realizado com o objetivo de verificar a absorção da MSCA pela mitocôndria através de espectrofotometria, observou-se que após a adição da droga, não foi possível tornar a solução novamente límpida, por centrifugação. Após a centrifugação, o meio permaneceu turvo, impossibilitando a leitura espectrofotométrica. Houve aparentemente alguma alteração na suspensão de mitocôndria em decorrência da adição da MSCA ao sistema.

A atividade respiratória da mitocôndria hepática, frente a diferentes concentrações de MSCA, medida em



respirômetro de Warburg mostra uma tendência inibitória, porém não significativa, aparentemente explicada pelas alterações físico-químicas produzidas pela MSCA quando adicionada a suspensões de mitocôndria (Figura 6).

No caso da mitocôndria cardíaca, é necessária uma análise cuidadosa dos resultados. Quando comparada qualitativamente, a atividade mitocondrial parece ser inibida em presença da MSCA. Contudo, ao se avaliar o efeito de doses crescentes de MSCA, verifica-se um incremento da atividade respiratória da mitocôndria, diretamente proporcional ao aumento da concentração de MSCA, com uma equação de regressão linear significativa ao nível de 10%. Essa atividade, porém, sempre se mantém abaixo daquela observada na ausência da droga, ainda que com percentuais de inibição inferiores a 15%. Diante desses dados, deve-se concluir que a MSCA na realidade não apresenta efeito específico sobre a atividade respiratória da mitocôndria cardíaca, medida em respirômetro de Warburg.

Também quando se mede o efeito da MSCA sobre a respiração da mitocôndria por polarografia com eletródio de oxigênio, observa-se que a mitocôndria hepática, apesar de mostrar tendência à inibição, não apresenta resposta consistente com a concentração de MSCA, resultando em curva de regressão linear não significativa. Apenas nos experimentos com pré-incubação da mitocôndria em presença da MSCA é que se observa um marcado efeito inibitório, da ordem de 30%.

No caso da mitocôndria cardíaca, parece igualmente não haver um efeito específico da droga sobre a atividade respiratória medida por polarografia. Efeitos de inibição se

alternam com eventos onde parece haver estímulo, porém em nenhum caso ocorre influência superior ao nível de 15%, o mesmo se aplicando aos experimentos de pré-incubação.

Em ambos os casos é permitido comparar os resultados com os experimentos levados a efeito em respirômetro de Warburg. Neste último, o tempo de contato da MSCA com a mitocôndria é bem mais prolongado, cerca de 60 a 90 minutos, do que nos experimentos polarográficos. Neste caso, somente nos experimentos onde ocorreu pré-incubação da MSCA com a mitocôndria é que se constatou inibição da atividade respiratória. Esses fatos todos estão de acordo com o achado de que soluções de MSCA adicionadas a suspensões de mitocôndria hepática alteram o seu comportamento físico-químico, provavelmente por uma ação sobre a membrana, ainda não identificada (Figura 6).

STANGL (1951) confere à MSCA um efeito catalisador dos processos de óxido-redução, sem contudo especificar os sistemas enzimáticos envolvidos. Tal afirmação estaria, a princípio, em desacordo com as observações do presente trabalho. HOFFER (1957) porém afirma que a MSCA se mostrou inerte em relação ao metabolismo cerebral *in vitro*. Esta observação concorda com os resultados aqui obtidos.

Considerando a ação do adrenocromo propriamente dito, constata-se que GREEN & RICHTER (1937) e KISCH (1947) afirmam que o adrenocromo teria efeitos catalisadores sobre vários sistemas enzimáticos, enquanto WOODFORD (in HOFFER, 1957) afirma que o adrenocromo inibe o metabolismo da glicose, do piruvato, do succinato e do malato no metabolismo cerebral *in vitro*.

Anteriormente, RANDALL (1946) e MEYERHOF & RANDALL (1948) demonstraram também efeito inibitório sobre a glicólise anaeróbica de tecido cerebral *in vitro*. Entretanto, tais eventos se referem ao adrenocromo e não ao seu derivado mono-semi-carbazona. A dissociação deste composto *in vitro* não é descrita na bibliografia, mas parece pouco provável que ocorra, frente às observações de sua estabilidade e baixa solubilidade em solventes polares (BEAUDET et alli, 1951; SOBOTKA et alli, 1957; HEACOCK, 1959).

A análise dos resultados, mostrando ausência de correlação entre concentração de MSCA e grau de inibição da atividade respiratória da mitocôndria, tanto cardíaca como hepática, sugere que a tendência inibitória observada talvez se deva a uma alteração qualitativa na mitocôndria, em termos estruturais, o que viria a comprometer parcialmente sua eficiência. Tal alteração pode ter sua explicação na oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas mitocondriais interna e externa (SINGAL et alli, 1982).

Esses efeitos poderiam ser melhor estudados fazendo-se o acompanhamento das alterações ultra-estruturais da mitocôndria através de microscopia eletrônica. Da mesma forma, experimentos com sistemas enzimáticos isolados possibilitariam identificar em que ponto ocorre essa provável ação da MSCA.

Procede ainda observar que uma suscetibilidade aumentada da mitocôndria a alterações estruturais pode ter sido resultante do procedimento de preparação da suspensão de mitocôndria, visto que o procedimento empregado foi descrito para ensaios com mitocôndria de animais de laboratório. Essa

possibilidade é considerada pelo fato de não ter sido obtida nenhuma preparação de mitocôndria de frango de corte que respondesse a um sistema de estudo de fosforilação oxidativa. Tal estudo é relatado por BROWN et alli (1986), utilizando também um eletrodio de oxigênio de Clarke, porém a relação ADP/O obtida por esses autores varia na faixa de 1,00 a 1,07, com ácido succinico como substrato. Tais valores sugerem uma preparação mitocondrial desacoplada, visto que a estequiometria da relação ADP/O na fosforilação oxidativa, tendo o succinato como substrato, aponta para valores na faixa de 1,71 (LEMASTERS, 1984). BROWN et alli (1986) mencionam ainda que tal estudo com mitocôndria de frangos de corte ainda não havia sido levado a efeito.

Nos experimentos em que se avaliou a performance produtiva de frangos de corte frente a diferentes doses de MSCA e diferentes vias de administração, uma importante tendência geral observada é a da maior sensibilidade dos machos aos efeitos da droga. Essa se deve, muito provavelmente, à acentuada diferenciação na taxa de crescimento entre os dois sexos, como pode ser apreciado pelos pesos finais, ganhos de peso diário e conversão alimentar alcançados por machos e fêmeas sujeitos ao mesmo tratamento. As fêmeas só responderam à administração da MSCA através da ração, com redução na mortalidade, significativa ao nível de 10%. Observou-se uma mortalidade mínima com a dose mais baixa de MSCA (1,275 ppm). Porém, mesmo os níveis mais altos ainda propiciaram mortalidade inferior àquela observada nos lotes que não receberam a droga, denotando um efeito protetor da MSCA em relação às agressões normais de campo.

No caso dos machos, aqueles que receberam a MSCA por via intramuscular ao nível de 0,070 mg/kg de peso vivo, apresentaram peso médio superior aos outros grupos, distanciando-se significativamente daqueles que receberam a dose mais alta (0,105 mg/kg). Possivelmente, resultados mais expressivos poderiam ter ocorrido caso a droga fosse administrada com maior frequência, pois tende a permanecer por pouco tempo na circulação, parte dela sendo excretada de forma inalterada (FISCHER & LECOMTE in HOFFER, 1957). SOBOTKA et alli (1957) mencionam que, em seres humanos, a MSCA, com finalidade hemostática, pode ser injetada em intervalos de até duas horas sem que apareçam efeitos colaterais. HAGERTY et alli (1951), referindo-se ao uso em seres humanos como hemostático, também citam que a droga é bem tolerada pelos pacientes, não tendo esses autores encontrado qualquer efeito colateral.

Dos machos tratados com MSCA através da água de bebida, aqueles que receberam a dose mais baixa, de 0,585 mg/l, apresentaram peso médio final e ganho de peso diário, determinado nos períodos de 21 a 42 dias e de 1 a 42 dias, superiores aos dos grupos que não receberam a droga e que receberam 1,170 mg/l, diferindo significativamente ao nível de 5% dos resultados dessas variáveis no grupo que recebeu a dose mais alta, de 2,340 mg/l de água. Também a conversão alimentar de 21 a 42 dias se comportou de maneira semelhante, porém com um nível de significância de 10%.

Quanto à administração da droga através da ração, observa-se que, considerado o período de 21 a 42 dias, os machos apresentaram mortalidade significativamente superior, ao nível

de 10%, no nível mais alto da droga (5,100 ppm). Já o índice de produção apresentou melhor resultado ao nível de 2,550 ppm, diferindo estatisticamente, ao nível de 10%, daquele referente ao nível mais alto. Considerando o período total de criação, de 1 a 42 dias, a conversão alimentar e o índice de produção dos machos tratados com a dose média, de 2,550 ppm de MSCA, foram superiores aos dos outros grupos, diferindo estatisticamente, ao nível de 10%, dos resultados para essas variáveis do grupo que recebeu a dose mais alta, de 5,100 ppm.

Avaliando em conjunto os resultados obtidos nos três experimentos, verifica-se que há uma tendência a uma melhoria na performance dos frangos de corte tratados com doses mais baixas da MSCA. Por outro lado, parece haver também um efeito tóxico da droga quando administrada em doses mais altas, variando esses valores com a via de administração. Provavelmente, também o grau de atividade metabólica do organismo em questão interfere com os efeitos da droga, o que explicaria a diferença de resposta entre machos e fêmeas.

Vale ressaltar que, apesar de o nível de 10% de significância ser normalmente desconsiderado, os resultados obtidos apresentam grande consistência em termos de relação entre dose e efeito, sugerindo a existência de um efeito específico da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre o desempenho produtivo de frangos de corte.

O aparente benefício proveniente da administração de doses mais baixas de MSCA é condizente com os efeitos positivos mencionados por STANGL (1951), de estímulo dos processos de óxido-redução, de inibição da glicólise, de elevação na taxa de

oxidação do ácido lático e de aceleração da síntese do glicogênio.

Apesar de não ser possível a extrapolação dos dados observados *in vitro* para aqueles obtidos nos experimentos *in vivo*, é interessante ressaltar a semelhança na tendência de resposta às concentrações crescentes da droga. Suspensões de mitocôndria hepática e cardíaca se mostraram inertes, ou mesmo sofreram pequeno estímulo em sua atividade metabólica, quando as concentrações de MSCA eram baixas; animais intactos tiveram melhor performance quando a dose de MSCA empregada foi baixa. Em caso de concentrações altas, as suspensões de mitocôndria sofreram inibição de atividade e alteração de propriedades físico-químicas, enquanto os animais apresentaram pior desempenho, com aumento inclusive da mortalidade.

Talvez o efeito do adrenocromo mencionado por KISCH (1947), de estímulo da oxidação em vários tecidos e células, especialmente no fígado e no rim, onde está provavelmente relacionado com o catabolismo de aminoácidos, também tenha participação no aumento da eficiência produtiva do frango de corte. Essa possibilidade é reforçada pelo fato de que o derivado mono-semi-carbazona aparentemente não perde a estrutura de ion anfótero, o que permite sua participação em processos de transferência de um elétron, e pelo fato de que fígado e rim parecem ter especial significado no metabolismo protéico nas aves, em virtude de particularidades circulatórias e do fato de serem animais uricotélicos (BOORMAN & LEWIS in BELL & FREEMAN, 1971).

Os resultados aqui expostos apresentam paralelismo com aqueles observados por CUNNINGHAM (1963). Este autor, estudando o efeito da adrenalina, da noradrenalina e da nicotina, obteve pequenos efeitos de melhoria na performance de frangos de corte com as doses mais baixas de adrenalina (0,02 e 0,10 mg/kg.dia de peso vivo por via subcutânea), enquanto doses mais altas (0,20 e 0,50 mg/kg.dia) provocaram reduções na taxa de crescimento. O autor cita, em sua revisão, que a adrenalina estimularia a liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo, mantendo altos níveis de ácidos graxos livres e glicose circulantes. A nicotina foi empregada por sua capacidade de estimular a liberação de adrenalina no organismo. Administrada na ração em níveis de 2,5 e 5,0 ppm produziu aumentos significativos na taxa de ganho de peso em relação ao nível de 1,25 ppm ( $P < 0,05$ ) e ao nível de 0,0 ppm ( $P < 0,01$ ). Considerando-se os fatos aqui analisados, não se pode descartar a possibilidade de que tais efeitos sejam produzidos pelo adrenocromo produzido a partir da oxidação da adrenalina injetada ou endógena.

O aparente efeito tóxico, observado quando da administração de doses mais altas da droga, pode ter sua origem na atividade inibitória do adrenocromo sobre alguns sistemas enzimáticos, principalmente sobre o metabolismo cerebral (RANDALL, 1946; MEYERHOF & RANDALL, 1948; WOODFORD in HOFFER, 1957). Também alterações comportamentais, como as descritas por HOFFER (1957), ainda que trabalhando com outras espécies, podem ser a causa para uma baixa performance produtiva. Aliás, segundo DENBOW et alli (1981), altas concentrações de catecolaminas são encontradas no sistema nervoso central, a adrenalina parecendo



estar envolvida na regulação da temperatura corporal e da ingestão de alimentos.

Uma possível causa para a baixa performance, que se verifica quando da administração de altas doses de MSCA, pode estar nos efeitos produzidos pelos radicais livres formados através da redução do adrenocromo, que, transferindo um elétron ao oxigênio molecular, formam o ânion superóxido. Esses efeitos se traduzem basicamente pela citotoxicidade desses radicais, que podem interferir com o DNA (SVINGEN & POWIS, 1981; PRABHANANDA et alii, 1985), ou levar à peroxidação dos fosfolípidios das membranas celulares e de organelas, com alteração de sua permeabilidade. Este efeito parece ser mais pronunciado sobre o miocárdio (SINGAL et alii, 1982; MATTHEWS et alii, 1985).

Também efeitos do adrenocromo sobre a atividade cardíaca são relatados. KISCH (1947) já menciona uma redução na frequência cardíaca e na contratilidade do miocárdio, bem como retardo na condutividade átrio-ventricular. Mais recentemente, a ação de redução da contratilidade do miocárdio foi confirmada por vários autores. Porém WHEATLEY et alii (1985) afirmam que os efeitos deletérios celulares seriam provocados pela própria adrenalina, enquanto o adrenocromo só apresentaria o efeito inotrópico negativo, além de vasoconstrição arterial coronária, a partir de uma concentração de  $10^{-4}M$ . É possível que tal concentração tenha sido atingida nos tratamentos com doses mais altas da droga.

JANATOVA et alii (1986) não observaram porém qualquer efeito do adrenocromo sobre o coração de embrião de pinto, afirmando inclusive que, não tendo observado elevação no nível

de AMPc, é possível concluir que o adrenocromo comercial não estimula os beta-receptores no coração embrionário. Mencionam ainda a inexistência de dados que expliquem possíveis diferenças ontogênicas no metabolismo do adrenocromo, citando apenas o trabalho de FISHER & LECOMTE (1951) sobre diferenças interespecíficas nesse metabolismo.

As considerações a respeito dos efeitos do adrenocromo são procedentes pois na bibliografia disponível não há ainda uma definição sobre a possível hidrólise da MSCA no organismo. Apenas FISCHER & LECOMTE (in HOFFER, 1957) citam que a MSCA não é hidrolisada no organismo, cerca de um quarto da droga administrada sendo eliminado de forma inalterada.

Deve ser ainda considerada a possibilidade de a MSCA, caso hidrolisada, venha a produzir no organismo adrenolutina, produto de oxidação do adrenocromo. Esse produto, segundo HOFFER (1957) é duas vezes mais ativo do que o adrenocromo, com ação antimitótica, produzindo hipotermia e outras alterações quando injetado nos ventrículos de gatos. O autor afirma ainda que, ao contrário do adrenocromo, a adrenolutina pode acelerar o consumo de oxigênio na respiração do tecido cerebral *in vitro*.

Quanto a possíveis efeitos tóxicos da MSCA, a bibliografia disponível se mostra bastante restrita. BACQ (1947) afirma que esse composto não apresenta qualquer ação simpaticomimética sobre o coração e sobre a musculatura lisa, e HOFFER (1957) cita que a MSCA não tem efeito específico sobre o padrão de construção da teia de aranha e é inerte sobre o metabolismo cerebral *in vitro*. Quanto à formação de radicais livres, segundo FRABHANANDA et alli (1985), a redução do

adrenocromo ocorreria na posição cinco. Esta é porém a posição de ligação do radical carbazona, o que leva a crer que a MSCA não apresenta o potencial citotóxico decorrente da formação de radicais livres.

Os dados aqui discutidos mostram que parece haver realmente um efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo sobre o metabolismo de frangos de corte. Esse efeito é possivelmente resultante de múltiplas ações da droga, atuando em vários níveis metabólicos, desde o subcelular. Parece, contudo, que maiores esclarecimentos sobre o efeito da MSCA sobre o metabolismo de frangos de corte dependem de um estudo mais aprofundado dos vários possíveis sítios de ação da droga, isoladamente, buscando alterações na atividade do fígado, do rim, do sistema nervoso central, do coração e da musculatura esquelética.

Vale acrescentar ainda, que além dos fatos ligados ao desempenho de frangos de corte estudados aqui, o mais claro efeito da MSCA até agora encontrado, foi o demonstrado no presente trabalho, de que este derivado do adrenocromo exerce ação, ainda não esclarecida, sobre a mitocôndria isolada de fígado de frango de corte, alterando o seu comportamento físico-químico quando em suspensão em tampão manitol 0,25M, EDTA  $10^{-3}$ M e TRIS  $10^{-3}$ M, pH 7,4, efeito este que se torna evidenciável quando a relação MSCA/proteína mitocondrial ultrapassa 0,1662  $\mu$ moles/mg prot., determinando inibição da respiração mitocondrial frente a succinato, em experimentos polarográficos ou em respirômetro de Warburg. Até que ponto, contudo, esses dados podem ser extrapolados para os experimentos *in vivo* é um fato ainda a ser esclarecido.

## V. SUMARIO

Este estudo foi planejado com o objetivo de verificar o efeito da mono-semi-carbazona do adrenocromo (MSCA), um derivado estável do adrenocromo, sobre o metabolismo de frangos de corte, machos e fêmeas. A MSCA foi pouco pesquisada em termos de sua atividade sobre o organismo animal, inexistindo estudos da ação dessa substância em frangos de corte. Os efeitos da MSCA sobre o metabolismo de frangos de corte foram avaliados através da performance produtiva das aves e por acompanhamento da atividade respiratória de mitocôndria isolada de fígado e de coração. A atividade mitocondrial foi medida por duas técnicas, a técnica respirométrica de Warburg e a polarografia com eletródio de oxigênio. Os resultados obtidos foram analisados por regressão linear. A avaliação da performance dos frangos de corte foi realizada em três experimentos distintos, onde as aves receberam a MSCA por via intramuscular, através da água, e através da ração. As variáveis consideradas foram peso médio, ganho de peso diário, conversão alimentar, mortalidade e índice de produção. Os resultados foram avaliados considerando-se um período de 1 a 21 dias, um período de 21 a 42 dias e o período total, de 1 a 42 dias. O tratamento estatístico empregado foi análise de variância e teste de Tukey. Os resultados mostram efeito inibitório da MSCA sobre a atividade respiratória da

mitocôndria tanto cardíaca como hepática, inferior a 15%. Observa-se ainda que não há relação significativa entre atividade mitocondrial e concentração de MSCA no sistema. Foi possível evidenciar, contudo, que a MSCA, em solução aquosa, altera as propriedades físico-químicas da mitocôndria hepática suspensa em Manitol 0,25 M, TRIS  $10^{-3}$  M e EDTA  $10^{-3}$  M, pH 7,4. Nos experimentos *in vivo* observa-se maior sensibilidade dos machos frente à MSCA. Existe diferença significativa, ao nível de 5% quando da administração da MSCA através da água, e de 10% quando através da ração ou injetável, entre os resultados obtidos com os níveis inferiores da droga e os referentes ao nível mais alto. Os níveis empregados foram respectivamente: 0,035; 0,070 e 0,105 mg/kg de peso vivo por via parenteral; 0,585; 1,170 e 2,340 mg/l de água; e 1,275; 2,550 e 5,100 mg/kg de ração. Observa-se uma tendência a uma melhor performance quando da utilização de níveis menores da droga, porém surge uma aparente toxidez nos níveis mais altos.

## ABSTRACT

The present study was undertaken to verify the possible effects of the adrenochrome monosemicarbazone (MSCA) on the metabolism of broilers, through their productive performance and the measurement of the respiration rates of broilers liver and heart muscle isolated mitochondria. The MSCA was administered to the experimental animals either by means of intramuscular injection or through the drinking water or through the daily diet. For the measurement of the respiratory activity of mitochondria, the Warburg manometric respirometer and the polarographic method were employed. Results showed a slight inhibitory action of the adrenochrome monosemicarbazone, but the mitochondrial response was not proportional to the concentration of the drug, according to the linear regression analysis. Also an effect on the physico-chemical properties of the mitochondria appeared after the addition of adrenochrome monosemicarbazone, with a sharp decrease in the absorbancy of the mitochondrial suspension, with 0.1662  $\mu\text{mols/mg}$  protein. The levels of adrenochrome monosemicarbazone employed *in vivo* were 0,035; 0,070 and 0,105 mg/kg BW in intramuscular injections; 0,585; 1,170 and 2,340 mg/l water; and 1,275; 2,550 and 5,100 ppm in the diet. Male broilers showed a greater sensitivity to the drug. Better results in weight gain, final weight and feed

conversion were obtained with the lower levels of the adrenochrome monosemicarbazone, in the three different treatments. However, a toxic effect seems to occur with the higher levels of MSCA, causing poorer performance and even increased mortality. There are significant differences between the results obtained with the lower levels and those with the higher ones. Differences were greater when the birds received the drug through the water ( $P < 0,05$ ) than in the other two treatments.

## VI. CONCLUSOES

1. A mono-semi-carbazona do adrenocromo exerce ação sobre as propriedades fisico-químicas da mitocôndria isolada de fígado de frango de corte, evidenciável pela modificação da absorvância da suspensão dessa organela em meio contendo Manitol 0,25 M, TRIS  $10^{-3}$  M e EDTA  $10^{-3}$  M, pH 7,4.
2. O efeito que a MSCA exerce sobre as propriedades fisico-químicas da mitocôndria isolada de fígado de frango de corte em suspensão em tampão Manitol-TRIS-EDTA, é evidenciável em sistemas onde a relação molar de MSCA por mg de proteína é equivalente a 0,1662  $\mu$ moles de MSCA/mg de proteína.
3. Em experimentos desenhados para medir o desaparecimento de MSCA de sistemas em que esse composto era adicionado a suspensões de mitocôndria cardíaca e hepática, não foi possível estabelecer os valores relativos a esse fenômeno em razão da interferência da turbidez que se estabelecia nos sobrenadantes obtidos após centrifugação por 10 minutos a 11300 G.



4. O estudo da ação da MSCA sobre a respiração da mitocôndria isolada de fígado e de coração de frango de corte, tanto em respirômetro de Warburg como em medida polarográfica com eletródio de oxigênio, mostrou resultados pouco evidentes de tal efeito.
5. Em experimentos de pré-incubação de mitocôndria hepática com MSCA foi possível evidenciar efeito inibitório de cerca de 33% na respiração com succinato como substrato, medida por polarografia.
6. Em experimentos destinados a medir o efeito da MSCA sobre a fosforilação oxidativa de mitocôndria de músculo cardíaco e de fígado, não se obteve clara evidência de estímulo no consumo de oxigênio em razão de adição de ADP ao sistema.
7. De modo geral, as preparações de mitocôndria de fígado e de músculo cardíaco mostraram características de preparações desacopladas.
8. Em experimentos com respirômetro de Warburg, mitocôndria hepática e de músculo cardíaco mostraram valores médios de  $QO_2$  de 57,26 e 52,47 respectivamente, medidos como  $\mu l O_2/mg$  de proteína.hora<sup>-1</sup>. Em polarografia com eletródio de oxigênio, os valores obtidos foram, respectivamente, 0,206 e 0,810 nmoles  $O_2/seg.mg$  prot., ou 16,61 e 65,32  $\mu l O_2/mg$  prot. hora<sup>-1</sup>.

9. Em concentrações variando de 0,0236 a 0,1100  $\mu$ moles de MSCA/mg prot., os valores de  $QO_2$  de mitocôndria hepática mostraram inibição variando de 9,97 a 26,47%, e os de mitocôndria de músculo cardíaco, de 2,48 a 13,53%. Na medida polarográfica, em concentrações variando de 0,0059 a 0,0444  $\mu$ moles de MSCA/mg prot., o consumo de oxigênio de mitocôndria hepática mostrou inibição de 4,68 a 19,53%. A mitocôndria de músculo cardíaco apresentou momentos de inibição alternados com momentos de aparente estímulo, porém nenhum dos efeitos superou o nível de 15%. Em nenhum desses eventos houve relação significativa entre variação de atividade respiratória e concentração de MSCA.
10. Frangos de corte machos tratados com MSCA por via intramuscular, ao nível de 0,070 mg/kg de peso vivo, apresentaram peso final, aos 42 dias, significativamente superior, ao nível de 10%, ao daqueles tratados com 0,105 mg/kg de peso vivo.
11. Frangos de corte machos, tratados com MSCA através da água de bebida, apresentaram peso médio aos 42 dias, ganho de peso diário de 21 a 42 dias e de 1 a 42 dias ( $P < 0,05$ ) e conversão alimentar de 21 a 42 dias ( $P < 0,10$ ), ao nível de 0,585 mg/l de água, significativamente superiores àqueles correspondentes às aves que receberam 2,340 mg/l de água.

12. Frangos de corte fêmeas, tratados com 1,275 ppm de MSCA através da ração, apresentaram mortalidade, de 21 a 42 dias e de 1 a 42 dias, significativamente inferior ( $P < 0,10$ ) àquela das aves que não receberam a droga.
  
13. Frangos de corte machos, tratados com MSCA através da ração, apresentaram mortalidade, de 21 a 42 dias e de 1 a 42 dias, significativamente superior ( $P < 0,10$ ) para o nível de 5,100 ppm; o índice de produção para o período de 21 a 42 dias, na dose de 2,550 ppm, foi significativamente superior ( $P < 0,10$ ) àquele observado com 5,100 ppm de MSCA; a conversão alimentar e o índice de produção do período de 1 a 42 dias, com a dose de 2,550 ppm, foram significativamente superiores ( $P < 0,10$ ) àqueles observados com o nível de 5,100 ppm.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMMING, J.S.; GEMAEL, A.; SOUZA, G.A. & BONA FILHO, A. (1986) *Nutrição Animal*, Editora Nobel, São Paulo, Vol. II, 3ª Edição, 425 pp.
- AXELROD, J. (1964) Enzymic Oxidation of Epinephrine to Adrenochrome by the Salivary Gland. Biochim. et Biophys. Acta 85: 247-254.
- BACQ, Z.M. (1947) La semicarbazone de l'adrenochrome. C.R. Séances Soc. Biol. 141: 536-537.
- BEAUDET, C.; DEBOT, F.; LAMBOT, H. & TOUSSAINT, J. (1951) Experientia 7: 293-294.
- BOORMAN, K.N. & LEWIS, D. (1971) 13. Protein Metabolism. In (BELL, D.J. & FREEMAN, B.M. Editores) *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, Academic Press, Nova York, Vol. 1, 339-367pp.
- BROWN, D.R.; DENISE, S.K. & McDANIEL, R.G. (1986) Hepatic Mitochondrial Activity in two breeds of Chicken. Poultry Science 65 (4): 613-615.
- BULLOUGH, W.B. (1952) J. Endocrinol. 8: 265 apud HOFFER, A. (1957) Epinephrine Derivatives as Potential Schizofrenic Factors. Journal of Clinical and Experimental Psychopathology and Quarterly Review of Psychiatry and Neurology 18 (1): 27-60.
- CUNNINGHAM, H.M. (1963) Effects of Epinephrine, Norepinephrine and Nicotine on Growth and Carcass Composition of Chicks. Poultry Science :1197-1202.
- DALLA VIA, G.J. (1983) Bacterial Growth and Antibiotics in Animal Respirometry. Chapter II.9. In (GNAIGNER, E. & FORSTNER, H. Editores) *Polarographic Oxygen Sensors - Aquatic and Physiological Applications*. Springer Verlag, Nova York, 202-218pp.
- DENBOW, D.M.; CHERRY, J.A.; SIEGEL, P.B. & VAN KREY, H.P. (1981) Eating, Drinking and Temperature Response of Chicks to Brain Catecholamine Injections. Physiology and Behaviour 27 (2): 265-269.

- DEROUAUX, G. (1939) Etude Expérimentale de L'Action Hémostatique de L'Adrenochrome. C.R. Séances Soc. Biol. 131: 830-834.
- ESTABROOK, R.W. (1967) Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP:O Ratios. In (ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. Editores) Methods in Enzymology. Oxidation and Phosphorilation. Academic Press, Nova York, Vol. 10. pp 41-47.
- FATT, I. (1976) Polarographic Oxygen Sensors, CRC Press, Ohio. 278pp.
- FISCHER, P. & LECOMTE, J. (1949) Arch. internat. physiol. 36:327 apud HOFFER, A. (1957) Epinephrine Derivatives as Potential Schizofrenic Factors. Journal of Clinical and Experimental Psychopathology and Quarterly Review of Psychiatry and Neurology 18 (1): 27-60.
- (1951) Metabolisme de l'adrenochrome, de ses produits de reduction et du trihydroxy-n-methyl indol chez le lapin, le chat et le chien. Bull. Soc. Chim. 33: 569 apud JANATOVA, T.; PELOUCH, V.; OSTADAL, B. & KRAUSE, E.G. (1986) The Effect of Oxidized Isoprenaline on the Chick Embryonic Heart. Can. J. Physiol. Pharmacol. 64 (7): 897-903.
- (1951) Metabolisme de l'adrenochrome, de ses produits de reduction et du trihydroxy-n-methyl indol chez le lapin, le chat et le chien. Bull. Soc. Chim. 33: 569 apud NOVAL, J.J.; SOHLER, A.; STACKHOUSE, S.P. & BRYAN, A.C. (1961) Metabolism of Adrenochrome in Experimental Animals. Biochem. Pharmacol. 11: 467-473.
- FRIEDENWALD, J.S.; MICHEL, H. & BUSCHKE, W. (1951) The Adrenochrome Redox system: Addendum The Chemical Oxidation of Epinephrine to Adrenochrome and Higher Oxidation Products. Arch. of Biochem. and Biophys. 32: 382-385.
- GREEN, D.E. & RICHTER, D. (1937) Adrenaline and Adrenochrome. Biochem. J. 31: 596-616.
- GUARNIERI, C.; VENTURA, C.; GEORGOUNTZOS, A.; MUSCARI, C. & BUDINI, R. (1985) Involvement of superoxide radicals on adrenochrome formation stimulated by arachidonic acid in bovine heart sarcolemmal vesicles. Biochim. biophys. Acta 838 (3): 355-360.
- HAGERTY, R.F.; ZAVERTNIK, J.J. & GRIMSON, K.S. (1951) Effect of Adrenoxyl on blood loss from surgical wounds. Arch. Surg. 420: 420-427.
- HARLEY-MASON, J. (1948) The Structure of Adrenochrome and its Reduction Products. Experientia 4: 307-308.

- HEACOCK, R.A. (1959) The Chemistry of Adrenochrome and Related Compounds. Chem. Rev. 59: 181-237.
- HEGEDUS, Z.L. & ALTSCHULE, M.D. (1968) Studies on Aminochromes. III. Transformation of Epinephrine, Adrenochrome and Adrenolutin into Plasma-Soluble Melanins during Incubation in Human Blood Plasma. Arch. Biochem. Biophys. 126: 388-392.
- HOFFER, A. (1957) Epinephrine Derivatives as Potential Schizophrenic Factors. Journal of Clinical and Experimental Psychopathology and Quarterly Review of Psychiatry and Neurology 18 (1): 27-60.
- HORWITZ, W. ed.(1975) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12<sup>a</sup> edição, Washington. 1094pp.
- INGLE, D.J.; SHEPHERD, D.A. & HAINES, W.J. (1948) The Effect of Adrenochrome upon Experimental Glycosuria in the Rat. J. Am. Pharmacol. Assoc. 37: 375-377.
- JANATOVA, T.; PELOUCH, V.; OSTADAL, B. & KRAUSE, E.G. (1986) The Effect of Oxidized Isoprenaline on the Chick Embryonic Heart. Can. J. Physiol. Pharmacol. 64 (7): 897-903.
- JOHNSON, D. & LARDY, H. (1967) Isolation of Liver or Kidney Mitochondria. In ( ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. Editores) Methods in Enzymology. Oxidation and Phosphorilation. Academic Press, Nova York, Vol. 10. pp 94-96.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. (1979) Histologia Básica. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4<sup>a</sup> edição. 495 pp.
- KALYANARAMAN, B.; FELIX, C.C. & SEALY, R.C. (1984) Electron Spin Resonance-Spin Stabilization of Semiquinones Produced during Oxidation of Epinephrine and its Analogues. J. Biol. Chem. 259: 354-358.
- KISCH, B. (1947) Metabolic Effects of Oxidized Suprarenin (Omega, Adrenochrome). Exper. Med. Surg. 5: 166-181.
- KNAPP, W. (1983) A Respirometer for Monitoring Homogenate and Mitochondrial Respiration. Chapter II.8. In (GNAIGNER, E. & FORSTNER, H. Editores) Polarografic Oxygen Sensors - Aquatic and Physiological Applications. Springer Verlag, Nova York, 195-201pp.
- KOELLE, G.B. & FRIEDENWALD, J.S. (1951) The Adrenochrome Redox System. Arch. Biochem. Biophys. 32: 370-381.
- LEMASTERS, J.J. (1984) The ATP-to-Oxygen Stoichiometries of Oxidative Phosphorilation by Rat Liver Mitochondria. J. Biol. Chem. 259 (21): 13123-13130.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1961) Protein Measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MARQUARDT, P. (1947) Die Auf- und Abbaustufen des Adrenalins (in ihrer Bedeutung für Pharmakologie und Physiologische Chemie). Enzymologia 12: 166-187.
- MATTHEWS, S.B.; HENDERSON, A.H. & CAMPBELL, A.K. (1985) The Adrenochrome Pathway: The Major Route for Adrenalin Catabolism by Polymorphonuclear Leucocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 17: 339-348.
- MEYERHOF, O. & RANDALL, L.O. (1948) The Inhibitory Effects of Adrenochrome on Cell Metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 17: 171-182.
- NOVAL, J.J.; SOHLER, A.; STACKHOUSE, S.P. & BRYAN, A.C. (1961) Metabolism of Adrenochrome in Experimental Animals. Biochem. Pharmacol. 11: 467-473.
- PAINE, A.J. & McLEAN, A.E.M. (1974) Role of adrenochrome in aryl-hydrocarbon hydroxylase induction by epinephrine in rat liver cell culture. Biochem. Pharmacol. 23: 1910-1913.
- PRABHANANDA, B.S.; KALYANARAMAN, B. & SEALY, R.C. (1985) Radical anions from one-electron-reduced adrenochrome. Detection identification by electron spin resonance spectroscopy. Biochim. et Biophys. Acta 840 (1): 21-28.
- PREVOST, H.; COTEREAU, H. & PARROT, J.L. (1947) Elévation de la résistance capillaire sous l'influence du leucodérivé de l'iodadrénochrome et de la monosemicarbazone de l'adrénochrome. Société de Biologie: 1043-1046.
- RANDALL, L.O. (1946) The Inhibition of the Anaerobic Glycolysis of Rat Brain by Adrenochrome. J. Biol. Chem. 165: 733-734.
- ROSKAM, J. & DEROUAUX, G. (1944) Interprétation de l'action hémostatique générale des substances sympathicomimétiques et théorie des transmissions neuro-humorales. Arch. Int. Pharmacodyn. 69: 348-360.
- SINGAL, P.K.; KAPUR, N.; DHILLON, K.S.; BEAMISH, R.E. & DHALLA, N.S. (1982) Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. Can. J. Physiol. Pharmacol. 60: 1390-1397.
- SLATER, E.C. (1967) Manometric Methods and Phosphate Determination. In (ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. Editeurs) Methods in Enzymology. Oxidation and Phosphorylation. Academic Press, Nova York, Vol. 10. pp 19-29.
- SMITH, F.G.W. ed. (1974) Handbook of Marine Science. CRC Press, Miami, Vol. I. 627 pp.

- SNYDER, F.H., LEVA, E. & OBERST, F.W. (1947) An Evaluation of Adrenochrome and Iodoadrenochrome Based on Blood Sugar Levels in Rabbits. J. Am. Pharmacol. Assoc. 36: 253-255.
- SOBOTKA, H.; BARSEL, N.; CHANLEY, J.D. (1957) The Aminochromes. Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe 14: 217 - 243.
- STANGL, E. (1951) Klinische Untersuchung über die haemostatische dynamogene und permeabilitaetshemmende Wirkung von Adrenochrom (Adrenoxyl). Praxis 40 (35): 713 - 715.
- SVINGEN, B.A. & POWIS, G. (1981) Pulse Radiolysis Studies of Antitumor Quinones: Radical Lifetimes, Reactivity with Oxygen, and One-Electron Reduction Potentials. Arch. Biochem. Biophys. 209: 119-126.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. (1973) Técnicas e Experimentos de Bioquímica, Editora Guanabara Koogan, São Paulo. 552 pp.
- WABECK, C.J. (1987) The Future of Broiler Processing. Poultry Science Department, University of Maryland.
- WAJZER, J. (1947) Bull. Soc. chim. biol. 29: 237 apud HOFFER, A. (1957) Epinephrine Derivatives as Potential Schizophrenic Factors. Journal of Clinical and Experimental Psychopathology and Quarterly Review of Psychiatry and Neurology 18 (1): 27-60.
- WHEATLEY, A.M.; THANDROYEN, F.T. & OPIE, L.H. (1985) Catecholamine-Induced Myocardial Cell Damage: Catecholamines or Adrenochrome. J. Mol. Cell. Cardiol. 17: 349-359.
- WIESNER, K. (1942) Polarographische Untersuchung des Adrenochroms. Biochem. Z. 313: 48-61.
- WOODFORD, V.R. (1954) Eighth Scientific Session, Western Regional Group, Division of Medical Research, National Research Council, Winnipeg, Manitoba, Canada apud HOFFER, A. (1957) Epinephrine Derivatives as Potential Schizophrenic Factors. Journal of Clinical and Experimental Psychopathology and Quarterly Review of Psychiatry and Neurology 18 (1): 27- 60.