



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**PADRONIZAÇÃO DA MENSURAÇÃO EM MICROPLACA  
DE COMPONENTES SÉRICOS DE OVINOS**

**BIANCA CARDEAL DE SOUZA**

**SALVADOR – BA  
JANEIRO - 2014**

**BIANCA CARDEAL DE SOUZA**

**PADRONIZAÇÃO DA MENSURAÇÃO EM MICROPLACA  
DE COMPONENTES SÉRICOS DE OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

**SALVADOR – BA  
JANEIRO – 2014**

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**BIANCA CARDEAL DE SOUZA**

**PADRONIZAÇÃO DA MENSURAÇÃO EM MICROPLACA  
DE COMPONENTES SÉRICOS DE OVINOS**

**Comissão examinadora:**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Samira Abdallah Hanna**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Oliveira Meira Santos**

---

**Prof. Dr. José Eugenio Guimarães**

---

**Prof. Dr. Bruno Lopes Bastos**

---

**Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela**  
**(orientador)**

**17 de Janeiro de 2014**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e aos espíritos de luz, sempre clareando a mente e os caminhos, tornando tudo possível;

Aos animais, nossos fiéis companheiros e foco de estudo;

À minha mãe, Tatiana, sempre compreensiva e disposta a ajudar, mesmo naqueles momentos de irritação absoluta;

À minha família (especialmente minha avó, D. Lindinalva), colaborando de maneiras inimagináveis para a realização dos trabalhos;

Ao professor Ricardo, pela atenção e dedicação em prol da minha evolução e meu aprendizado, e por fazê-los da forma mais doce que existe;

À CAPES, que incentivou e possibilitou todo o projeto de pesquisa do início ao fim;

Aos colegas e funcionários do Labimuno (Tereza Guedes, Thiago Sousa, Dan Loureiro, Marivaldo Santos, Danilo Alves, Ricardo Caribé, Francisca Soares, Mário, dentre tantos outros), pela incrível ajuda nos experimentos, muitas vezes “salvando” o dia;

E aos amigos (de infância, de estudo, de festa, os gamers, os cosplayers, os próximos, os distantes e todos os grupos que aqui não caberiam), pela imensa compreensão da falta de tempo para dedicar-lhes a devida atenção que merecem – prometo recompensar a todos.

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>	
Tabela 01	Intervalo de referência para ovinos dos analitos utilizados neste trabalho (KANEKO et al., 2008).	16
Tabela 02	Metodologia utilizada para a mensuração de cada analito.	18
Tabela 03	Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de <i>checkerboard</i> do analito glicose em microplaca e cubeta.	20
Tabela 04	Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de <i>checkerboard</i> do analito ureia em microplaca e cubeta.	22
Tabela 05	Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de <i>checkerboard</i> do analito magnésio em microplaca e cubeta.	23
Tabela 06	Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de <i>checkerboard</i> do analito fósforo em microplaca e cubeta.	24
Tabela 07	Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de <i>checkerboard</i> do analito cloretos em microplaca e cubeta.	25
Tabela 08	Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de <i>checkerboard</i> do analito cálcio em microplaca e cubeta.	26
Tabela 09	Índices de correlação de Pearson dos <i>checkerboards</i> utilizados em cada analito. Em negrito, os índices de correlação de Pearson das metodologias escolhidas.	30
Tabela 10	Índice de correlação de Pearson (1 – padronização inicial com seis amostras; 2- padronização com o teste de melhor correlação, utilizando 40 amostras) entre os valores obtidos para as amostras na metodologia original e as metodologias de escolha, repetibilidade (%), reprodutibilidade (%) e o limite mínimo de detecção (mEq/L para os cloretos e mg/dL para os demais) do ensaio de escolha.	31
Tabela 11	Descrição da diminuição do uso de reagentes e do custo de reagente por teste de cada amostra (levando em consideração preços médios comerciais dos kits utilizados) na comparação entre a metodologia original e a metodologia desenvolvida para mensuração de cada analito.	39

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 01	Esquema para a determinação de intervalos de referência segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (adaptado de FERREIRA E ANDRIOLO, 2008).	15
Figura 02	Esquema de <i>checkerboard</i> utilizado para testar as combinações de volumes dos reagentes e amostras. Cada cor representa uma combinação diferente.	19
Figura 03	Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de glicose testando concentrações decrescentes do padrão.	32
Figura 04	Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de ureia testando concentrações decrescentes do padrão.	34
Figura 05	Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de cloretos testando concentrações decrescentes do padrão.	35
Figura 06	Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de magnésio testando concentrações decrescentes do padrão.	36
Figura 07	Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de fósforo testando concentrações decrescentes do padrão.	37
Figura 08	Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de cálcio testando concentrações decrescentes do padrão.	38

## SUMÁRIO

<b>Padronização da mensuração em microplaca de componentes séricos de ovinos.</b>	<b>Página</b>
Resumo	01
Abstract	02
1. Introdução	03
2. Objetivos	04
2.1. Objetivos gerais	04
2.2. Objetivos específicos	04
3. Revisão de literatura	05
3.1. A importância da ovinocultura	05
3.2. Componentes séricos e sua importância	06
3.2.1. Glicose	07
3.2.2. Ureia	08
3.2.3. Íons cloreto	09
3.2.4. Íons magnésio	10
3.2.5. Íons fosfato e cálcio	11
3.3. Valores de referência	12
3.3.1. Determinação de intervalos de referência	14
4. Material e Método	17
4.1. Amostras utilizadas	17
4.2. Mensuração dos analitos	17
4.2.1. Mensuração de glicose	20
4.2.2. Mensuração de ureia	21
4.2.3. Mensuração de magnésio	22
4.2.4. Mensuração de fósforo	23
4.2.5. Mensuração de cloretos	24
4.2.6. Mensuração de cálcio	26
4.2.7. Determinação da repetitividade, reprodutibilidade e linearidade	27

4.3. Análises matemáticas e estatísticas	27
<b>5. Resultados e Discussão</b>	<b>29</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>41</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>42</b>



## RESUMO

A ovinocultura é uma atividade pecuária em crescente expansão no Brasil, sendo a região Nordeste a de maior potencial para o aumento de produção. Contudo, a sanidade dos rebanhos ainda é deficiente, havendo uma eminente necessidade de aumentar o monitoramento do rebanho, seja através de medidas profiláticas ou pelo diagnóstico precoce de enfermidades. As mensurações séricas de metabólitos são métodos tradicionais e seguros, que auxiliam os clínicos na monitoração dos rebanhos, utilizando-se como base os intervalos de referência. O presente estudo tem como objetivo padronizar técnicas de mensuração dos metabólitos séricos glicose, ureia, cloretos, magnésio, fósforo e cálcio em microplacas, para desenvolvimento de ensaios mais baratos e práticos, auxiliando na determinação de intervalos de referência regionais. Foram utilizados soros de 40 ovinos das raças Dorper e Santa Inês clinicamente sadios. As mensurações foram feitas utilizando kits comerciais, através de ensaios convencionais e usando técnicas propostas como referências. Os ensaios em microplaca foram escolhidos de acordo com suas respectivas correlações de Pearson, sendo posteriormente testadas para definição de repetitividade, reprodutibilidade e linearidade. Todos os ensaios desenvolvidos e padronizados apresentaram performance confiável, representando uma possibilidade de emprego em experimentos para determinação de valores de referência, bem como para animais com difícil obtenção de amostras sanguíneas.

**Palavras-chave:** Metabólitos séricos, bioquímica clínica, ovinos, microplacas.

## ABSTRACT

Sheep breeding is an expanding livestock industry in Brazil, and the Northeast region has the highest potential for this kind of economic activity. However, herd's health maintenance is still deficient, and there is a perceived need to increase health monitoring, through prophylactic or disease early diagnosis measures. Serum measurements of metabolites are traditional and safe methods which assist clinicians in monitoring of flocks through the use of reference ranges. The present study aimed to standardize the measurement of the serum metabolites glucose, urea, chloride, magnesium, phosphorus and calcium in microplates, to develop cheaper and practical testing techniques. Sera from 40 Dorper and Santa Inês clinically healthy sheep were used, and measurements were made using commercial kits. Microplates assays were chosen according to their respective Pearson correlations and subsequently tested for repeatability, reproducibility and linearity. All developed and standardized tests showed reliable performance, represented a chance for employment in experiments to determine reference values, as well as for animals in which it is difficult to obtain blood samples.

**Keywords:** Serum metabolites, clinical chemistry, ovine species, microplates.

## 1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura de corte no Brasil encontra-se atualmente em expansão, sendo que na região Nordeste os cruzamentos entre as raças Dorper e Santa Inês são um dos responsáveis pelo crescimento econômico, graças à boa adaptabilidade e à conformação de carcaça (CARNEIRO et al, 2007).

Sendo assim, aumentou-se o interesse na produção de carne ovina e, conseqüentemente, no monitoramento da sanidade do rebanho, utilizando diversas ferramentas como auxiliares no diagnóstico clínico, tais como a determinação de componentes séricos (componentes hemato-bioquímicos) (PEIXOTO e OSÓRIO, 2007).

A maioria dos testes bioquímicos disponíveis para os animais domésticos utiliza um método de quantificação unitário (mede-se apenas uma amostra por vez) e o volume dos reagentes utilizados nas mensurações unitárias é bastante elevado.

Tendo em vista a crescente importância dos exames bioquímicos na medicina veterinária e a necessidade de aumentar a eficácia dos exames laboratoriais e de reduzir os custos dos mesmos, fez-se necessário a realização do presente trabalho, onde se propõe a realização dos ensaios em microplacas, utilizando-se uma quantidade menor de reagentes e de amostra, barateando e reduzindo o tempo de análise para grandes grupos de amostras na determinação da concentração de diversos analitos séricos para a espécie ovina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Padronizar testes de mensuração bioquímica sérica em microplaca para ovinos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Padronizar a mensuração em microplaca de glicose para ovinos.

Padronizar a mensuração em microplaca de ureia para ovinos.

Padronizar a mensuração em microplaca dos eletrólitos cálcio, fósforo, magnésio e cloretos para ovinos.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. A importância da ovinocultura**

A ovinocultura no Brasil é uma alternativa de exploração pecuária que vem alcançando grande desenvolvimento, principalmente quanto à produção de carne (CRUZ, 2009). O rebanho ovino brasileiro é relativamente pequeno em comparação ao rebanho e outros países criadores, tais como China, Austrália, Índia, Irã e Sudão, que possuem, respectivamente, cerca de 157, 100, 62,5, 54 e 48 milhões de cabeças (ANCO, 2014). O Brasil possui em torno de 17 milhões de cabeças e, aproximadamente, 49% deste contingente encontra-se na região Nordeste, sendo o estado da Bahia detentor de cerca de três milhões de cabeças (IBGE, 2010).

Neste contexto, a criação de ovinos de corte da raça Santa Inês vem crescendo entre os produtores pela sua rusticidade e capacidade de adaptação às diversas condições climáticas e econômicas das regiões brasileiras, destacando-se a Nordeste, que tem uma área aproximada de 170 milhões de hectares, representando aproximadamente 20% do território nacional (CRUZ, 2009).

Segundo Carneiro et al. (2007), a raça Dorper apresenta alta taxa de desenvolvimento e crescimento de carcaça com boa conformação, sendo muito utilizada em cruzamentos com ovelhas de raças nativas do Nordeste como a Santa Inês, em virtude do seu porte e da velocidade de crescimento.

Apesar da caprino-ovinocultura ser uma atividade de relevante importância socioeconômica para a região Nordeste, seu desempenho é potencialmente reduzido tanto na região em questão quanto no país. As raças ovinas deslanadas são adaptadas à Região Nordeste, mas apresentam baixos índices de produtividade, que estão intimamente relacionados à falta de caracterização de um sistema de produção adequado, de maneira a usar raças apropriadas para cada objetivo de produção (CARNEIRO et al, 2007).

O Brasil é o oitavo maior produtor de caprinos e ovinos do mundo, mas o consumo médio de carne ovina por parte dos brasileiros está bem abaixo do padrão internacional. Ainda assim, a produção no país ainda não é suficiente para atender a demanda interna do produto. Paralelamente, observa-se o incremento da apresentação de carcaças de qualidade e a padronização dos cortes especiais, que geram expansão do consumo da carne ovina.

Considerando a demanda mundial por carne e coprodutos da ovinocultura crescente e o potencial brasileiro/nordestino para o desenvolvimento desta atividade imenso, faz-se necessário a adoção de um melhor manejo dos animais a fim de obter melhor produtividade (CRUZ, 2009).

O manejo sanitário do rebanho reflete diretamente no quadro econômico da produtividade, sendo um dos fatores que mais contribuem para o sucesso ou falha da ovinocultura (ALBUQUERQUE et al., 2009). Assim, com o objetivo de aumentar a produção, aumentou-se o interesse no monitoramento da sanidade do rebanho, utilizando diversas ferramentas como auxiliares no diagnóstico clínico, tais como os ensaios laboratoriais de bioquímica clínica (PEIXOTO e OSÓRIO, 2007).

### **3.2. Componentes séricos e sua importância**

Com o desenvolvimento da clínica em espécies de interesse pecuário, tornou-se necessário o conhecimento dos parâmetros hematológicos e de bioquímica sanguínea nas várias espécies e raças, de forma a possibilitar um correto diagnóstico dos processos patológicos, particularmente útil na detecção de afecções de origem metabólica ou tóxica e deficiências da nutrição nestas espécies (DIAS et al., 2004).

Uma das áreas da medicina que avançam rapidamente é a bioquímica clínica, pois o grande número de procedimentos existentes ajuda a diagnosticar inúmeras enfermidades. Geralmente utiliza-se uma combinação de testes, ao invés de apenas um, e o clínico deve escolher os testes que melhor se ajustem às suspeitas clínicas (LUTHRA, 2008).

Estudos para a determinação ou avaliação de componentes séricos e parâmetros fisiológicos de animais domésticos sadios são básicos para o clínico veterinário analisar as alterações decorrentes de diversas doenças. Como existem limitações do exame físico em detectar alterações fisiológicas de certos órgãos ou sistemas, as provas bioquímicas realizadas com o soro ou plasma sanguíneo dos animais domésticos representam um excelente subsídio ao diagnóstico clínico de inúmeras enfermidades, destacando-se aquelas com sede ou repercussões sobre o fígado e que, frequentemente, alteram as funções ou estruturas deste órgão. Por estas razões, usualmente na rotina clínica, os referidos exames são reunidos em grupos, tais como as provas citadas como avaliadoras da função hepática (MEIRA JR et al., 2009).

A mensuração da concentração sanguínea de um analito indica a quantidade em reserva desse analito disponível. Tais concentrações variam dentro de uma faixa fisiológica, conhecidos como intervalos ou valores de referência. Animais que apresentam valores de analitos sanguíneos fora do intervalo de referência podem estar em desbalanço nutricional e/ou com disfunções orgânicas que implicam na diminuição da capacidade de utilização ou biotransformação de nutrientes (MORAES, 2011).

Certas alterações metabólicas produzem efeitos em alguns fluidos corporais, como a elevação da glicose sérica em pacientes diabéticos. Os testes bioquímicos também são bastante utilizados para observar a progressão das enfermidades e o efeito de terapias sobre as mesmas (LUTHRA, 2008).

### **3.2.1. Glicose**

As fontes alimentares para o fornecimento diário de carboidratos são muito variadas entre as diversas espécies. O processo de absorção varia com o grau de atividade hormonal sistêmica (ex.: hormônios da tireóide) e atividade hormonal gastrointestinal (ex.: secretina). Todas estas condições afetam o processo digestivo gastrointestinal (ex.: acidez gastrointestinal, enzimas digestivas, doenças), alterando substancialmente a absorção da glicose. A concentração sanguínea de glicose depende de uma variedade de fatores e seus níveis séricos são o resultado do equilíbrio entre as taxas de entrada e saída da glicose da circulação (KANEKO et al., 2008).

No ruminante neonato, a glicose representa um dos metabólitos energéticos mais importantes, e sua concentração sérica depende diretamente da quantidade de lactose presente na secreção láctea ingerida. As alterações orgânicas sofridas pelos recém-nascidos podem interferir em diversos componentes sanguíneos, por causa da maturação funcional de seus órgãos e sistemas. Sendo assim, há uma maior necessidade energética para a realização da termorregulação, respiração e atividade muscular nessa faixa etária (YANAKA et al., 2012).

No rúmen, praticamente todo o carboidrato ingerido é consumido pela microbiota, fazendo com que o animal sintetize constantemente a glicose a partir de compostos não carboidratados, como os ácidos graxos voláteis (ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, ácido propiônico e ácido acetoacético) (PEREIRA et al., 2005).

Após a absorção, os produtos hepáticos são a principal fonte para a manutenção da glicose no sangue. Os hormônios epinefrina e glucagon promovem a liberação da glicose a partir do glicogênio. Os glicocorticóides promovem gliconeogênese e se opõem à ação hipoglicêmica da insulina. O fígado ocupa um papel central no mecanismo de regulação da glicemia, pois ele ao mesmo tempo adiciona e remove glicose do sistema. Por isso, é importante avaliar a glicemia em praticamente todas as doenças (KANEKO et al., 2008).

### 3.2.2. Ureia

O rim, sendo um dos órgãos responsáveis pela homeostasia (excretando substâncias indesejadas e reabsorvendo outras de grande importância) do organismo, recebe cerca de 25% do débito cardíaco nos mamíferos. Os rins também são responsáveis pela regulação do volume extracelular de líquidos do sangue, da pressão arterial e pela produção da eritropoetina (GALVÃO et al., 2010; SOBREIRA et al., 2013).

A ureia é uma pequena molécula hidrossolúvel sintetizada no fígado a partir do bicarbonato e da amônia no ciclo de Krebs-Henseleit. É a principal forma pela qual o nitrogênio é eliminado nos mamíferos. Após a síntese, ela é distribuída entre as reservas totais de água do corpo, sendo livremente filtrada pelo glomérulo renal e reabsorvida pelo túbulo coletor proximal. Sua reabsorção passiva aumenta quando o fluxo de urina no túbulo é reduzido, o que pode levar a um aumento da ureia plasmática em pacientes desidratados ou com hemorragia, ou a um decréscimo da mesma em pacientes super-hidratados (KANEKO et al., 2008).

As proteínas são a maior fonte de amônia para a síntese de ureia. Ocorre reciclagem intensa de ureia nos ruminantes através da sua transferência para o trato gastrointestinal e para a saliva. A ureia (fonte inorgânica de nitrogênio) também pode ser adicionada à dieta dos ruminantes a fim de ser incorporada às proteínas bacterianas, visto que nas épocas de pouca chuva a qualidade nutricional do pasto é inferior, sendo necessária a suplementação. A suplementação com ureia é uma excelente alternativa, pois é eficiente e econômica (CASTAÑEDA et al., 2009).

Sabe-se que a ureia endógena entra no retículo e no rúmen de ovinos e bovinos, onde é hidrolisada em amônia pela urease bacteriana e pode ser utilizada pelos microrganismos no anabolismo do nitrogênio. Esta molécula entra no rúmen pela saliva e



da difusão pela parede ruminal. A taxa de entrada de ureia no rúmen é de grande importância para ovinos e bovinos (COCIMANO e LENG, 1967).

Embora 40% ou mais da ureia produzida pelo organismo seja reabsorvida pelos túbulos renais, sua concentração sanguínea é um indicador da taxa de filtração glomerular, mas a creatinina é mais indicada para tal finalidade, pois sua concentração nos rins é mais constante e não é reabsorvida nos túbulos renais (EMANUELLI et al., 2008).

Na rotina da clínica médica e veterinária, a determinação da concentração dos metabólitos ureia e creatinina são indicadas como provas de função renal, tanto no diagnóstico como no prognóstico das enfermidades. (GREGORY et al., 2004).

A ureia plasmática não é um marcador eficiente de doença renal em ovinos (e a insuficiência renal não é comum nesses animais), embora seja um indicador de suplementação proteica na alimentação e/ou utilização da proteína, sendo influenciada pelo estado nutricional do animal (BRAUN et al., 2010).

As variações na ureia plasmática de animais com enfermidades são similares às da creatinina plasmática, porém numerosos fatores externos influenciam severamente as suas concentrações. Hemorragia gastrointestinal, jejum e dieta pobre em proteínas, por exemplo, aumentam o catabolismo proteico, aumentando, portanto, a ureia plasmática; outros fatores diminuem a ureia plasmática, incluindo shunts portossistêmicos, desnutrição, insuficiência hepática, e defeitos nas enzimas do ciclo de Krebs-Henseleit. Estes fatores explicam porque a ureia plasmática é menos específica que a creatinina plasmática para o diagnóstico da insuficiência renal crônica e não deve ser adotada como um teste de função renal. Contudo, como a ureia plasmática depende muito do aporte proteico, esta é uma ferramenta útil para monitorar os efeitos da restrição de proteínas na dieta (KANEKO et al., 2008).

### **3.2.3. Íons cloreto**

Os cloretos são os ânions mais abundantes no compartimento extracelular. A concentração no plasma e a eliminação deste íon são usualmente concomitantes com o sódio, exceto em disfunções ácido-base. Os cloretos, juntamente com os íons cálcio e magnésio, fazem parte da constituição inorgânica do líquido cefalorraquidiano. Juntamente com os íons sódio, potássio e bicarbonato, os cloretos fazem parte dos principais

componentes inorgânicos da saliva e, com exceção do bicarbonato, todos os constituintes têm sua origem no plasma. Os ânions cloreto são também alguns dos principais íons transportados pela mucosa intestinal durante a absorção ou secreção e, em casos de acidose metabólica podem ser substituídos pelo bicarbonato, aumentando a excreção urinária e diminuindo a concentração plasmática dos cloretos (KANEKO et al., 2008).

O balanço eletrolítico sofre influência principalmente dos nutrientes contidos na dieta, mas também pelas taxas de filtração glomerular e pela regulação intestinal. (ARANTES, 2008). Em equinos, ocorre sudorese intensa após esforços físicos, sendo este o principal mecanismo de termorregulação desses animais. Contudo, a sudação pode implicar em perdas excessivas de potássio, sódio e cloro, que pode provocar a chamada síndrome do cavalo exausto, que inclui sintomas como fadiga, hipertermia, desidratação, rabdomiólise, cólica, laminite, insuficiência renal e pode levar à morte do animal (LACERDA-NETO et al., 2003).

A deficiência de cloro pode induzir apetite depravado nos animais, como a ingestão de urina de outros animais, mastigação da divisória dos estábulos e também a lambedura de objetos metálicos. A falta do mineral pode também acarretar problemas oculares, como descamação em torno dos olhos e “olhos fundos”. A ingestão excessiva de sal (NaCl), por sua vez, principalmente quando acompanhada por consumo restrito de água, pode provocar perda de peso, anorexia, edema e paralisia (OLIVEIRA, 2011).

#### **3.2.4. Íons magnésio**

Os íons magnésio são importantes para a manutenção da integridade do DNA. Ligando-se a ele, os cátions reduzem a densidade de carga negativa da molécula, contribuindo para sua estabilidade estrutural. Estes íons também são cofatores essenciais para inúmeras enzimas envolvidas nos processos de reparo ao DNA, e alguns estudos relatam que o cátion está envolvido na proteção contra o estresse oxidativo (MAHABIR et al., 2008). Quando não está ligado a proteínas, o magnésio é filtrado pelo glomérulo, e apenas 25% é reabsorvido, principalmente pelo ramo ascendente da alça de Henle (KANEKO, 2008).

A deficiência de magnésio pode levar à tetania magnesiana, também chamada de tetania das pastagens ou hipomagnesemia, uma doença metabólica complexa afetada pela

composição mineral das forragens, propriedades do solo, práticas de fertilização, estação do ano e temperatura. A hipermagnesemia é incomum, mas, quando ocorre, os sinais clínicos mais comuns são: apatia, sonolência, distúrbios locomotores, diminuição do apetite e da digestibilidade (OLIVEIRA, 2011).

### **3.2.5. Íons fosfato e cálcio**

O cálcio e o fósforo, como os demais minerais, não podem ser sintetizados no organismo. Assim, os ruminantes os adquirem através da alimentação, sendo o fósforo encontrado em grande quantidade nas forragens e em baixíssimas concentrações em rações, sendo o inverso para o cálcio (OLIVEIRA, 2013). Como ambos os elementos estão inseridos na matriz protéica pelos osteoblastos, esses íons pertencem ao grupo dos macrominerais, juntamente com o magnésio, o cloro, o sódio, o enxofre e o potássio (CAMPOS et al., 2003).

Desequilíbrio da proporção cálcio/fósforo na dieta é um dos principais predisponentes da urolitíase em ruminantes. Os tipos de cálculo mais comuns nesses animais são os compostos de estruvita (fosfato de amônia e magnésio), silicatos, carbonatos e oxalatos. No perfil bioquímico, pode-se constatar hipermagnesemia (além da hiperfosfatemia), podendo ou não aparecer hipocalcemia (SILVA, et al., 2008).

A energia proveniente da alimentação é armazenada em forma de ATP (adenosina trifosfato), composta por três íons fósforo. As ATPs representam o reservatório de energia potencial, que poderão ser usado nos diversos trabalhos biológicos do organismo que necessitem de energia, como a contração muscular (ROSSI e TIRAPÉGUI, 1999).

Os fosfatos inorgânicos são reabsorvidos nos túbulos proximais por um cotransportador de sódio, que, se inibido pelo PTH (hormônio paratireoideiano), aumenta a fosfodiurese. A reabsorção de fosfatos é maior em ruminantes do que em outras espécies (KANEKO et al., 2008).

A deficiência de fósforo pode provocar raquitismo em animais jovens e osteomalácia em adultos, fraturas ósseas, má formação dos ossos, redução do crescimento, perda de peso, redução do apetite, diminuição do desempenho reprodutivo. Contudo, os sinais da deficiência do mineral não são facilmente reconhecidos, excetuando-se os casos agudos, onde os animais desenvolvem apetite depravado, podendo ingerir ossos de animais

mortos e desenvolver botulismo. Por outro lado, a hiperfosfatemia pode acarretar em diarreia, urolitíase, perda óssea e calcificação de tecidos moles, pois afeta diretamente a absorção de cálcio (OLIVEIRA, 2011).

O cálcio tem um papel importante na cascata de coagulação e na ativação do sítio das pontes cruzadas actina-miosina durante a contração muscular. Os íons cálcio são transportados de volta ao líquido sarcoplasmático após a contração muscular (BUCCI et al, 2006).

Altas concentrações intracelulares de íons cálcio são prejudiciais às hemácias. Para evitar o acúmulo intracelular do cátion, as hemácias utilizam um mecanismo ATP dependente (bomba de cálcio) para exportar os íons para fora da célula. Estes íons são filtrados pelos glomérulos estando na forma livre ou não. A maioria do cálcio é reabsorvida no túbulo proximal e no ramo ascendente da alça de Henle (KANEKO et al., 2008).

A hipercalcemia pode levar a disfunções ósseas como a osteoartrite, redução do apetite, diminuição da digestão de carboidratos, proteínas e lipídios e pode ainda acarretar na deficiência de outros minerais, tais como manganês, ferro, iodo, zinco e magnésio. A deficiência deste mineral possui as mesmas características da deficiência de fósforo (OLIVEIRA, 2011).

### **3.3. Valores de referência**

O conceito de valores de referência foi arquitetado para descrever flutuações das concentrações sanguíneas de analitos em grupos bem definidos de indivíduos. Nesta primeira publicação, havia uma clara distinção entre valores de referência mensurados em indivíduos ou populações saudáveis e valores de referência mensurados em pacientes com várias enfermidades. Atualmente, é consenso comum que valores de referência descrevem variações observadas em indivíduos ou populações saudáveis, o que faz com que a definição de saúde ou a caracterização de um estado de saúde seja um ponto crítico deste conceito. A partir deste princípio, e de acordo com a definição da International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), valores de referência são determinados em uma população bem definida de indivíduos saudáveis selecionados de acordo com critérios preestabelecidos como idade, sexo, raça, estado nutricional e dieta (GEFFRÉ et al., 2009).

Ainda não existe um consenso comum para a definição de saúde. A definição da

Organização Mundial Saúde é inadequada tanto para humanos quanto para animais, pois é impossível definir de forma objetiva o critério de “completo bem-estar físico, mental e social”. Conseqüentemente, o primeiro e maior problema na determinação de um intervalo de referência é definir o critério usado para caracterizar saúde (WALTON, 2001). Este critério deve ser claramente descrito e documentado, de forma que outros possam avaliar o estado de saúde do grupo amostral de referência (CLSI, 2008).

Os intervalos de referência servem como base para testes laboratoriais e auxiliam os médicos na diferenciação do paciente saudável do doente, sendo uma das ferramentas mais utilizadas na medicina laboratorial. Contudo, estes valores podem variar significativamente de uma população estudada para outra, já que fatores como alimentação, gestação, idade, sexo, raça, dentre outros, tem influência direta na concentração de alguns analitos pesquisados. Daí a importância de uma caracterização bem feita da população de referência, a qual na maioria das vezes, principalmente na medicina veterinária, é feita de forma deficiente. A problemática dos valores de referência para ovinos é a mesma para as demais espécies (CLSI, 2008).

Muitos destes dados foram publicados em livros, artigos de revisão e artigos de pesquisa específicos. Na maioria os casos, detalhes sobre os animais e condições de manejo são pouco caracterizados, métodos analíticos e suas performances não são reportados e os métodos estatísticos utilizados na determinação dos limites de referência são questionáveis; todos estes fatores fazem com que o uso destes intervalos na interpretação clínica seja delicado (BRAUN et al., 2010). Apesar de publicados recentemente, alguns estudos com detalhes mais acurados sobre as técnicas, populações dos ovinos e análises estatísticas e os principais fatores biológicos de variação não foram sistematicamente investigados (LEPHERD et al., 2009; BRAUN et al., 2010).

Estudos com outras espécies animais demonstram bem a influência destes fatores na determinação de intervalos de referência. Um trabalho realizado por Pérez et al. (2003) analisou 529 amostras sanguíneas de Ibexes espanhóis (*Capra pyrenaica*) na região da Andaluzia, Espanha, demonstrando diferenças significativas de parâmetros entre animais de sexos e faixas etárias diferentes. Outro trabalho realizado por Mohri et al. (2007) com bezerros da raça Holandês, mostrou que existem diferenças consideráveis de parâmetros hematológicos e bioquímicos em diferentes idades nos animais acompanhados. Rice e Hall (2007) demonstraram a influência não só da idade, do sexo, e da região (influências geográficas), mas também do estresse nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de cabras

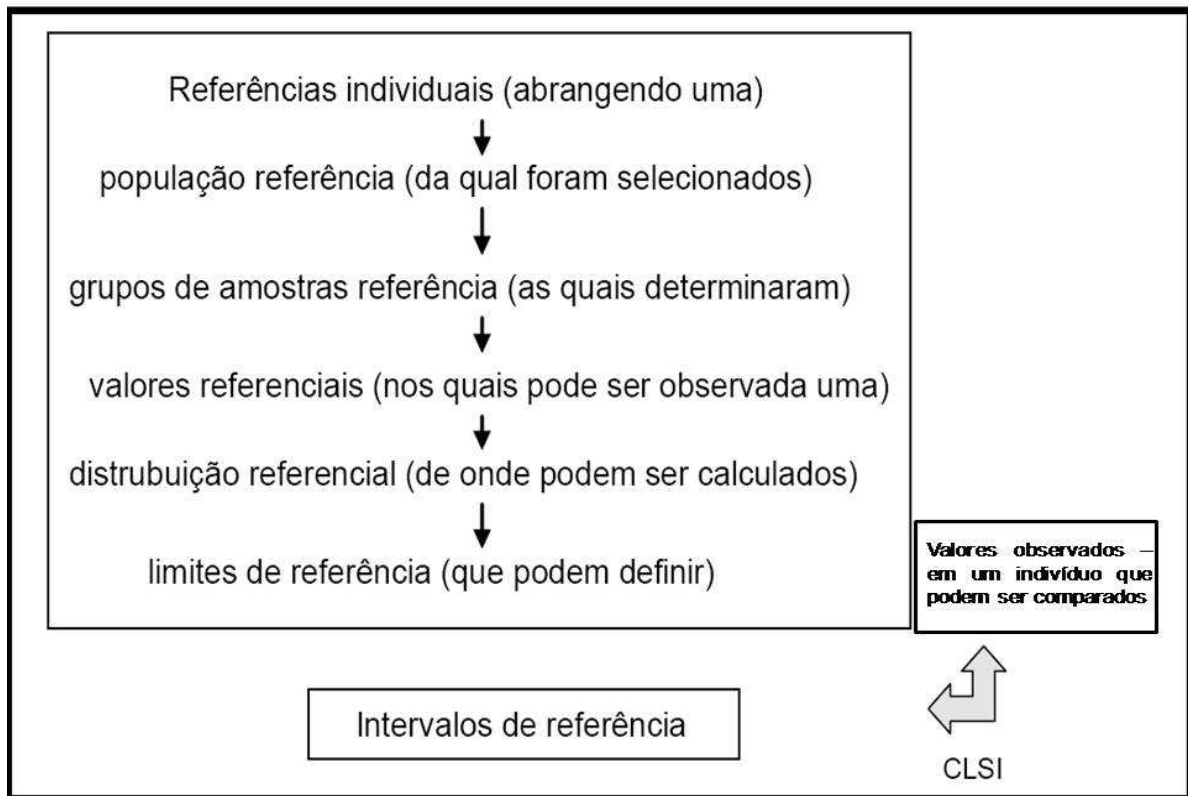
das montanhas (*Oreamnos americanus*) capturadas sob diferentes condições.

### **3.3.1. Determinação de intervalos de referência**

Existem muitas raças ovinas e sistemas de produção diferentes em diversos países, assim como metodologias de quantificação de componentes séricos, fazendo com que haja uma diversidade de fatores que influenciam na determinação dos intervalos de referência em cada população estudada. Portanto, não se pode provar a existência de valores de referência universais. De acordo com as recomendações internacionais, os intervalos de referência devem ser criados e validados pelos laboratórios com suas próprias técnicas em uma população de animais o mais próxima possível dos animais para os quais se desejam aplicar tais dados (CLSI, 2008). Esta recomendação é especialmente importante no manejo da sanidade do rebanho, no qual condições de nascimento e suplementação alimentar podem levar a variações nas concentrações de diversos analitos no soro/plasma que estão fora dos intervalos de referência publicados na literatura (BRAUN et al., 2010).

De acordo com os parâmetros definidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), o procedimento para se estabelecer um intervalo de referência consiste em: selecionar um grupo de amostras de uma população saudável, da qual é selecionado um grupo de amostras para se determinar os valores de referência no qual é observada uma distribuição de valores e, a partir daí, se calculam os limites de referência que podem definir os intervalos de referência (Figura 01) (HORN e PESCE, 2003).

**Figura 01** – Esquema para a determinação de intervalos de referência segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (adaptado de FERREIRA E ANDRIOLO, 2008).



De acordo com Horn e Pesce (2003), o método padrão para determinar intervalos de referência baseia-se na definição e obtenção de uma população saudável com pelo menos 120 indivíduos e o uso de métodos estatísticos não paramétricos com 95% de intervalo de confiança. Esta metodologia tem menor acurácia se o tamanho do grupo é significativamente pequeno e não permite a exclusão de *outliers* (indivíduos discrepantes).

O método mais apropriado seria a remoção dos *outliers* (identificados através da disposição dos dados em gráficos como histogramas ou Box-plot, que facilitam a sua visualização) e o uso de estimativas robustas, a fim de corrigir as deficiências do método padrão e evitar o uso de métodos com pouca validade (HORN e PESCE, 2003). Na Tabela 01, encontram-se os intervalos de referência séricos para ovinos dos analitos glicose, ureia, cloretos, magnésio, cálcio e fósforo (KANEKO et al., 2008), que foram objetos deste estudo.

**Tabela 01** – Intervalo de referência para ovinos dos analitos utilizados neste trabalho (KANEKO et al., 2008).

<b>Analito</b>	<b>Intervalo de referência para ovinos</b>
Glicose	50 – 80 mg/dL
Ureia	17,12 – 42,8 mg/dL
Cloretos	26,76 – 29,01 mEq/L
Magnésio	2,2 – 2,8 mg/dL
Cálcio	11,5 – 12,8 mg/dL
Fósforo	5,0 – 7,3 mg/dL



## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1. Amostras utilizadas**

Foram utilizadas amostras de soro de 40 ovinos das raças Dorper e Santa Inês, com diferentes faixas etárias, selecionadas aleatoriamente do banco de soro (existente desde o ano de 2010, coletados de animais presentes em exposições agropecuárias e estocado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA), aliquotadas logo após sua obtenção por punção jugular, sendo mantidas a -20°C até seu uso. O tempo de estocagem das amostras não foi considerado no presente estudo, visto que não afetaria seus objetivos. A temperatura e o tempo de estocagem para cada analito está contida nas respectivas bulas dos kits de mensuração.

### **4.2. Mensuração dos analitos**

De cada amostra, foram mensurados valores de glicose, ureia, cloretos, fósforo, magnésio e cálcio. Para isso, foram utilizados kits comerciais de dosagem para as referidas substâncias, e a metodologia usada em cada analito pode ser verificada na Tabela 02. Os cálculos para a transformação dos valores de densidade ótica, obtidos em unidades de concentração foram realizados de acordo com as recomendações contidas nas bulas de cada analito. A concentração do padrão de cada kit está apresentada como o fator de multiplicação na fórmula de conversão das D.O. para unidades de concentração.

**Tabela 02** – Metodologia utilizada para a mensuração de cada analito.

<b>Analito</b>	<b>Método</b>	<b>Tipo de Reação</b>
Glicose	Bondar e Mead modificado	Ponto final
Ureia	Urease	Ponto final
Cloretos	Tiocianato de mercúrio	Ponto final
Magnésio	Magon sulfonado	Ponto final
Cálcio	Cresolftaleína	Ponto final
Fósforo	Molibdato	Ponto final

As mensurações foram realizadas em duas etapas. Na primeira, os valores séricos foram quantificados individualmente, utilizando-se a metodologia normal referenciada em bula – “método da cubeta” – com seis amostras sorológicas. Numa segunda etapa, procedeu-se então à padronização em microplacas de 96 poços (utilizando-se as mesmas amostras), quando então foi aplicado um procedimento do tipo *checkerboard*, onde foram variadas as quantidades dos reagentes e das seis amostras empregadas no ensaio (Figura 02), obedecendo à proporção amostra/reagente de cada analito sempre que possível. Foi estabelecido um volume final mínimo de 200  $\mu\text{L}$  por poço da microplaca, a fim de não prejudicar a leitura ótica, bem como um volume final máximo de 370  $\mu\text{L}$ , para não ultrapassar a capacidade do poço e permitir a homogeneização.

Para cada componente estudado, foi realizado um *checkerboard* específico (pois em alguns casos não foi possível a realização de seis variações de proporção), que serão detalhados mais adiante. Com isso, verificou-se a combinação que apresentou o melhor índice de correlação de Pearson (o mais próximo dos valores de concentração obtidos quando do emprego da metodologia normal proposta em POP) para cada analito. Todas as mensurações em microplaca foram realizadas em duplicata, exceto durante a reprodutibilidade e linearidade, quando foram mensuradas em triplicata.

**Figura 02** - Esquema de *checkerboard* utilizado para testar as combinações de volumes dos reagentes e amostras. Cada cor representa uma combinação diferente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B <sub>a</sub>	B <sub>a</sub>	B <sub>b</sub>	B <sub>b</sub>	B <sub>c</sub>	B <sub>c</sub>	B <sub>d</sub>	B <sub>d</sub>	B <sub>e</sub>	B <sub>e</sub>	B <sub>f</sub>	B <sub>f</sub>
B	P <sub>a</sub>	P <sub>a</sub>	P <sub>b</sub>	P <sub>b</sub>	P <sub>c</sub>	P <sub>c</sub>	P <sub>d</sub>	P <sub>d</sub>	P <sub>e</sub>	P <sub>e</sub>	P <sub>f</sub>	P <sub>f</sub>
C	A <sub>1a</sub>	A <sub>1a</sub>	A <sub>1b</sub>	A <sub>1b</sub>	A <sub>1c</sub>	A <sub>1c</sub>	A <sub>1d</sub>	A <sub>1d</sub>	A <sub>1e</sub>	A <sub>1e</sub>	A <sub>1f</sub>	A <sub>1f</sub>
D	A <sub>2a</sub>	A <sub>2a</sub>	A <sub>2b</sub>	A <sub>2b</sub>	A <sub>2c</sub>	A <sub>2c</sub>	A <sub>2d</sub>	A <sub>2d</sub>	A <sub>2e</sub>	A <sub>2e</sub>	A <sub>2f</sub>	A <sub>2f</sub>
E	A <sub>3a</sub>	A <sub>3a</sub>	A <sub>3b</sub>	A <sub>3b</sub>	A <sub>3c</sub>	A <sub>3c</sub>	A <sub>3d</sub>	A <sub>3d</sub>	A <sub>3e</sub>	A <sub>3e</sub>	A <sub>3f</sub>	A <sub>3f</sub>
F	A <sub>4a</sub>	A <sub>4a</sub>	A <sub>4b</sub>	A <sub>4b</sub>	A <sub>4c</sub>	A <sub>4c</sub>	A <sub>4d</sub>	A <sub>4d</sub>	A <sub>4e</sub>	A <sub>4e</sub>	A <sub>4f</sub>	A <sub>4f</sub>
G	A <sub>5a</sub>	A <sub>5a</sub>	A <sub>5b</sub>	A <sub>5b</sub>	A <sub>5c</sub>	A <sub>5c</sub>	A <sub>5d</sub>	A <sub>5d</sub>	A <sub>5e</sub>	A <sub>5e</sub>	A <sub>5f</sub>	A <sub>5f</sub>
H	A <sub>6a</sub>	A <sub>6a</sub>	A <sub>6b</sub>	A <sub>6b</sub>	A <sub>6c</sub>	A <sub>6c</sub>	A <sub>6d</sub>	A <sub>6d</sub>	A <sub>6e</sub>	A <sub>6e</sub>	A <sub>6f</sub>	A <sub>6f</sub>

B = branco; P = padrão; A = amostra; “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” = cada letra representa uma variação no volume de reagente e de amostra; 1, 2, 3, 4, 5 e 6 = identificação da amostra.

Todo o material utilizado para a mensuração (pipetas, ponteiras, cubetas, tubos de ensaio, microtubos, dentre outros) sofreu uma série de lavagens, com a finalidade de descontaminação e retirada de resíduos de eletrólitos e sujeiras. O procedimento de lavagem prosseguiu da seguinte forma: duas lavagens com água destilada, seguida por uma lavagem com álcool 70%, seguida por outra de água destilada, seguida por mais uma de álcool 70% e finalizando com mais duas lavagens com água destilada. A comprovação da funcionalidade das lavagens foi obtida através do “branco” de cada procedimento, onde não foi observada reação colorimétrica em nenhum momento do experimento.

#### 4.2.1. Mensuração de glicose

A glicose foi mensurada por reação de ponto final: a glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose, produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Este último, reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra, medida colorimetricamente a 505 nm (490 a 540 nm), sendo estável por 60 minutos (BERGMEYER, 1986). Utilizou-se o kit Glicose PAP Liquiform, REF: 84-2/250 (LABTEST, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O procedimento original foi realizado de acordo com a bula disponível no kit utilizado: tomou-se um tubo de ensaio para cada amostra, incluindo o branco e o padrão, e acrescentou-se 10 µL de amostra em cada tubo (água destilada, no caso do branco). Depois, adicionou-se 1000 µL do reagente em cada tubo, agitou-se cada um deles para homogeneizar a mistura e colocou-se em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos. A absorbância foi determinada a 505 nm.

O *checkerboard* na microplaca foi realizado de acordo com a Tabela 03 da mesma forma que no procedimento original, sendo que a homogeneização foi realizada com as ponteiros e pipetadores. A transformação das D. O. (densidades óticas) em mg/dL foi realizada a partir da fórmula  $(\text{ABS teste} / \text{ABS padrão}) \times 100$ .

**Tabela 03** – Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de *checkerboard* do analito glicose em microplaca e cubeta.

Suporte	Identificação da proporção	Proporção
Microplaca	Um	3 µL amostra + 200 µL reagente
	Dois	4 µL amostra + 200 µL reagente
	Três	5 µL amostra + 200 µL reagente
	Quatro	4 µL amostra + 300 µL reagente
	Cinco	5 µL amostra + 300 µL reagente
	Seis	6 µL amostra + 300 µL reagente
Cubeta	-	10 µL amostra + 1000 µL reagente

#### 4.2.2. Mensuração de ureia

A ureia foi mensurada por reação de ponto final: a ureia é hidrolisada pela urease a íons amônia e CO<sub>2</sub>. Os íons amônia, por sua vez, reagem com salicilato e hipoclorito de sódio em meio alcalino, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar o azul de indofenol, proporcional à quantidade de ureia presente na amostra, medido colorimetricamente a 600 nm (580 a 610 nm), sendo estável por duas horas (BERGMEYER, 1985). Utilizou-se o kit Ureia CE REF: 27 (LABTEST, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O procedimento original foi realizado de acordo com a bula disponível no kit utilizado, preparando-se os reagentes (tampão de uso = 100 mL de tampão + 400 mL de água destilada; urease tamponada = 1,0 mL de urease + 20 mL do tampão de uso; oxidante de uso = 25 mL do oxidante + 475 mL de água destilada) antes de realizar os testes: tomou-se um tubo de ensaio para cada amostra, incluindo o branco e o padrão, e acrescentou-se 10 µL de amostra em cada tubo (água destilada, no caso do branco). A seguir, adicionou-se 1000 µL da urease tamponada em cada tubo, agitou-se cada um deles para homogeneizar a mistura e colocou-se em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. Depois, acrescentou-se 1000 µL do oxidante de uso em cada tubo, agitou-os para homogeneizar a mistura e em seguida colocou-os novamente em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. A absorbância foi determinada a 595 nm.

O *checkerboard* na microplaca foi realizado de acordo com a Tabela 04 e o banho-maria a 37 °C da mesma forma que o procedimento original, sendo que a homogeneização foi realizada com as ponteiras e pipetadores, e a transformação das D. O. em mg/dL foi realizada a partir da fórmula (ABS teste / ABS padrão) x 70.

**Tabela 04** – Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de *checkerboard* do analito ureia em microplaca e cubeta.

<b>Suporte</b>	<b>Identificação da proporção</b>	<b>Proporção</b>
Microplaca	Um	10 µL amostra + 60 µL urease tamponada + 140 µL oxidante de uso
	Dois	1 µL amostra + 100 µL urease tamponada + 100 µL oxidante de uso
	Três	2 µL amostra + 125 µL urease tamponada + 125 µL oxidante de uso
	Quatro	3 µL amostra + 150 µL urease tamponada + 150 µL oxidante de uso
	Cinco	4 µL amostra + 175 µL urease tamponada + 175 µL oxidante de uso
	Seis	5 µL amostra + 175 µL urease tamponada + 175 µL oxidante de uso
Cubeta	-	10 µL amostra + 1000 µL urease tamponada + 1000 µL oxidante de uso

#### 4.2.3. Mensuração de magnésio

O íon magnésio foi mensurado por reação de ponto final: em meio alcalino, os íons reagem com o magon sulfonado (cor azul), formando um complexo de cor rósea (complexo magnésio-magon) que é proporcional à quantidade de íons magnésio na amostra, medido colorimetricamente a 505 nm (500 a 540 nm), sendo estável por 30 minutos (BOHUON, 1962). Utilizou-se o kit Magnésio REF: 50 (LABTEST, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O procedimento original foi realizado de acordo com a bula disponível no kit utilizado, preparando-se o reagente (reagente de uso = 20 mL do tampão + 20 mL do magon sulfonado) antes de realizar os testes: tomou-se um tubo de ensaio para cada amostra, incluindo o branco e o padrão, e acrescentou-se 20 µL de amostra em cada tubo (água destilada, no caso do branco). Depois, adicionou-se 2000 µL do reagente de uso em cada tubo, agitou-se cada um deles para homogeneizar a mistura e incubou à temperatura ambiente durante 2 minutos. A absorbância foi determinada a 505 nm.

O *checkerboard* na microplaca foi realizado de acordo com a Tabela 05, sendo que

a homogeneização foi realizada com as ponteiros e pipetadores. A transformação das D. O. em mg/dL foi realizada a partir da fórmula (ABS teste / ABS padrão) x 2.

**Tabela 05** – Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de *checkerboard* do analito magnésio em microplaca e cubeta.

<b>Suporte</b>	<b>Identificação da proporção</b>	<b>Proporção</b>
Microplaca	Um	3,5 µL amostra + 350 µL reagente de uso
	Dois	5 µL amostra + 350 µL reagente de uso
	Três	10 µL amostra + 350 µL reagente de uso
	Quatro	5 µL amostra + 200 µL reagente de uso
	Cinco	10 µL amostra + 200 µL reagente de uso
	Seis	20 µL amostra + 200 µL reagente de uso
Cubeta	-	20 µL amostra + 2000 µL reagente de uso

#### 4.2.4. Mensuração de fósforo

O íon fosfato foi mensurado por reação de ponto final: os íons reagem com o molibdênio em meio ácido, formando um complexo amarelo, que por ação de um tampão alcalino é reduzido a azul-molibdênio, que é medido colorimetricamente a 650 nm (640 a 700 nm), sendo estável por 15 minutos (BAGINSK, 1969). Utilizou-se o kit Fósforo REF: 42 (LABTEST, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O procedimento original foi realizado de acordo com a bula disponível no kit utilizado: tomou-se um tubo de ensaio para cada amostra, incluindo o branco e o padrão, e acrescentou-se 100 µL de amostra em cada tubo (água destilada, no caso do branco). Depois, adicionou-se 2500 µL de água destilada, 50µL de catalisador em cada tubo e agitou-se cada um deles para homogeneizar a mistura. Adicionou-se 50µL de molibdato em cada tubo, agitou-se novamente e incubou-se em banho-maria a 22 °C (20 a 25 °C) durante 3 minutos. Acrescentou-se 100µL do tampão em cada tubo, agitou-se e incubou-se no mesmo banho-maria durante 5 minutos. A absorbância foi determinada a 655nm.

O *checkerboard* na microplaca foi realizado de acordo com a tabela 06, sendo que a

homogeneização foi realizada com as ponteiros e pipetadores. No caso do fósforo, a amostra foi colocada no fundo do poço da placa, o catalisador na parede do poço e o reagente molibdato foi misturado à água destilada, a fim de agilizar o procedimento e evitar contaminações. Antes de adicionar a mistura de água destilada com o reagente molibdato, a microplaca foi colocada no banho-maria, sendo homogeneizada vigorosamente até o aparecimento de turvação, assim como o tampão foi adicionado sem retirar a placa do banho e foi homogeneizado até a percepção de translucidez/coloração azulada no poço. A transformação das D. O. em mg/dL foi realizada a partir da fórmula  $(\text{ABS teste} / \text{ABS padrão}) \times 5$ .

**Tabela 06** – Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de *checkerboard* do analito fósforo em microplaca e cubeta.

<b>Suporte</b>	<b>Identificação da proporção</b>	<b>Proporção</b>
Microplaca	Um	50 µL amostra + 260 µL água destilada + 25 µL catalisador + 25 µL molibdato + 50 µL tampão
	Dois	40 µL amostra + 280 µL água destilada + 20 µL catalisador + 20 µL molibdato + 40 µL tampão
	Três	30 µL amostra + 300 µL água destilada + 15 µL catalisador + 15 µL molibdato + 30 µL tampão
	Quatro	20 µL amostra + 320 µL água destilada + 10 µL catalisador + 10 µL molibdato + 20 µL tampão
	Cinco	10 µL amostra + 340 µL água destilada + 5 µL catalisador + 5 µL molibdato + 10 µL tampão
Cubeta	-	100 µL amostra + 2500 µL água destilada + 50 µL catalisador + 50 µL molibdato + 100 µL tampão

#### 4.2.5. Mensuração de cloretos

Os íons cloretos foram mensurados através de reação de ponto final: os íons reagem



com o tiocianato de mercúrio formando o cloreto mercúrico e íons tiocianato; estes reagem com os íons férricos, formando o tiocianato férrico, de cor amarela, de intensidade proporcional à concentração de cloretos na amostra, medido colorimetricamente a 470 nm (450 a 500 nm), sendo estável por 2 horas (BURTIS e ASHWOOD, 1994). Utilizou-se o kit Cloretos REF: 49 (LABTEST, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O procedimento original foi realizado de acordo com a bula disponível no kit utilizado: tomou-se um tubo de ensaio para cada amostra, incluindo o branco e o padrão, e acrescentou-se 10 µL de amostra em cada tubo (água destilada, no caso do branco). Depois, adicionou-se 3500 µL do reagente de cor em cada tubo, acrescentou-se 100 µL do ativador em cada tubo, agitou-se cada um deles para homogeneizar a mistura e incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos. A absorbância foi determinada a 490nm.

O *checkerboard* na microplaca foi realizado de acordo com a Tabela 07, sendo que a homogeneização foi realizada com as ponteiras e pipetadores. Para este analito, a amostra foi colocado no fundo do poço da microplaca, o ativador na parede do poço e o reagente de cor por último, procedendo-se à homogeneização. A transformação das D.O. em mEq/L foi realizada a partir da fórmula  $(\text{ABS teste} / \text{ABS padrão}) \times 100$ .

**Tabela 07** – Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de *checkerboard* do analito cloretos em microplaca e cubeta.

<b>Suporte</b>	<b>Identificação da proporção</b>	<b>Proporção</b>
Microplaca	Um	5 µL amostra + 320 µL reagente de cor + 40 µL ativador
	Dois	5 µL amostra + 330 µL reagente de cor + 30 µL ativador
	Três	5 µL amostra + 340 µL reagente de cor + 20 µL ativador
	Quatro	5 µL amostra + 350 µL reagente de cor + 10 µL ativador
Cubeta	-	10 µL amostra + 3500 µL reagente de cor + 100 µL ativador

#### 4.2.6. Mensuração de cálcio

O íon cálcio foi determinado por reação de ponto final: os íons reagem com a púrpura de cresolfaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta de intensidade proporcional à concentração de cálcio na amostra, medido colorimetricamente a 570 nm (550 a 590 nm), sendo que a leitura deve ser imediata (BAGINSK, 1982). Utilizou-se o kit Cálcio Liquiform REF: 90 (LABTEST, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O procedimento original foi realizado de acordo com a bula disponível no kit utilizado, preparando-se o reagente de trabalho (reagente de trabalho = 45 mL do reagente 1 + 15 mL do reagente 2) antes de realizar os testes: tomou-se um tubo de ensaio para cada amostra, incluindo o branco e o padrão, e adicionou-se 1000 µL do reagente de trabalho em cada tubo. Depois, acrescentou-se 20 µL de amostra em cada tubo (água destilada, no caso do branco) e agitou-se cada um deles para homogeneizar a mistura. A absorbância foi determinada a 570 nm e, como a leitura deve ser imediatamente após a homogeneização, a amostra só foi acrescentada no momento da determinação da absorbância.

O *checkerboard* na microplaca foi realizado de acordo com a tabela 08, sendo que a homogeneização foi realizada com as ponteiras e pipetadores. A transformação das D. O. em mg/dL foi realizada a partir da fórmula (ABS teste / ABS padrão) x 10.

**Tabela 08** – Volume de amostras e reagentes utilizados no procedimento de *checkerboard* do analito cálcio em microplaca e cubeta.

<b>Suporte</b>	<b>Identificação da proporção</b>	<b>Proporção</b>
Microplaca	Um	6 µL amostra + 300 µL reagente de trabalho
	Dois	5 µL amostra + 250 µL reagente de trabalho
	Três	4 µL amostra + 200 µL reagente de trabalho
	Quatro	3 µL amostra + 150 µL reagente de trabalho
Cubeta	-	20 µL amostra + 1000 µL reagente de trabalho

#### **4.2.7. Determinação da repetitividade, reprodutibilidade e linearidade**

Após a determinação do índice de correlação de Pearson, foram escolhidos os procedimentos “cinco” (glicose), “dois” (ureia), “um” (magnésio), “cinco” (fósforo), “quatro” (cloretos) e “três” (cálcio) para as demais etapas do experimento, quando 40 amostras foram mensuradas tanto pelo procedimento em microplaca quanto pelo procedimento em cubeta. Um novo índice de correlação de Pearson foi obtido e deu-se prosseguimento à repetitividade, onde as cinco amostras que apresentaram as maiores D. O. e as cinco amostras que apresentaram as menores D. O. foram mensuradas novamente (20 repetições para cada uma das dez amostras) pelos procedimentos supracitados.

Após a obtenção da variação, as dez amostras seguiram para a reprodutibilidade, onde foram novamente mensuradas por cinco diferentes operadores em diferentes momentos. Foi obtida uma nova correlação (a reprodutibilidade de cada operador foi comparada com o resultado obtido na mensuração das 40 amostras) e procedeu-se a linearidade, onde a amostra padrão do kit sofreu uma diluição seriada e foi mensurada em microplaca.

#### **4.3. Análises matemáticas e estatísticas**

Em um primeiro momento, foram calculados o desvio padrão e as médias entre as duplicatas das amostras dos testes realizados em microplaca. Todas as amostras que apresentaram desvio padrão igual ou superior a 15% foram testadas novamente. Logo após, subtraiu-se o branco e as médias dos valores das densidades óticas foram transformadas em unidades de concentração, obedecendo aos cálculos fornecidos pelo fabricante dos kits utilizados. Igual procedimento de transformação foi adotado para os diferentes procedimentos quando da utilização dos ensaios em cubeta.

Os conjuntos de dados dos resultados obtidos das amostras em ensaio tradicional e ensaios modificados para microplaca foram inseridos em software estatístico (SPSS v. 11.0), onde foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson, indicando a força e a direção do relacionamento linear entre duas variáveis aleatórias. O procedimento que obteve o maior coeficiente de correlação foi então aquele escolhido para o cálculo da

repetitividade e reprodutibilidade do ensaio.

Para a repetitividade, cinco amostras com baixa concentração de analito e outras cinco amostras com alta concentração de analito foram testadas 20 vezes cada em microplaca. Os conjuntos de valores obtidos para cada amostra foram então digitalizados em planilha do software de estatística para cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variância, o qual é uma medida da dispersão estatística, indicando quão longe em geral os seus valores se encontram do valor esperado. A repetitividade foi dada, para cada amostra para cada mensuração de analito, pela fórmula  $REPETIVIDADE = 1 - (\text{coeficiente de variação})$ . Os dados são mostrados como média das repetitividades das amostras testadas.

A reprodutibilidade foi calculada colocando-se o conjunto de dados das amostras testadas por cada operador diferente, em diferentes momentos, mas com o mesmo kit de diagnóstico, em software de estatística, e dessa forma calculando-se o coeficiente de correlação entre cada conjunto de dados, para cada amostra em cada mensuração de analito. A reprodutibilidade foi calculada então pela fórmula  $REPRODUTIBILIDADE = (\text{Coeficiente de Correlação}) \times 100$ . Os dados são mostrados como média das reprodutibilidades das amostras testadas.

Para o cálculo da linearidade e do limite mínimo de detecção, os resultados obtidos no procedimento modificado, utilizando-se concentrações decrescentes do analito, os dados foram digitalizados e, posteriormente, foram obtidos os gráficos de correlação entre os dois conjuntos de dados, e realizada regressão linear, com consequente confecção de equação da reta e coeficiente de correlação ( $R^2$ ). O limite mínimo de detecção foi obtido a partir da equação da reta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliada a possibilidade de utilização de novos métodos de mensuração de analitos séricos (glicose, ureia, cloretos, magnésio, fósforo e cálcio) de ovinos para pesquisa e diagnóstico, utilizando microplacas de 96 poços ao invés de cubetas e tubos de ensaio. No Brasil, há uma necessidade de métodos de mensuração mais rápidos e econômicos para instigar a realização de pesquisas de determinação de intervalos de referência específicos para as diferentes espécies de interesse, bem como a separação por sexo, estado fisiológico, faixa etária, raça, dentre outras variáveis. Entretanto, tal separação não foi necessária neste trabalho, visto que o objetivo foi modificar a mensuração dos analitos para, futuramente, determinar os intervalos de referência para os componentes séricos utilizados. Quando se trata de experimentos para a obtenção de intervalos de referência, o número de animais submetidos aos testes deve ser consideravelmente elevado, a fim de permitir que os resultados sejam extrapolados para a população de interesse (BIRGUEL JUNIOR et al, 2001). Sendo assim, a quantidade de reagente necessária para a pesquisa é bastante elevada, aumentando o custo dos projetos e inviabilizando-os. Assim, o método de mensuração de glicose sérica em microplaca se apresenta tão eficiente quanto o método de dosagem original. Na Tabela 01 estão apresentados os intervalos de referência para ovinos, encontrados na literatura, para todos os componentes avaliados neste trabalho. Na Tabela 09, podem ser visualizados os índices de correlação de Pearson para cada *checkerboard* feito para cada um dos analitos estudados. Os índices de correlação de Pearson, repetitividade, reprodutibilidade e os limites mínimos de detecção para cada um dos componentes séricos analisados neste estudo estão resumidos na Tabela 10.

**Tabela 09** - Índices de correlação de Pearson dos *checkerboards* utilizados em cada analito. Em negrito, os índices de correlação de Pearson das metodologias escolhidas.

<i>Proporção</i>	<b>Analito</b>					
	<b>Glicose</b>	<b>Ureia</b>	<b>Cloretos</b>	<b>Magnésio</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Cálcio</b>
<b>Um</b>	0,987 (P=000)	0,700 (P=0,121)	0,469 (P=0,348)	<b>0,875</b> <b>(P=0,022)</b>	0,783 (P=0,065)	0,912 (P=0,011)
<b>Dois</b>	0,990 (P=000)	<b>0,991</b> <b>(P=0,000)</b>	0,678 (P=0,139)	0,826 (P=0,043)	0,466 (P=0,352)	0,890 (P=0,018)
<b>Três</b>	0,992 (P=000)	0,982 (P=0,000)	0,732 (P=0,098)	0,752 (P=0,084)	0,983 (P=0,000)	<b>0,929</b> <b>(P=0,007)</b>
<b>Quatro</b>	0,994 (P=000)	0,986 (P=0,000)	<b>0,874</b> <b>(P=0,023)</b>	0,579 (P=0,229)	0,976 (P=0,001)	0,832 (P=0,040)
<b>Cinco</b>	<b>0,996</b> <b>(P=000)</b>	0,994 (P=0,000)	-	0,745 (P=0,090)	<b>0,963</b> <b>(P=0,002)</b>	-
<b>Seis</b>	0,993 (P=000)	0,989 (P=0,000)	-	0,825 (P=0,043)	-	-

**Tabela 10** - Índice de correlação de Pearson (1 – padronização inicial com seis amostras; 2- padronização com o teste de melhor correlação, utilizando 40 amostras) entre os valores obtidos para as amostras na metodologia original e as metodologias de escolha, repetitibilidade (%), reprodutibilidade (%) e o limite mínimo de detecção (mEq/L para os cloretos e mg/dL para os demais) do ensaio de escolha.

	Analito					
	Glicose	Ureia	Cloretos	Magnésio	Fósforo	Cálcio
<b>Pearson Correlação1</b>	0,996 (p=0,00)	0,991 (p=0,00)	0,874 (p=0,02)	0,875 (p=0,022)	0,963 (p=0,002)	0,929 (p=0,007)
<b>Pearson Correlação 2</b>	0,897 (p=0,00)	0,789 (p=0,00)	0,723 (p=0,02)	0,740 (p=0,00)	0,777 (p=0,00)	0,760 (p=0,00)
<b>Repetiti- bilidade</b>	90,07	90,71	94,6	99,95	98,58	99,55
<b>Reprodu- tibilidade</b>	82,86	81,50	99,77	88,69	72,92	69,60
<b>Limite mínimo de deteccção</b>	9,4	1,0	7,33	0,026	0,027	0,118

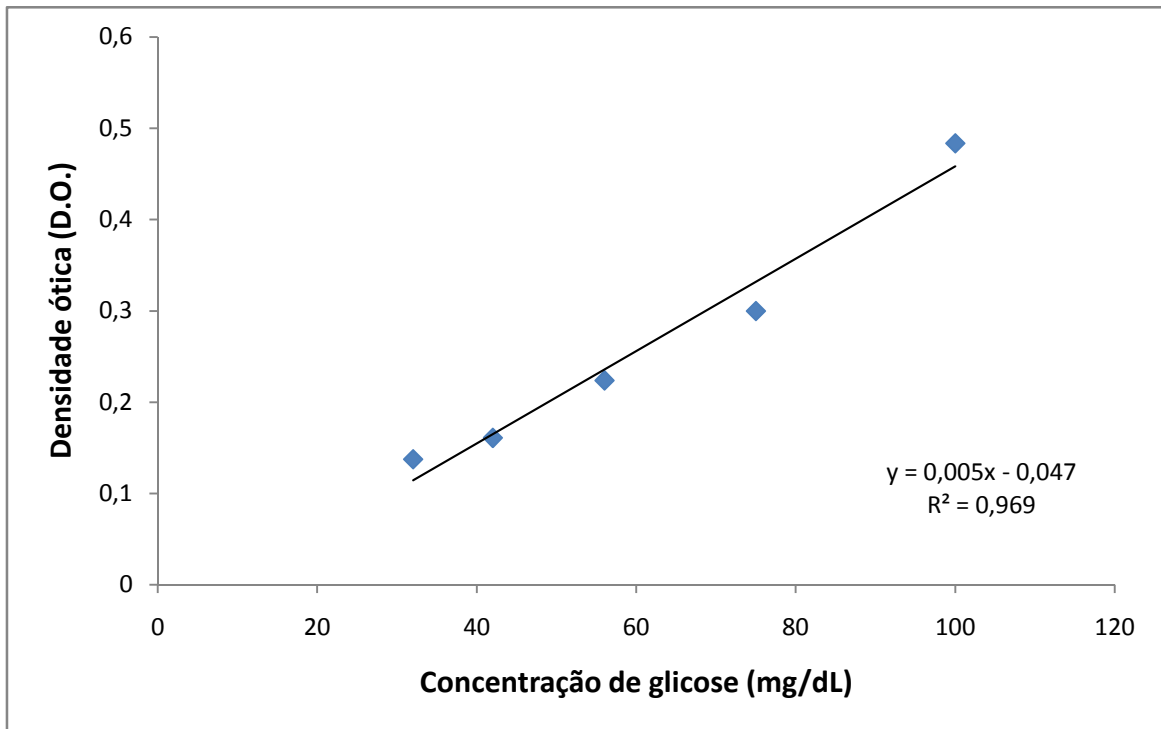
Das seis metodologias testadas em microplaca para a mensuração da glicose, a que revelou melhor correlação de Pearson com a metodologia original foi o “método cinco” (0,996; p=0,000) (Tabela 09). Foram testadas 40 diferentes amostras pelo método escolhido e pelo método clássico, também apresentando correlação de Pearson favorável (0,897; p=0,000) (Tabela 10).

Os resultados da repetitividade (média de 90,07%) e reprodutibilidade (média de resultado 82,86%) demonstram que a metodologia em microplaca tem grande potencial para ser utilizada no cotidiano.

O método desenvolvido para a glicose apresenta também boa linearidade ( $R^2=0,969$ ) e, mesmo em concentrações baixas, foi possível alcançar densidade ótica suficiente para leitura, sendo 9,4 mg/dL o limite mínimo de detecção do ensaio, valor este

obtido através da equação da reta (Figura 03). Tal valor encontra-se bem abaixo do limite inferior do intervalo de referência disponível na literatura para o metabólito (Tabela 01) (KANEKO et al., 2008).

**Figura 03** - Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de glicose testando concentrações decrescentes do padrão.



A mensuração sérica de glicose é bastante utilizada nas diversas espécies domésticas, geralmente para diagnosticar enfermidades, como a diabetes e doenças renais, ou mantê-las sob controle (PASSOS et al., 2011; SERÔDIO et al., 2008). O método de dosagem de glicose por reação de ponto final é uma metodologia clássica (BERGMEYER, 1986) e pouco custosa. Contudo, é um método que limita o número de amostras a serem analisadas conjuntamente, devido ao tempo de incubação em banho-maria (quinze minutos).

Das cinco metodologias testadas no *checkerboard* da mensuração de ureia, a que mais se destacou pela boa proporção amostra/reagente e no índice de correlação (0,991;  $p=0,000$ ) foi o método “dois” (Tabela 09). Também foram testadas 40 diferentes amostras pelo método escolhido e pelo método original, apresentando correlação de Pearson



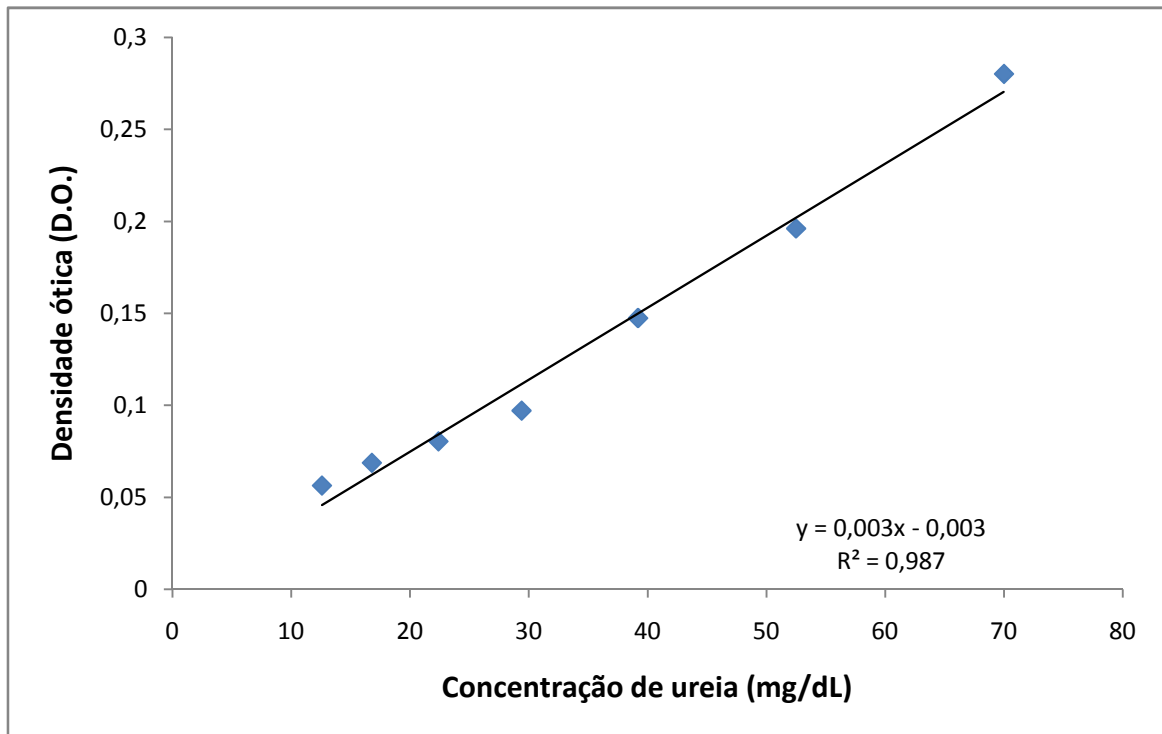
favorável (0,789;  $p=0,000$ ) (Tabela 10).

Os resultados da repetitividade (média de 90,71%) e reprodutibilidade (média de resultado 81,50%) do ensaio da uréia demonstram que a metodologia em microplaca tem grande potencial para ser utilizada rotineiramente nos laboratórios.

A dosagem de ureia sérica é muito utilizada na rotina clínica (avaliação renal e outras enfermidades sistêmicas), principalmente para caninos e felinos domésticos, que sintetizam a ureia para excretar a amônia advinda de processos metabólicos (GALVÃO et al., 2010). Já nos ruminantes, parte da ureia encontrada no organismo é proveniente da alimentação, através de suplementos (MAGALHÃES et al., 2005). Sendo um metabólito de tal importância, e pelo fato de os animais criados no Brasil possuírem manejo diferente dos animais estrangeiros, é necessário que se estabeleça um intervalo de referência nacional e regional, já que o país possui uma rica variedade de microclimas que modificam alguns parâmetros fisiológicos dos animais (BIRGEL JUNIOR et al., 2001).

A nova metodologia escolhida para a mensuração da ureia sérica apresenta uma boa linearidade ( $R^2=0,987$ ) e, mesmo em concentrações baixas, foi possível alcançar densidade óptica suficiente para leitura, sendo 1,0 mg/dL o limite mínimo de detecção do ensaio, valor este obtido através da equação da reta (Figura 04). Tal valor encontra-se bem abaixo do limite inferior do intervalo de referência disponível na literatura para o metabólito (Tabela 01) (KANEKO et al., 2008).

**Figura 04** - Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de ureia testando concentrações decrescentes do padrão.



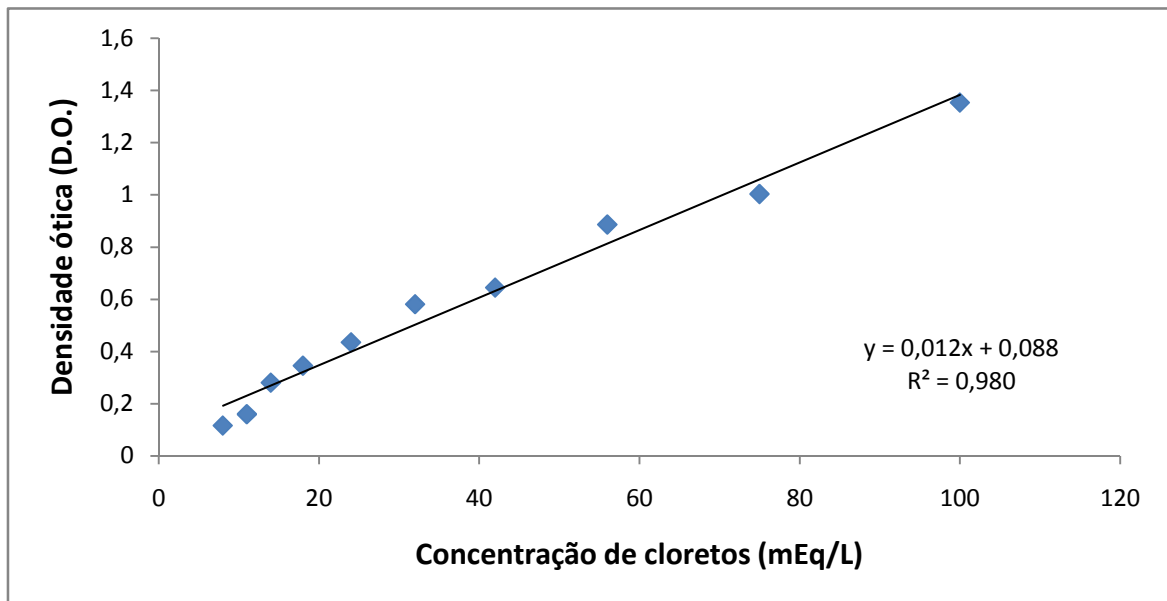
Para a mensuração dos íons cloreto, foram testadas quatro diferentes metodologias na microplaca, sendo o método “quatro” o mais adequado para a continuidade do trabalho, apresentando uma correlação de 0,874 ( $p=0,02$ ) (Tabela 09). O teste com as 40 amostras, também apresentou um bom índice de correlação (0,723;  $p=0,02$ ). O teste de repetitividade apresentou bons resultados, e teve uma média de 94,6%. Os testes de reprodutibilidade também apresentaram resultados excelentes, tendo como média 99,77% (Tabela 10).

A nova metodologia de mensuração de cloretos apresenta índices bastante semelhantes ao método original. Os íons cloreto são os ânions que mais interferem no balanço eletrolítico dos ruminantes. O balanço eletrolítico é a diferença entre os íons positivos (cátions) e íons negativos (ânions). Nas dietas dos animais, os eletrólitos devem ser balanceados, para evitar alcaloses e acidoses metabólicas.

A nova metodologia escolhida para a mensuração de cloreto sérico apresenta uma boa linearidade ( $R^2=0,980$ ) e, mesmo em concentrações baixas, foi possível alcançar densidade ótica suficiente para leitura, sendo 7,33 mEq/dL o limite mínimo de detecção do ensaio, valor este obtido através da equação da reta (Figura 05). Tal valor encontra-se bem

abaixo do limite inferior do intervalo de referência disponível na literatura para o metabólito (Tabela 01) (KANEKO et al., 2008).

**Figura 05** - Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de cloretos testando concentrações decrescentes do padrão.



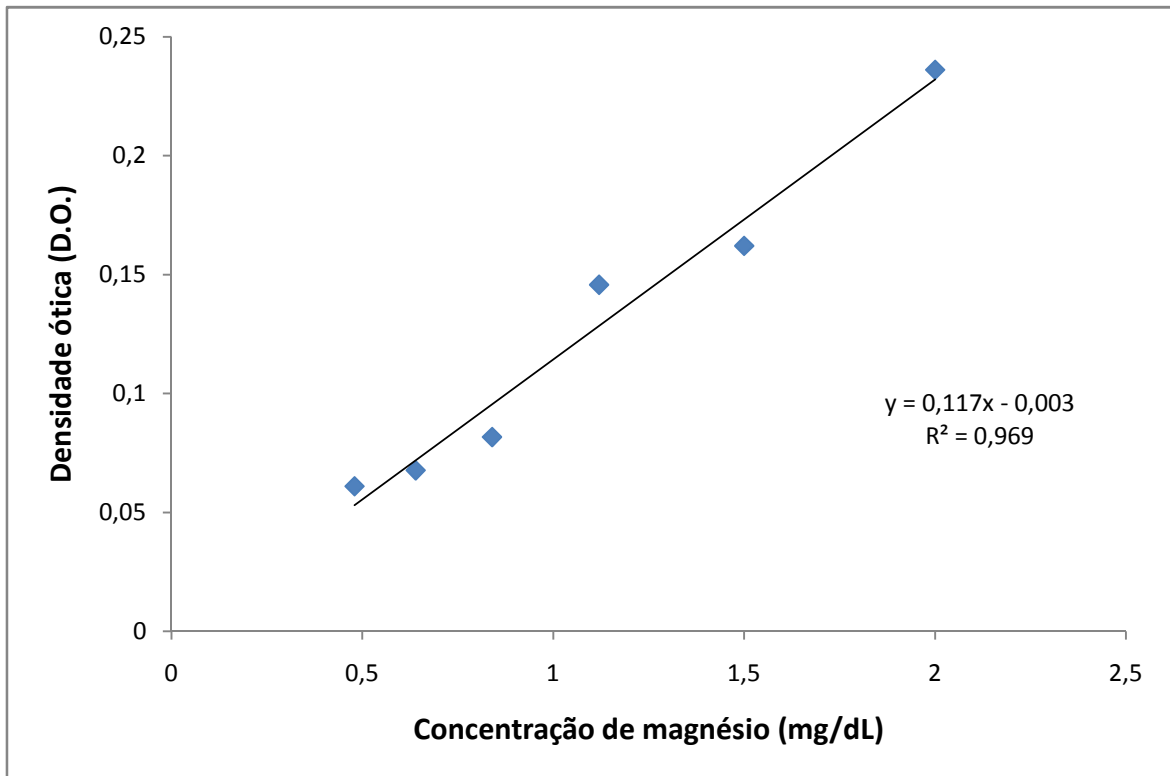
Das seis metodologias testadas para a dosagem dos íons magnésio, quatro obtiveram boa correlação com a metodologia clássica, mas o método “um” se destacou pela boa proporção reagente/amostra e pelo bom índice de correlação (0,875;  $p=0,022$ ) (Tabela 09). No teste com as 40 amostras, a correlação cubeta/microplaca foi 0,740 ( $p=0,00$ ). A repetitividade e reprodutibilidade também apresentaram bons resultados, obtendo médias de 99,95% e 88,69%, respectivamente (Tabela 10).

Sendo um mineral oriundo principalmente da alimentação de pasto e de suplementação, a dosagem sérica de magnésio é importante no diagnóstico diferencial de enfermidades de rebanho, especialmente as nutricionais (TOKARNIA et al., 2000).

Na Figura 06, é possível observar que a linearidade do teste em microplaca para o magnésio é bastante aceitável, apresentando um  $R^2=0,969$  e demonstrando que a nova metodologia pode ser tão eficaz quanto a clássica. A metodologia utilizada no presente trabalho permite a detecção de quantidades mínimas de magnésio, na concentração de 0,026 mg/dL, encontrando-se bem abaixo do limite inferior do analito descrito na literatura

(Tabela 01) (KANEKO et al., 2008).

**Figura 06** - Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de magnésio testando concentrações decrescentes do padrão.

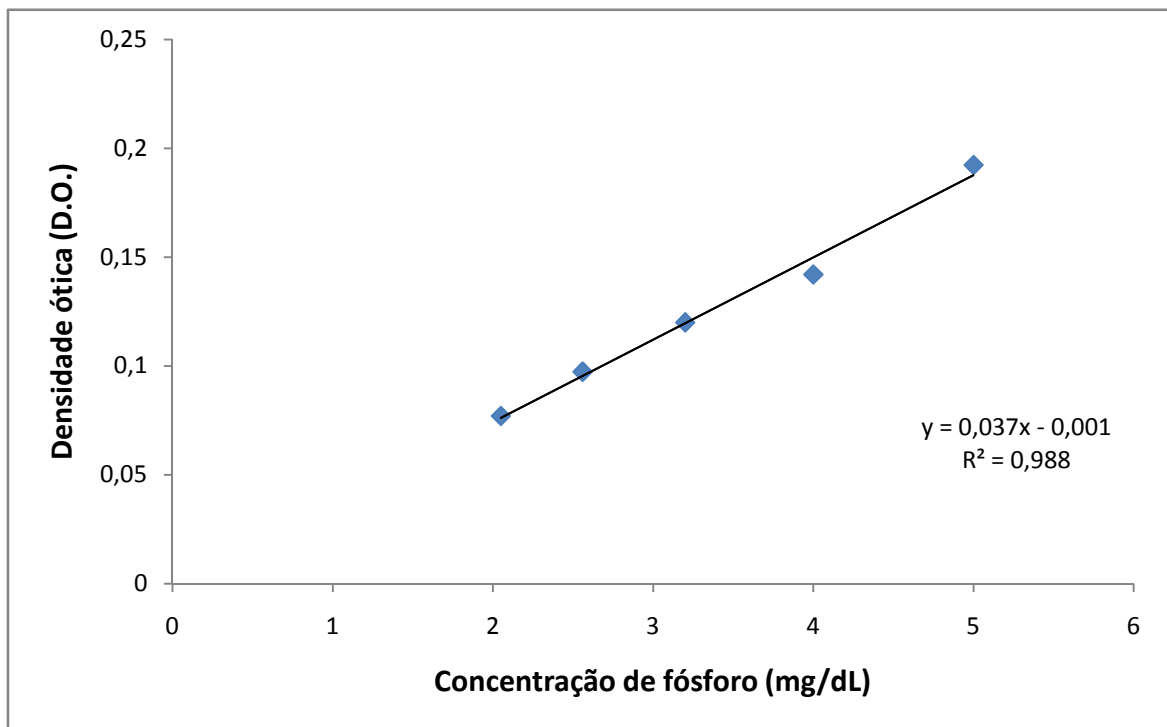


Para a mensuração dos íons fósforo, foram testadas cinco diferentes combinações, sendo o método “cinco” o que apresentou melhor correlação (0,963;  $p=0,002$ ) com o método tradicional (Tabela 09) e melhor proporção reagente/amostra (Tabela 06). Foram testadas 40 diferentes amostras pelo método escolhido e pelo método original, também apresentando correlação de Pearson favorável (0,777;  $p=0,00$ ) (Tabela 10). Os resultados da repetitividade (média de 98,58%) e reprodutibilidade (média de resultado 72,92%).

O método desenvolvido para o fósforo apresenta também boa linearidade ( $R^2=0,988$ ) e, mesmo em concentrações baixas, foi possível alcançar densidade ótica suficiente para leitura, sendo 0,027 mg/dL o limite mínimo de detecção do ensaio, valor este obtido através da equação da reta (Figura 07). Tal valor encontra-se bem abaixo do limite inferior do intervalo de referência disponível na literatura para o metabólito (Tabela 01) (KANEKO et al., 2008).

A hiperfosfatemia, juntamente com a azotemia, são as alterações mais vistas em cães com insuficiência renal crônica. A dosagem de eletrólitos séricos e urinários em conjunto com outros exames, possibilitam uma avaliação do estado da função renal, servindo como parâmetro para a escolha da terapia a ser utilizada (GALVÃO et al., 2010). Como foi visto anteriormente, ainda não existem intervalos de referência nacionais para o analito, fazendo-se necessária a utilização de métodos rápidos e simples para sua determinação. O método de mensuração de fósforo sérico em microplaca se apresenta com potencial de eficiência tão boa quanto o método.

**Figura 07** - Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de fósforo testando concentrações decrescentes do padrão.

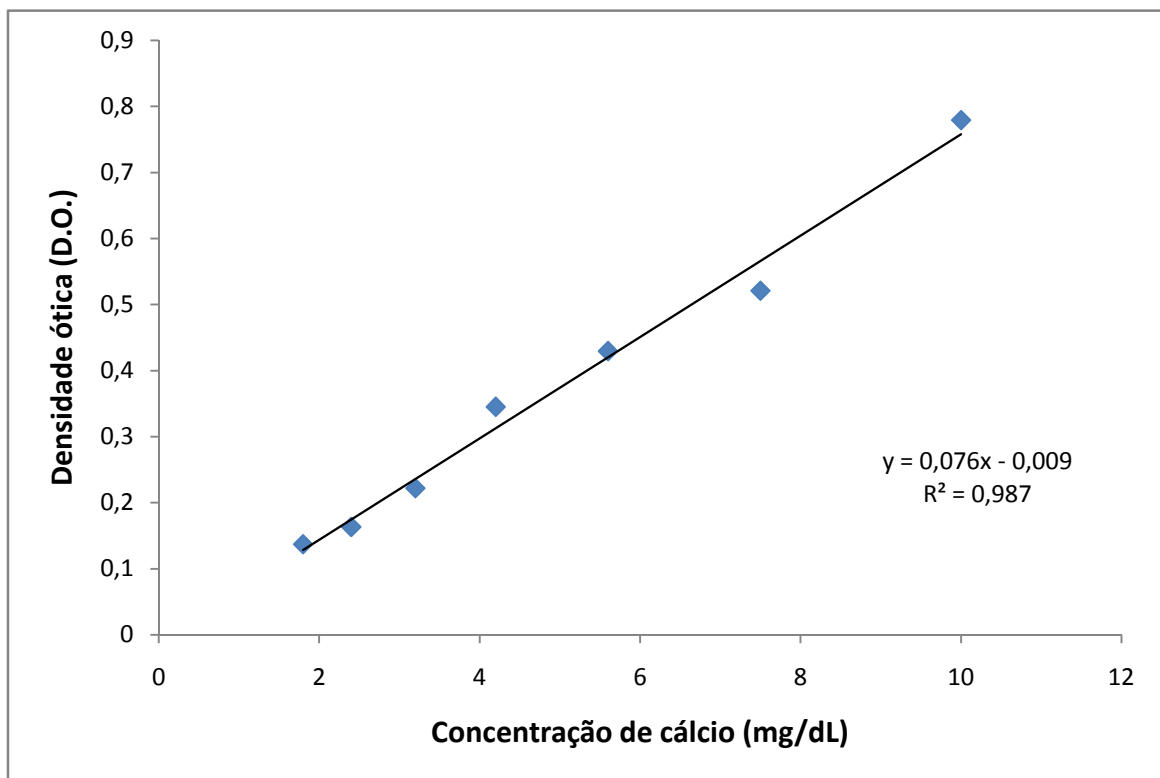


Para a mensuração dos íons cálcio, foram testadas quatro diferentes metodologias, sendo o método “três” o que apresentou melhor correlação (0,929;  $p=0,007$ ) com o método tradicional (Tabela 09). Após testar as 40 amostras pelos métodos original e em microplaca, a correlação entre ambos ficou em 0,760 ( $p=0,00$ ) (Tabela 10). A repetitividade apresentou bons índices, obtendo-se uma média de 99,55%. A reprodutibilidade também apresentou bons resultados, tendo uma média de 69,60.

O cálcio, juntamente com o fósforo, é a principal matéria mineral que compõe o tecido ósseo. Durante a fase de crescimento dos animais, seus níveis séricos apresentam-se mais elevados, mas algumas moléstias podem alterar tais concentrações, como dietas mal balanceadas (OLIVEIRA, 2011). O cálcio participa da contração muscular (BUCCI et al, 2006) e os sintomas provocados pela deficiência do mineral podem ser confundidos com doenças de notificação obrigatória, induzindo os clínicos a uma investigação bastante criteriosa para evitar equívocos (NOVAIS e ZAPPA, 2008).

O método desenvolvido apresenta excelente linearidade, com  $R^2=0,987$ , e permite a detecção de quantidades mínimas de cálcio, na concentração de 0,118 mg/dL (Tabela 01) (KANEKO et al., 2008). Isto demonstra que, mesmo em concentrações baixas, foi possível alcançar densidade ótica, confirmando que a qualidade do teste não foi afetada pela modificação das quantidades de reagente e amostra (Figura 08).

**Figura 08** - Análise de dispersão correlacionando as diferentes concentrações de padrão e as densidades óticas obtidas, quando da utilização do ensaio de escolha para dosagem de cálcio testando concentrações decrescentes do padrão fornecido.



As novas metodologias testadas permitem a realização simultânea de 46 amostras, com exceção do analito fósforo, onde recomenda-se a realização de 20 amostras

simultâneas, devido aos tempos de incubação/pipetagem e à curta estabilidade da reação. Além disso, se aplicadas da maneira correta, observando o grau de limpeza dos materiais utilizados, o armazenamento dos reagentes, o tempo de incubação bem como o tempo de pipetagem, tais metodologias podem representar opções de mensuração a serem assumidas como padrão laboratorial. Os limites máximos de detecção de todos os analitos do presente estudo não foram mensurados, pois as concentrações das soluções padrão dos kits comerciais utilizados apresentam valores não adequados para a determinação dos limites superiores de detecção.

Observando os dados apresentados na Tabela 11, percebe-se que as novas metodologias possuem custos menores com reagentes que os métodos originais, o que reforça a possibilidade de utilização dos métodos para as mensurações padronizadas. Os custos com ponteiras, pipetas, tubos de ensaio, microplacas e cubetas de quartzo não foram incluídos no estudo, pois são materiais de uso rotineiro nos laboratórios.

**Tabela 11** - Descrição da diminuição do uso de reagentes e do custo de reagente por teste de cada amostra (levando em consideração preços médios comerciais dos kits utilizados) na comparação entre a metodologia original e a metodologia desenvolvida para mensuração de cada analito.

	Analito					
	Glicose	Ureia	Cloretos	Magnésio	Fósforo	Cálcio
Número de testes (original)/kit	500	500	140	100	100	60
Número de testes (microplaca)/kit	830	2500	700	285	500	150
Custo do teste por amostra (clássico)	R\$0,10	R\$0,17	R\$0,27	R\$0,37	R\$0,33	R\$0,73
Custo do teste por amostra (microplaca)	R\$0,06	R\$0,04	R\$0,06	R\$0,14	R\$0,06	R\$0,30
Redução do custo (%)	40	71,43	77,78	62,16	81,82	58,90

As pesquisas de determinação de intervalos de referência é outro fator que ratifica as vantagens das novas metodologias, pois reduz o valor gasto e o tempo de execução dos testes em grandes rebanhos. Como dito anteriormente, o Brasil carece muito de valores de referência nacionais para as espécies domésticas, o que dificulta a comparação de dados numa pesquisa. As técnicas propostas neste estudo possibilitam a mensuração de até 46 diferentes amostras em um único momento, aumentando assim a velocidade de todo o método diagnóstico em rebanhos e aumentando a eficiência das pesquisas.

Assim, mesmo reconhecendo a importância da mensuração dos analitos deste estudo, o Brasil ainda utiliza os valores de referência obtidos em outros países, cujos animais utilizados para a definição dos intervalos são criados em condições bastante divergentes às nossas. Os resultados da repetitividade e reprodutibilidade demonstram que a mensuração do cálcio em microplaca é viável, o que facilitará as determinações de intervalos de referência do mineral nas diversas regiões do país.

Como as metodologias propostas utilizam menor quantidade de amostra e reagentes, para as espécies silvestres e animais de laboratório, os ensaios padronizados no presente estudo representam um grande avanço, visto que muitos destes animais são pequenos (passariformes, psitacídeos, murinos, anfíbios, peixes, dentre outros) e/ou de difícil contenção física (pequenos primatas), resultando em amostras de pouco volume. Após as devidas padronizações e validações, as metodologias podem ser aplicadas em diferentes espécies animais.

Sendo métodos simples, é possível utilizar os novos protocolos em qualquer laboratório equipado com espectrofotômetro associado a leitura de microplaca, obedecendo a amplitude dos comprimentos de onda necessários e, como as amostras são mensuradas em duplicata (ao invés da monoplicata comumente utilizada nas metodologias clássicas), reduz-se a possível influência de erros de procedimento, principalmente os erros de pipetagem.

As metodologias propostas para os componentes séricos utilizados neste trabalho apresentaram resultados compatíveis com os métodos originais, demonstrando que a qualidade do teste não foi afetada pela modificação das quantidades de reagente e amostra. Sendo assim, os resultados deste trabalho podem fomentar a realização de futuros estudos de novos valores de referência, bem como novas pesquisas com outros componentes séricos.



## **6. CONCLUSÕES**

A dosagem bioquímica de componentes séricos em microplaca é viável, segura e econômica, facilitando todo o processo de mensuração dos metabólitos e a determinação de intervalos de referência dos mesmos. Acredita-se que os métodos padronizados no estudo poderão ser utilizados para as dosagens em animais domésticos sem quaisquer intercorrências, visto que a composição bioquímica dos soros destes animais não difere qualitativamente de forma significativa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DE CAPRINOS E OVINOS (ANCO). Caprinos e ovinos: maiores rebanhos do mundo. Disponível em: <<http://anco.cnpc.embrapa.br/noticias.php?sequencia=217>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R.; OLIVEIRA, E. L.; ALVES, F. S. F. Desafios sanitários e manejo da ovinocultura. **EMBRAPA Ovinos e Caprinos**, 2009.

ARANTES, U. M. Desempenho, digestibilidade e aspectos metabólicos de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes números de Mongin ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ ). **Dissertação Universidade Federal de Goiás**, GO – Brasil, PPG em Ciência Animal, 75 f., 2008.

BAGINSK, E. S. Determination of phosphate and phosphomonoesterases in biologic materials. **American Journal of Medical Technology**, v. 35, p. 475, 1969.

BAGINSK, E. S. **Selected Methods of Clinical Chemistry**, 1982, c. 9, p. 125.

BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**, v. 9, p. 449-453, VCH Publishers, 1985.

BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**, 3ª edição, v. VI, Deerfield Beach: VCH, 1986:178-184.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGUEL, E. H. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 136-141, 2001.

BOHUON, C. Microdetermination of magnesium in various biological media. **Clinica Chimica Acta**, v. 7, p. 811, 1962.

BRAUN, J.P.; TRUMEL, C.; BÉZILLE, P. Clinical biochemistry in sheep: A selected review. **Small Ruminant Research**, v.10, n.1-3, p. 10-18, 2010.

BUCCI, M.; VINAGRE, E. C.; CAMPOS, G. E. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Efeitos do treinamento concomitante hipertrofia e endurance do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2006.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz Text book of Clinical Chemistry**, Philadelphia: Saunders Company, 1994, 1366-1367.

CAMPOS, L. M. A.; LIPHAUS, B. L.; SILVA, B. A. A.; PEREIRA, R. M. R. Osteoporose na infância e na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 6, p. 481-188, 2003.

CARNEIRO, P. L. S.; MALHADO, C. H. M.; SOUZA JÚNIOR, A. A. O.; SILVA, A. G.

S.; SANTOS, F. N.; SANTOS, P. F.; PAIVA, S. R. Desenvolvimento ponderal e diversidade fenotípica entre cruzamentos de ovinos Dorper com raças locais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 991-998, 2007.

CASTAÑEDA, R. D.; BRANCO, A. F.; CONEGLIAN, S. M.; BARRETO, J. C.; GRANZOTTO, F.; TEIXEIRA, S. Substituição de ureia por cloreto de amônio em dietas de bovinos: digestibilidade, síntese de proteína microbiana, parâmetros ruminais e sanguíneos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 31, n. 3, p. 271-277, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory**; Approved Guideline. 3ª edição, editora Wayne, 2008.

COCIMANO, M. R.; LENG, R. A. Metabolism of urea in sheep. **The British Journal of Nutrition**, v.21, n. 2, p. 353-371, 1967.

CRUZ, C. A. C. Caracterização lipídica da paleta de cordeiros santa Inês. 2009. 82f. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga**.

DIAS, M. I. R.; CARNEIRO, M. J. R.; AZEVEDO, J. M. T.; FERREIRA, A. J.; CABRITA, S. Parâmetros hematológicos, de bioquímica sanguínea geral, electrólitos plasmáticos e das hormonas relacionadas com a função da tiróide na ovelha da raça Churra da Terra Quente. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 550, p. 99-107, 2004.

EMANUELLI, M. P.; LOPES, S. T. A.; MACIEL, R. M.; GARMATZ, B. C.; TAVARES, M. O. concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamyltransferase, ureia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.

FERREIRA, C. E. S.; ANDRIOLO, A. Intervalos de referência no laboratório clínico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 1, p. 11-16, 2008.

GALVÃO, A. L. B.; BORGES, J. C.; VIEIRA, M. C.; FERREIRA, G.; LÉGA, E.; PINTO, M. Alterações clínicas e laboratoriais de cães e gatos com doença renal crônica: revisão de literatura. **Nucleus Animalium**, v. 2, n. 1, p. 23-40, 2010.

GEFFRÉ, A.; FRIEDRICHS, K.; HARR, K.; CONCORDET, D.; TRUMEL, C.; BRAUN, J.P. Reference values: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 3, p. 288-298, 2009.

GREGORY, L.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; DE ARAÚJO, J. P.; BIRGEL, E. H. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 71, n.3, p. 339-345, 2004.

HORN, P. S.; PESCE, A. J. Reference intervals: an update. **Clinical Chimica Acta**, v.334, p.5-23, 2003.

IBGE. Tabela 17 – Efetivo de ovinos em 31.12 e participações relativas e acumuladas no efetivo total, segundo as Unidades da Federação e os 20 municípios com os maiores efetivos, em ordem decrescente. **IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisas da Pecuária Municipal**, 2010.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6ª edição, editora Elsevier/Academic Press, Amsterdam, 2008, p. 194; 414; 423-424; 488-489; 530; 781; 901-902.

LACERDA-NETO, J. C.; SAMPAIO, R. C. L.; FERRAZ, G. C.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; PEREIRA, D. M.; TITTO, E. A. L.; CARVALHO, M. B.; QUEIROZ-NETO, A. Efeitos do resfriamento intermitente e de repositor eletrolítico sobre a osmolalidade e eletrólitos séricos de equinos submetidos a exercícios de baixa intensidade. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 548, p. 189-195, 2003.

LEPHERD, M. L.; CANFIELD, P. J.; HUNT, G. B.; BOSWARD, K. L. Haematological, biochemical and selected acute phase protein reference intervals for weaned female Merino lambs. **Australian Veterinary Journal**, v. 87, n. 1-2, p. 05-11, 2009.

LUTHRA, K. Basic concept of clinical biochemistry, p. 01-31, 2008. Disponível em: [http://nsdl.niscair.res.in/bitstream/123456789/691/1/ClinicalBiochem\\_Concepts.pdf](http://nsdl.niscair.res.in/bitstream/123456789/691/1/ClinicalBiochem_Concepts.pdf). Acesso em: 10/08/2013.

MAGALHÃES, K. A.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; PAIXÃO, M. L.; PINA, D. S.; PAULINO, P. V. R.; CHIZZOTTI, M. L.; MARCONDES, M. I.; ARAÚJO, A. M.; PORTO, M. O. Produção de proteína microbiana, concentração plasmática de ureia, e excreções de ureia em novilhos alimentados com diferentes níveis de ureia ou casca de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1400-1407, 2005.

MAHABIR, S.; WEI, Q.; BARRERA, S. L.; DONG, Y. Q.; ETZEL, C. J.; SPITZ, M. R.; FORMAN, M. R. Dietary magnesium and DNA repair capacity as risk factors for lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 5, p. 949-956, 2008.

MEIRA JR, E. B. S.; RIZZO, H.; BENESI, F. J.; GREGORY, L. Influência dos fatores sexuais e etários sobre a proteína total, fração albumina e atividade sérica de aspartato-aminotransferase e gama-glutamilttransferase de ovinos da raça Santa Inês. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 448-454, 2009.

MOHRI, M.; SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 30-39, 2007.

MORAES, D. V. Perfil bioquímico sérico de bezerros mestiços durante o primeiro ano de vida. **Dissertação Universidade Federal de Uberlândia**, MG – Brasil, PPG em Ciências Veterinárias, 32 f., 2011.

NOVAIS, B. A. F.; ZAPPA, V. Raiva em bovinos – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 10, p. 01-07, 2008.

OLIVEIRA, D. E. Material técnico sobre minerais 1. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABbaEAA/apostila-tecnica-minerais>. Acesso em: 30 set. 2013.

OLIVEIRA, D. E. de. Minerais: funções, deficiências, toxidez e outros aspectos da suplementação. In: AGROCERES: Nutrição Animal. Agrocere NA: artigos. Disponível em: <<http://d.yimg.com/kq/groups/23513213/1369054970/name/Minerais.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2011.

PASSOS, L. B. D.; LIMA, B. L. S.; CHAVES, K. M.; ALVES, M. S. C. F.; SOARES, L. A. L.; ARAÚJO, A. A. Efeito do uso crônico de tobramicina sobre os níveis de glicose, HDL e triglicérides em ratos Wistar. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n.2, p. 157-161, 2011.

PEIXOTO, L. A. O.; OSÓRIO, M. T. M. Perfil metabólico protéico e energético na avaliação do desempenho reprodutivo em ruminantes. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 299-304, 2007.

PEREIRA, E. S.; ARRUDA, A. M. V.; MIRANDA, L. F.; MIZUBUTI, I. Y.; MUNIZ, E. B.; PINTO, A. P. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminantes. **Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 125-134, 2005.

PÉREZ, J. M.; GONZÁLEZ, F. J.; GRANADOS, J. E.; PÉREZ, M. C.; FANDOS, P.; SORIGUER, R. C.; SERRANO, E. Hematologic and biochemical reference intervals for Spanish Ibex. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 1, p. 209–215, 2003.

RICE, C. G.; HALL, B. Hematologic and Biochemical Reference Intervals for Mountain Goats (*Oreamnos americanus*): Effects of Capture Conditions. **Northwest Science**, v. 81, n. 3, p. 206-214, 2007.

ROSSI, L.; TIRAPGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 13, n. 1, p. 67-82, 1999.

SERÔDIO, A. T.; CARVALHO, C. B.; MACHADO, J. A. Glicemia em cães (*Canis familiaris*) com glucômetro digital portátil e teste laboratorial convencional. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 1, n. 1, p. 25-34, 2008.

SILVA, P. C. A. R.; PITOMBO, C. A.; CAETANO, L. F. O.; LIMA, A. G.; ARÊAS, V. S.; VARGAS JÚNIOR, R. Urolitíase em novilho nelore não-castrado. **Veterinária em Foco**, v. 5, n.2, p. 131-136, 2008.

SOBREIRA, M. F. R.; CASALE, R. V. P.; AZENHA, E. S.; RAYMUNDO, A. C.; TREVISAN, A. L.; CAMPLESI, A. C.; MOT, F. C. D.; VIEIRA, M. C. Atividade da enzima gamaglutamiltransferase urinária como meio auxiliar de diagnóstico e prognóstico de nefropatias. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos>. Acesso em: 19 jul. 2013.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 127-138, 2000.

WALTON, R. M. Establishing reference intervals: health as a relative concept. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10 p. 67-71, 2001.

YANAKA, R.; CAMARGO, D. G.; SANTOS, W. A.; CAVASSANO, B. S.; BOVINO, F.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; FEITOSA, L. F. L. Glicemia, proteinograma e perfil de alguns componentes bioquímicos séricos de caprinos da raça Bôer. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 30-38, 2012.