

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“DEFINIÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
DETERMINAÇÃO DE FERRO EM SANGUE DE BOVINOS
RESISTENTES E SENSÍVEIS A CARRAPATOS”**

Cláudia Bartoli Pelizaro*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Ana Rita de Araújo Nogueira

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2007**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P384dm

Pelizaro, Cláudia Bartoli.

Definição de metodologias para determinação de ferro em sangue de bovinos resistentes e sensíveis a carrapatos / Cláudia Bartoli Pelizaro. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 81 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Química analítica. 2. Sangue. 3. Bovino. 4. Ferro. I. Título.

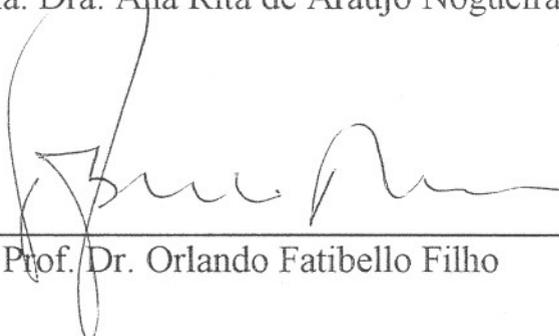
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

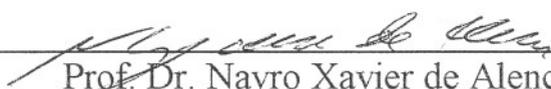
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Cláudia Bartoli Pelizaro** realizado em 22 de junho de 2007:*



Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Edda e Luiz Antonio, ao meu irmão,
Kiko e a toda minha família que
sempre acreditaram em mim, dando
todo apoio e carinho.**

“Uma longa viagem se inicia com um passo”

Lao Tsé

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida.

À Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

À Profa. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira pela orientação, amizade, paciência e compreensão.

À Embrapa Pecuária Sudeste pelo espaço físico, equipamentos e apoio para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Joaquim Araújo Nóbrega pelas idéias, auxílios e amizade.

À Dra. Luciana Correia de Alencar Regitano por todas as idéias sugeridas, pelas muitas dúvidas sanadas e espaço cedido dentro do laboratório.

À Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira por todo auxílio, coletas de amostras, conversas e espaço cedido dentro do seu laboratório.

Ao Dr. Mauricio Mello de Alencar pela ajuda na escolha das amostras, pelas dicas e auxílio na coleta do sangue.

Ao Dr. Alfredo Ribeiro de Freitas pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

Ao GAIA (Amália, Adriana Alice, Adriana Nori, Adriana Soares, Alexandra, Allen, Adréa Fernandes, Adrea Oliveira, Caio, Carla Bossu, Daniela, Edivan, Eveline, Fabiana, Fernanda, Gilberto, Guto, Juliana, Lílian, Mário, Marquinhos, Rodolfo, Silmara, Silvéria, Silvia, Wladiana), grupo que me orgulho muito de ter participado. Obrigado pelos momentos felizes, pelas mãozinhas dadas nos momentos difíceis, pelas companhias no trabalho fora de hora, pelas idéias que foram essenciais para o projeto, por toda amizade, risadas, desabafos e festas. Agradeço também aos EX-GAIA. Amo vocês!!!!

Aos funcionários da EMBRAPA Pecuária Sudeste por todo apoio, ajuda, amizade. Um obrigado especial à Lourdes, Gilberto, Gilbertinho, Marcão, Avaré, Nacir, Cidinha entre outros que foram essenciais.

Aos estagiários e pós-graduandos dos laboratórios de Sanidade Animal e de Genética da EMBRAPA Pecuária Sudeste por todo auxílio, amizade e momentos que passamos juntos.

Às várias amigas de república (Ana Carla, Ana Cláudia, Ariane, Clarissa, Fernanda, Francine, Paulinha e Raquel) por todos os momentos que vivi com vocês. Momentos felizes, difíceis, engraçados e de muita união. Amo todas!!!!

Aos meus amigos verdadeiros que fiz na faculdade: Francini, Gezimar e Luis. Nossas histórias serão para sempre lembradas, tenho vocês dentro do meu coração!!!!

Aos meus amigos de Franca (Inaê, Mirinha, Taila, Talita, Tatiano, entre outros) por sempre acreditar em mim e dar apoio incondicional.

Aos meus pais, Edda e Luiz Antonio, pela força, apoio, amor e esforço para me dar a melhor educação.

Ao meu irmão, Kiko, e sua namorada, Valéria, por varias dúvidas sanadas, pelo apoio e carinho nesse tempo todo.

À minha família (Tia, Tia Romana, Tia Carminha, Tio Dahul, Anninha, Amanda, Alex, Cleiton, Celton, Iglai, Felipe, Natalia, Carola, João Pedro, Gislaine, Marcelo e Leila) pelo apoio, força e amor.

Ao meu Anjo que sempre esteve ao meu lado, tanto para dar bronca como apoio e um ombro em todos os momentos.

Um obrigado especial à Eveline, Mario e Sherlan. Vocês foram essenciais nessa dissertação.

À Nanox (Aline, André, Cristiano, Daniel, Gustavo, Mauricio, Michelle e Thalita) pela oportunidade, amizade e compreensão durante a redação da dissertação.

A todos que conheci nesses anos, colegas de disciplinas, de mini-cursos, escolas de verão e de inverno, festas e barzinho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Obrigado a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho e desculpe se esqueci de citar alguém.

Índice de Tabelas

TABELA 3.1: Parâmetros utilizados para a determinação do Fe total por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).....	30
TABELA 3.2: Programa de aquecimento utilizado no GFAAS.....	31
TABELA 3.3: Programa utilizado na digestão das amostras	32
TABELA 4.1: Programa de aquecimento utilizado no GFAAS.....	51
TABELA 4.2: Parâmetros utilizados para a diálise.....	52
TABELA 4.3: Resultados do teste <i>t</i> para as variáveis analisadas de acordo com a raça.	59
TABELA 4.4: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Nelore no ano 1 (2005).....	60
TABELA 4.5: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Canchim no ano 1 (2005).....	61
TABELA 4.6: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Angus no ano 1 (2005).....	62
TABELA 4.7: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Simental no ano 1 (2005).....	62
TABELA 4.8: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Canchim no ano 2 (2006).....	63
TABELA 4.9: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Simental no ano 2.....	64

Índice de Figuras

FIGURA 2.1: Esquema representativo do ciclo de vida do carrapato (www.carrapatobovino.com)	10
FIGURA 2.2: Esquema de absorção, retenção e excreção do Fe no organismo.	13
FIGURA 2.3: Esquema de formação de radicais livres causadores de estresse oxidativo em parasitas (Adaptado de Oliveira, 2002).....	15
Figura 2.4: Base da Análise em fluxo (modificado de www.flowinjection.com)	22
FIGURA 3.1: Tubos à vácuo utilizado para coleta de sangue. As tampas dos frascos possuem colorações diferentes para melhor visualização e diferenciação entre seus conteúdos.....	33
FIGURA 3.2: Esquema das metodologias utilizadas para determinar teores de ferro no sangue.	34
Figura 3.4: Curvas de pirólise e atomização para Tris-ácido acético	38
FIGURA 3.5: Esquema do sistema em fluxo utilizado para a especiação de ferro	40
FIGURA 3.6: Reação de redução do ferro para determinação de ferro total..	40
FIGURA 3.7: Curvas analíticas do sistema em fluxo para determinação de Fe II e Fe total, referentes ao início e final de um lote de amostras.....	41
FIGURA 3.8: Exemplo de como é feita a leitura do volume de glóbulos vermelhos em um hematócrito.....	60
FIGURA 4.1: Teores de Fe total obtidos em amostras de sangue de animais das raças Angus, Canchim, Simental e Nelore no ano de 2005 submetidos à infestação com carrapatos.	45

FIGURA 4.2: Teores de Fe total obtidos em amostras de sangue I no segundo período do estudo (ano 2).	46
FIGURA 4.3: Teores de Fe total obtidos nas amostras de soro e plasma durante experimento realizado no ano 1 (2005).....	48
FIGURA 4.4: Teores de Fetotal obtidos nas amostras de soro e plasma I durante experimento realizado no ano 2 (2006).....	49
FIGURA 4.5: Curvas de pirólise e atomização, obtidas para a definição do programa de aquecimento para a determinação de ferro livre em meio tampão Tris-ácido acético.....	50
FIGURA 4.6: Teores de ferro livre referente ao segundo período do experimento.	53
FIGURA 4.7: Curvas analíticas de referência obtidas no sistema por análise em fluxo para determinação de Fe(II) e Fe total.	54
FIGURA 4.8: Teores de Fe(II) e Fe(III) determinados pelo sistema de análise em fluxo apresentado no item 3.4.4 (Materiais e Métodos).....	55
FIGURA 4.9: Hematócrito dos animais analisados no primeiro período do experimento (ano 1 - 2005).....	56

DEFINIÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO EM SANGUE DE BOVINOS RESISTENTES E SENSÍVEIS A CARRAPATOS. Diferentes formas de ferro foram determinadas no sangue de animais com resistência e sensibilidade a carrapatos. As variáveis determinadas foram: Fe total no sangue; plasma e soro sanguíneos, quantificados por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), Fe(II) e Fe(III) por espectrofotometria e análise por injeção em fluxo(FIA); Ferro livre com o emprego de diálise em fluxo e quantificação por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS); e hematócrito (volume globular). As técnicas utilizadas e as metodologias desenvolvidas se mostraram complementares e adequadas para a investigação das formas de ferro encontradas no sangue. Não foi necessária a digestão do sangue para determinar o teor de ferro total por FAAS, evitando possíveis contaminações e diminuição no tempo de preparo das amostras. A especiação de Fe(II) e de Fe(III) por análise de injeção em fluxo apresentou boa reprodutibilidade e de fácil implementação em análises de rotina. Após a separação do ferro livre da matriz por uma membrana de diálise, foi possível quantificar as baixas concentrações por GFAAS. Estudo estatístico foi realizado para uma melhor comparação entre as variáveis. O teste *t* indicou diferenças entre animais resistentes e sensíveis das raças Canchim e Angus em relação aos teores de ferro presentes no plasma sanguíneo e no teor de Fe(III) entre animais resistentes e sensíveis da raça Angus. Apesar de não conclusivos, os resultados indicaram uma possível tendência entre a resistência bovina aos carrapatos e alguma espécie de ferro presente no sangue. Com o emprego das metodologias definidas no presente trabalho, estudos com um maior número de animais e menores variáveis poderão vir a confirmar essa hipótese.

DEFINITION OF METODOLOGIES FOR DETERMINATION OF IRON IN BLOOD OF RESISTANT AND SENSITIVE BOVINE'S TICKS. Different forms of iron had been determined in the blood of animals with resistance and sensitivity to bovine's ticks. The determined variables were: Iron in total, plasma and serum blood, quantified by flame atomic absorption spectrometry (FAAS); Fe (II), and Fe (III), quantified by spectrophotometry by flow injection analyses; iron freedom through flow dialysis and quantification by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS); and hematocrit (packed cell volume). The used techniques and the developed methodologies are shown as complementary and adequate for the inquiry of the forms of iron founded in the blood. Blood digestion was not necessary for FAAS total iron determination, avoiding possible contaminations and decreasing the time spending to sample preparation. The Fe(II) and Fe(III) flow injection speciation presented good reproducibility and easy to implement in routine analysis. After freedom iron separation by dialysis membrane, GFAAS allowed the determination of small iron amounts. A statistical study was used for better comparison among the evaluated variables. The *t* test indicated differences between Canchim and Angus animals resistant and sensible to ticks related to iron amount in the blood's plasma, and in the Fe(III) amount between Angus resistant and sensible animals. In spite of no conclusives, the results indicated a possible tendency related to bovine ticks resistance and iron blood form. With the use of the methodologies defined in the present work, studies with a grater number of animals and small variables could be applied to confirm this hypothesis.

Sumário

<i>1. Introdução</i>	1
Objetivos	4
<i>2. Revisão Bibliográfica</i>	7
2.1 - Carrapatos	9
2.2 – Ferro	11
2.3 – Especiação	16
2.4 – Espectrometria de Absorção Atômica	16
<i>2.4.1- Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)</i>	17
<i>2.4.2- Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS)</i>	17
<i>2.4.2.1 – Modificadores Químicos</i>	19
2.5 – Diálise.....	20
2.6 – Análise em Fluxo.....	21
2.7 – Hematócrito	24
<i>3. Materiais e Métodos</i>	27
3.1- Reagentes e vidrarias.....	28
3.2- Instrumentação	29
3.3- Amostras	32
3.4- Procedimento	34
<i>3.4.1 – Separação do Soro e do Plasma</i>	35
<i>3.4.2 – Determinação de Fe total</i>	35
<i>3.4.3 – Fe livre</i>	36
<i>FIGURA 3.3: Fotos da câmara de diálise em funcionamento.</i>	37
<i>3.4.4 – Fe(II) e Fe(III)</i>	39
<i>3.4.5 – Hematócrito</i>	41

<i>4. Resultados e Discussão</i>	43
4.1 – Ferro Total	44
4.1.1- <i>Sangue</i>	44
4.1.2 – <i>Soro e Plasma</i>	47
4.2 – Ferro livre	49
4.3- Sistema de Análise em Fluxo	54
4.4- Hematócrito.....	56
4.5 – Análise Estatística	58
4.5.1 – <i>Teste T</i>	58
4.5.2 – <i>Correlação de variáveis</i>	60
5. Conclusão.....	67
6. <i>Referências Bibliográficas</i>	69

1. Introdução

1. Introdução

Mesmo com a crise no setor de bovinos de corte no ano de 2006 no Mato Grosso do Sul e Mato Grosso com a febre aftosa, houve um crescimento de 5,5% no setor. Esse setor tem uma grande importância no agro-negócio no Brasil, gerando um faturamento de R\$ 3,92 bi em 2006 e abastecendo 30% do mercado mundial. O Brasil foi o maior exportador de carne bovina no mundo em 2006.

O mercado externo é muito exigente em relação à qualidade e aparência do produto. Por esse motivo, pequenas imperfeições no couro podem prejudicar seu preço. Essas imperfeições podem ser causadas por carrapatos que parasitam os animais no campo. Esses danos causados na epiderme (camada superficial da pele) podem ser disfarçados nos curtumes, mas o valor agregado ao material diminui.

O carrapato mais comumente encontrado no Brasil é o *Bbophilus microplus*, que além de prejudicar a epiderme pode transmitir doenças ao animal, como por exemplo a tristeza parasitária bovina (TPB), além de outras. As perdas econômicas diretas da doença estão relacionadas com a morbidade e a mortalidade de bovinos, além do registro de abortos, alterações no cio e fertilidade de touros; e indiretas, como o custo do tratamento.

Ferro

Um dos metais mais abundantes do planeta, o ferro tem grande importância no desenvolvimento e na civilização. É o metal de transição mais importante do ponto de vista biológico e é importante tanto para animais como

para vegetais. É responsável pela cor vermelha do sangue e está envolvido em muitos processos biológicos, tais como:

- transporte de O_2 através da hemoglobina
- armazenagem de O_2 no tecido muscular através da mioglobina
- agente transportador de elétron (citocromos) e transferência de elétrons (ferridoxinas)
- armazenagem e remoção de ferro em animais (transferina e ferritina)
- nitrogenase (fixação de nitrogênio por bactérias)
- enzimas (catalase e nitrogenase)

O ferro pode estar de maneira solúvel ou insolúvel no nosso organismo. A maneira insolúvel é excretada e as maneiras solúveis (iônica, ligada a grupos heme, ferritina, transferrina, entres outros complexos) são absorvidas e aproveitadas de maneira adequada.

O ferro é encontrado em vários alimentos, mas nem sempre está biodisponível, ou seja, de maneira que o corpo possa absorver e utilizá-lo. Devido a este fato, uma pequena percentagem do ferro que ingerimos é direcionado ao intestino, onde é absorvido pela transferrina e pode ser armazenado na forma de ferritina. De acordo com a necessidade do organismo, o ferro é então transportado pela transferrina no sangue até o fígado. Esse, por sua vez, pode armazená-lo ou liberá-lo para outras partes do corpo, tais como músculo, medula óssea ou tecidos que o necessitem. No músculo o ferro está na forma de mioglobina, onde irá armazenar O_2 . Na medula óssea, um dos maiores reservatórios de ferro do corpo, o mesmo será repassado para os grupos heme para a formação da hemoglobina do sangue. Quando um excesso de Fe é encontrado na bile sua absorção é inibida no intestino. O

organismo não necessita de uma grande absorção diária de ferro, pois esse é reciclado.

O ferro livre pode estar relacionado com o estresse oxidativo das células dos parasitas que se alimentam de sangue de outros animais. Esse estresse é causado por reações de oxidação do ferro, tanto iônico como ligado ao grupo HEME, que gera espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo causa danos moleculares às estruturas celulares, alterando o funcionamento e as funções vitais do organismo. Baseado nessas informações, acredita-se que o ferro livre esteja intimamente ligado ao estresse oxidativo nos parasitas e dessa maneira tornaria o animal resistente aos carrapatos. Tentou-se, então, analisar as diversas formas em que o ferro é encontrado no sangue, principal alimento do carrapato, e determinar as formas em que o ferro pode ser encontrado, seu estado de oxidação e se há diferença entre os animais resistentes e sensíveis ao carrapato. Para a obtenção desses resultados, foi necessário o emprego de diferentes procedimentos e técnicas analíticas, que foram adaptadas em função de sua sensibilidade e seletividade e com mínima geração de resíduos.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal verificar se existe diferença na concentração de ferro presente no sangue de bovinos entre animais resistentes e sensíveis a carrapatos.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- desenvolver metodologia para a determinação de ferro total em sangue, soro e plasma;

- desenvolver metodologia para determinar ferro não ligado a proteínas no sangue;

- desenvolver metodologia para determinação de Fe(II) e Fe(III) no sangue.

2. Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

O sangue é um tecido vivo que tem como principais funções transportar o oxigênio dos pulmões para o corpo, defender o organismo contra infecções e promover a coagulação. Ele recebe os alimentos já assimilados e os transporta para as células, recebe os resíduos que se formam nos órgãos e os leva até os rins para serem eliminados através da urina. (<http://www.hemoam.org.br/estudo.html>, 05/2005).

Por ser um tecido tão importante e essencial, é fundamental entender o seu funcionamento e a sua composição. Existe uma infinidade de estudos relacionados ao sangue, de minerais a proteínas complexas com funções específicas. A maioria dos minerais presentes no corpo humano e dos animais pode ser encontrada no sangue, o que o torna um excelente indicador de deficiência ou intoxicação no organismo.

Vários exames clínicos são feitos utilizando soro ou plasma sanguíneo. A diferença está na adição de anticoagulante, normalmente ácido etilendiaminotetraacético – EDTA, ou Heparina, para a separação do plasma, que contém a proteína fibrinogênio responsável pela coagulação sanguínea. O soro é isento de fatores de coagulação, mas é enriquecido com componentes celulares das plaquetas e produtos metabólicos. As principais causas de diferenças nas concentrações encontradas no soro ou plasma são a quebra (lise) de células e o efeito do fibrinogênio, que libera componentes celulares.

A análise sanguínea é muito comum e através dela é possível descobrir muitas doenças ou intoxicações no organismo. Segundo Tripathi et al., 2001, o nível de Pb influencia nos níveis de Cd, Cu, Zn, Fe e de hemoglobinas no sangue, pois este elemento compete com os minerais essenciais, prejudicando o organismo.

2.1 - Carrapatos

O carrapato é um ectoparasita responsável pela transmissão de muitas doenças. Quando parasitam os bovinos, os carrapatos causam danos na epiderme (camada superficial da pele). Esses danos podem ser disfarçados nos curtumes, mas o valor agregado ao couro diminui.

O carrapato mais comumente encontrado no Brasil é o *boophilus microplus*, que além de prejudicar a epiderme pode transmitir doenças ao animal como a tristeza parasitária bovina (TPB), por exemplo, além de outras. As perdas econômicas diretas da doença estão relacionadas com a morbidade e a mortalidade de bovinos, além do registro de abortos, alterações no cio, fertilidade de touros, e indiretas, como o custo do tratamento (SCHENK et al, 1995).

O *B. Microplus* é encontrado somente em regiões tropicais e subtropicais, localizadas entre os paralelos 32°N e 32°S. É um ectoparasita hematófago cujo principal hospedeiro é o bovino. O ciclo biológico apresenta uma fase parasitária de aproximadamente 21 dias na qual passa pelos instares de larva, ninfa e adulto, todos em um único hospedeiro. A fase de vida livre inicia com a queda das fêmeas ingurgitadas e culmina quando as larvas eclodidas encontram um hospedeiro. Na fase de vida livre, a fêmea ingurgitada apresenta primeiro um período de pré-postura de 3 dias e morre após a postura. Em temperaturas ao redor de 28° C e alta umidade relativa (85%), a postura e a eclosão ocorrem em aproximadamente 18 dias. As larvas recém eclodidas migram para as pontas da vegetação onde podem localizar o hospedeiro pelo odor ou vibrações. No hospedeiro, as larvas se fixam em regiões corporais propícias para seu desenvolvimento, tais como: posterior da coxa, perineal, perianal e perivulvar, após sete dias de sua fixação ocorre a

muda para ninfas e estas mudam para adultos com marcado dimorfismo sexual em aproximadamente oito dias. A fêmea após o acasalamento começa a alimentação até o ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo, enquanto que o macho permanece no bovino à procura de novas fêmeas(GONZALES, 1995).

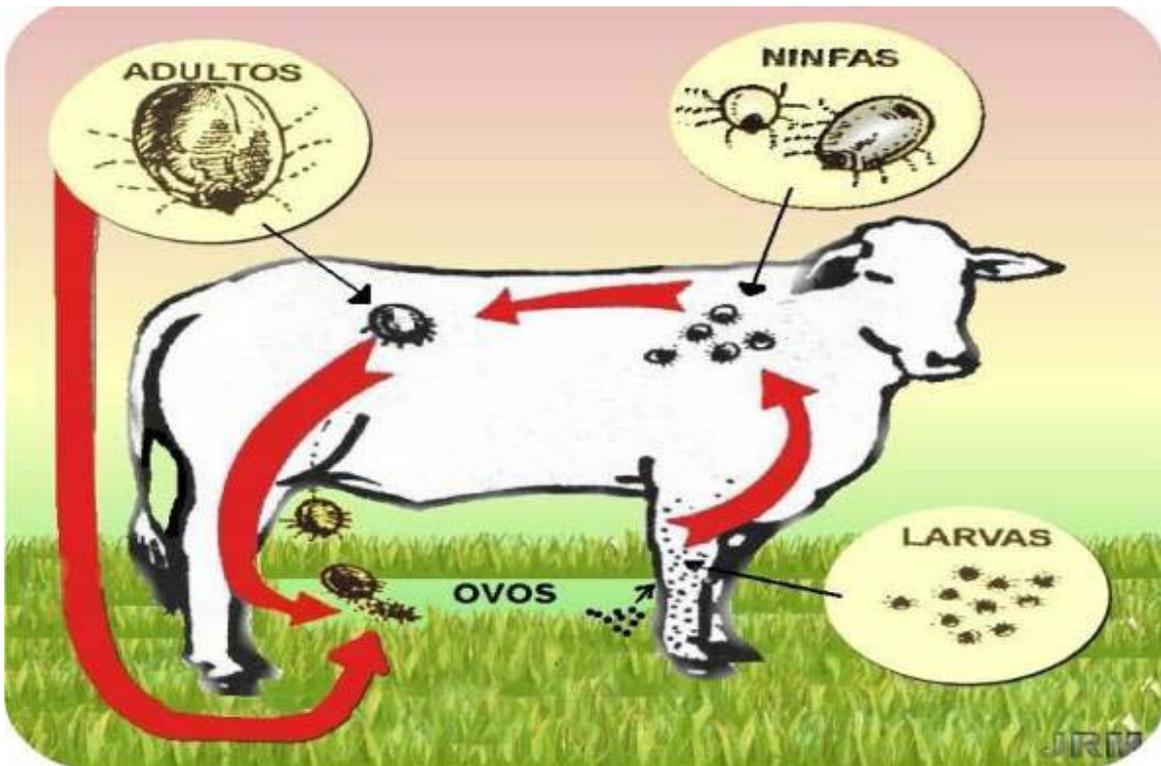


FIGURA 2.1: Esquema representativo do ciclo de vida do carrapato (www.carrapatobovino.com)

O tempo deste ciclo de vida do carrapato pode variar bastante, o clima e a umidade do ar são os fatores primordiais. A larva pode ficar no pasto sem alimento por até 90 dias, e os ovos até 120 dias sem eclodirem, é claro que como passar do tempo diminui a força de investação (GONZALES, 1995).

O ciclo de vida de muitos parasitas do gênero *Plasmodium* envolvem estágios intra-eritrocitários, como a babesia, por exemplo, onde sua existência esta estreitamente relacionada com o Fe, elemento essencial para esta fase (OLIVEIRA et al., 2002).

2.2 – Ferro

O ferro é um elemento essencial para toda a biota. Estudos demonstraram que o ferro e outros metais são necessários para o ótimo crescimento de plantas e animais (AZEVEDO et al., 2003).

A quantidade de ferro absorvida deve ser equivalente à quantidade perdida que, em um indivíduo adulto, do sexo masculino, chega a 1mg/dia. Em indivíduos com deficiência de ferro, as perdas diárias seriam de 0,5 mg/dia e, em indivíduos com sobrecarga de ferro, seriam de 5 mg/dia (AZEVEDO et al, 2003).

Tanto o excesso como a deficiência de ferro podem causar problemas no organismo. Nas transfusões de sangue são usados ligantes que formam complexos de alta estabilidade com o ferro, evitando que ocorra uma queda demasiada desse elemento. Esses ligantes são conhecidos como sideróforos. Muitos organismos empregam os sideróforos para captar o ferro que necessitam, que podem, também, ser empregados como antibióticos, pois impedem a perda do Fe livre disponível(FALCÃO, 2006).

Por outro lado, o excesso de ferro, chamado de hemacromatose, é prejudicial à saúde, provocando o depósito de Fe nos tecidos pelo seu excesso no organismo. Os principais locais de depósitos são os pâncreas, o coração e a hipófise, que podem ter perda progressiva de suas funções. A hemacromatose

pode ser hereditária, quando é causada por uma anomalia genética, ou secundária, quando é causada por outra doença (JORGE, 2006).

Muitos países sofrem com intoxicação por metais devido à poluição e o problema é agravado quando esses metais se acumulam no organismo, passando pelas gerações. Estudos de metais em sangue são encontrados na literatura visando avaliar a gravidade do problema. Os metais mais comumente estudados são: Fe, Cu, Ca, Zn, Se e Pb. (CHILLRUD, 2005, and SZITÁNYI, 1996). Os metais em excesso podem estar relacionados a câncer ou doenças neurológicas, o que demonstra a importância de novas metodologias para análises rápidas e precisas. (HERMÁNDEZ-CARABALLO, 2005, IDE-EKTESSABI, 2004)

O teor de ferro no organismo pode influenciar na absorção de outros elementos traço importantes, pois outros metais possuem um metabolismo de absorção parecido com o do ferro, tais como Cd, Co e Cu. (Bárany, 2005). O teor total de ferro em adultos é de aproximadamente 3,5 a 4 g e a maior parte (1,5 a 3,0 g) se encontra ligada ao grupo heme da hemoglobina, tendo como principal função a oxigenação dos tecidos. Pequenas quantidades de ferro são encontradas na mioglobina, catalase, citocromos, no plasma (como Fe de transporte) e o restante é encontrado armazenado sob a forma de ferritina e hemossiderina no fígado, no baço, na medula óssea e nos músculos. (CANÇADO, 2005)

O ferro presente nos alimentos nem sempre está biodisponível para o organismo e sua absorção varia com a forma em que se encontra. Cerca de 40% do ferro presente em carnes, peixes e aves está na forma heme, sendo que apenas 23% é absorvido. Além desse ferro, apenas 2 a 8% do ferro não-heme presente nos alimentos está biodisponível. A absorção também está

relacionada com a maneira que o alimento foi ingerido. (KALPALATHIKA, 1991).

A potencialidade de qualquer refeição ou alimento como fornecedor de ferro não pode ser estabelecida unicamente por dosagem química, uma vez que a retenção de ferro é determinada por uma série de fatores como: estado fisiológico, estado nutricional, equilíbrio com as quantidades de alguns minerais (Ca, Zn, por exemplo) nos alimentos ou refeições e interações entre ferro e diversos compostos da dieta, incluindo fatores anti-nutricionais. Depois de ser absorvido no intestino, o ferro está sempre ligado a proteínas, na forma de transferrina, durante o transporte pelo sangue e na forma de ferritina para o armazenamento nas células. Na figura 2.1 é apresentada uma representação do ciclo do ferro no organismo, incluindo formas na quais é possível ser encontrado, absorvido e excretado (LEHNINGER, 1988).

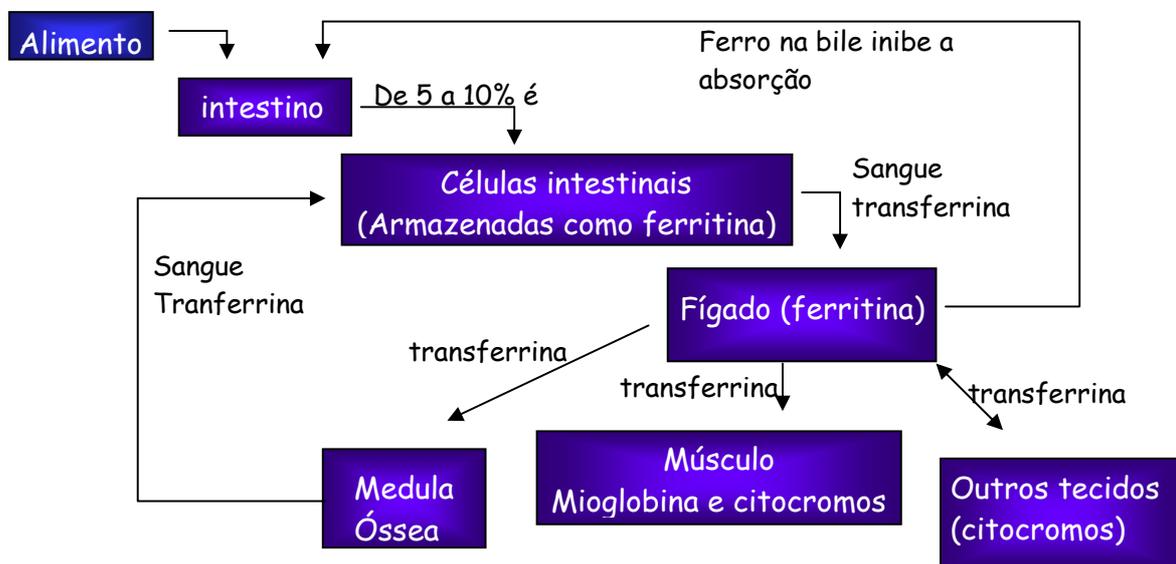


FIGURA 2.2: Esquema de absorção, retenção e excreção do Fe no organismo.

O ferro é necessário para a síntese das proteínas que contém ferro porfirínico, a hemoglobina, a mioglobina e os citocromos. É transportado no sangue ligado à proteína plasmática (transferrina) e nos tecidos é armazenado na forma de ferritina, uma proteína férrica contendo hidróxidos e fosfatos. O fígado, o baço e a medula óssea são os órgãos que mais contém ferritina. O ferro não é excretado na urina e sim pela bile, fezes e no sangue menstrual. A grande perda de ferro no período menstrual faz com que a mulher tenha que ingerir uma quantidade muito maior de ferro quando comparado aos homens (LEHNINGER, 1988).

O ferro pode ser tóxico em pequenas quantidades para alguns parasitas. Estudos revelam que a oxidação do ferro gera radicais livres que causam estresse oxidativo nas células de parasitas. As mitocôndrias produzem H_2O_2 , que formam radicais hidroxilas através da oxidação do Fe^{2+} para o Fe^{3+} . Esse ferro é proveniente da digestão da hemoglobina do sangue que foi sugado do hospedeiro. Esses radicais, além de promover o estresse oxidativo, reagem com ácidos graxos formando hidroperóxidos orgânicos. A hemoglobina que não foi digerida no vacúolo digestor reage com hidroperóxidos orgânicos e através da redução ou oxidação do ferro produz radicais peróxil e alcóxidos que também causam estresse oxidativo (OLIVEIRA, 2002).

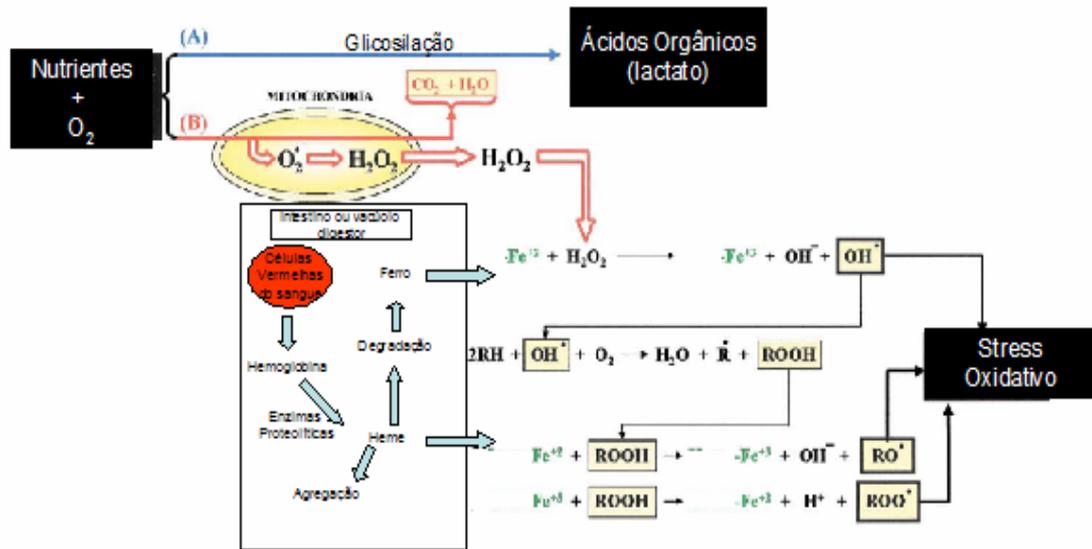


FIGURA 2.3: Esquema de formação de radicais livres causadores de estresse oxidativo em parasitas (Adaptado de Oliveira, 2002).

TURRENS (2004), estudou o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes como alvos no tratamento de parasitas, chegando a conclusão que o desenvolvimento de drogas para doenças parasitárias deve ser focado no sistema de defesa antioxidante destes protozoários.

A albumina bovina foi citada como um dos maiores antioxidantes presentes no sangue, protegendo a membrana lipídica da peroxidação, pois essa diminui a disponibilidade do ferro, que é o responsável pelo início do processo. (FUKUZAWA, et al. 2005).

2.3 – *Especiação*

A concentração total de um elemento é um dado muito importante, mas não revela informações como a biodisponibilidade, toxicidade e metabolismo dentro do organismo. O estado oxidativo e a forma como o elemento está complexado são dados de extrema importância em estudo de metabolismo e biodisponibilidade (MANTOVANI, 1989).

A absorção do ferro-heme é bem maior que a do ferro-não heme. O ferro-não heme pode estar na forma Fe(II) ou Fe(III), sendo absorvido preferencialmente na forma Fe(II). O Fe(III) pode ser reduzido pelo ácido ascórbico ou pela ferriredutase e assim ser absorvido (CÂMARA et al., 2005).

A especiação de Fe(II) e Fe(III) é bem conhecida e a utilização de análise por injeção em fluxo a torna uma análise de fácil operação, com alta frequência analítica, baixo custo e reprodutível (ROCHA et al., 2000 e PELLERANO).

2.4 – *Espectrometria de Absorção Atômica*

A técnica de Absorção Atômica é baseada no princípio da medida da absorção da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação (lâmpada de cátodo oco), por átomos gasosos no estado fundamental. A atomização, ou seja, formação de átomos gasosos no estado fundamental, pode ser obtida de várias formas: chama, via eletrotérmica ou por meio de reações químicas específicas (SKOOG, 2002).

2.4.1- Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

A Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS – Flame Absorption Atomic Spectrometry) é uma técnica relativamente barata e simples. Seu princípio fundamental envolve a medida de absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de luz por átomos gasosos no estado fundamental. Esse fenômeno é utilizado para a determinação quantitativa de elementos metálicos e alguns não metálicos em uma ampla variedade de amostras (águas, materiais biológicos, clínicos, ambientais, geológicos, alimentos, etc.). A amostra é nebulizada numa chama de ar-acetileno, onde é vaporizada. Os átomos do analito de interesse, presentes na amostra, absorvem radiação proveniente da lâmpada de cátodo oco. As lâmpadas de cátodo oco são preenchidas com neônio ou argônio a baixa pressão e possuem como cátodo o elemento a ser determinado. Emitem somente o espectro do elemento do cátodo, juntamente com o do gás de preenchimento (SKOOG, 2002).

2.4.2- Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS)

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS) surgiu em 1958 (Vogel, 2002). É amplamente utilizada para a determinação de elementos traços em rotina. Pequenos volumes de amostras, ótimos limites de detecção após a separação da matriz, uso do atomizador como reator químico, possibilidade de análise direta, rapidez e geração de espectro simples são algumas das vantagens do GFAAS (WELZ, 1999).

O programa de aquecimento possui, basicamente, 4 etapas: secagem, pirólise, atomização e limpeza. Na etapa de secagem a água é totalmente retirada da amostra e seu tempo depende da quantidade inserida no tubo. A pirólise é para a retirada de orgânicos e concomitantes, tomando cuidado para não perder o analito de interesse. A atomização é um rápido aquecimento para que haja a formação de uma nuvem atômica densa e nesta etapa é onde ocorre a absorção da radiação, proveniente de uma lâmpada de cátodo oco, pelo analito. A limpeza tem a maior temperatura do programa para que toda amostra seja eliminada do tubo de grafite(WELZ, 1999).

Para cada tipo de amostra é necessário um programa de aquecimento que é montado utilizando o branco e uma amostra concentrada. As temperaturas de pirólise e atomização são modificadas dentro de parâmetros descritos no manual operacional do equipamento e com as absorbância se traça uma curva onde é possível observar as melhores temperaturas. Na etapa de montagem do programa de aquecimento é muito importante observar o sinal de fundo, mesmo que o equipamento ofereça a opção de correção de fundo, evitando erros na determinação do analito.

Muitas vezes o analito de interesse esta em pequenas quantidades e para isso é necessário um técnica sensível como a GFAAS. Burguera et al., 2002, analisaram molibidênio em soro sanguíneo após digestão por radiação microondas. Pomazal et al., 2002, determinaram metais (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) após fracionamento das proteínas do sangue utilizando GFAAS, para ferro não foi utilizado modificador químico.

2.4.2.1 – Modificadores Químicos

Modificadores químicos são comumente utilizados em GFAAS com a principal função de diminuir ou eliminar os efeitos de interferências provocados pela matriz ou por concomitantes presentes na amostra. Eles permitem que a temperatura de pirólise seja mais elevada para eliminar a matriz e os concomitantes sem que haja a perda do analito ou afetar a sua atomização(OLIVEIRA, 2006).

Os modificadores químicos devem possuir algumas características: deve estabilizar o analito de interesse para uma elevada temperatura de pirólise (perto de 1000°C) para a eliminação de concomitantes, deve ser aplicável a vários analitos, deve estar na forma mais pura possível e não conter concentrações mensuráveis do analito de interesse, não deve diminuir a vida útil do tubo de grafite entre outras(PEREIRA FILHO, 2003).

O paládio (Pd) é o modificador químico mais relatado na literatura e já foi comprovado que seu uso não desgasta o tubo de grafite, pode ser encontrado com elevador teor de pureza e não é facilmente determinado(QIAO, 1991).

Os modificadores químicos geralmente são utilizados em concentrações maiores que o analito de interesse, evitando a formação de espécies refratárias (como carbetos e óxidos) que podem causar mudanças no sinal(PEREIRA FILHO, 2003).

2.5 – *Diálise*

A diálise é uma técnica utilizada por químicos desde meados do século XIX, para remover solutos de uma solução. O método utiliza um princípio físico-químico simples: a difusão. Um pequeno saco feito com material semi-permeável contém a solução como soluto e é mergulhado em um recipiente com água pura. Depois de algumas horas, dois fenômenos acontecem: parte da água, devido a pressão osmótica, é transferida para dentro do saco, aumentando seu volume, e parte do soluto é transferido para o compartimento externo, devido a difusão passiva. A difusão passiva é o processo de transferência de um soluto através de uma membrana semi-permeável, do compartimento de maior concentração para o de menor concentração (ENGEL, 2003).

A diálise já havia sido aplicada à urina, no intuito de retirar uréia. Porém, apenas após a Segunda Grande Guerra, pelos estudos de Abel, Thalheimer e Kolff, o método de diálise foi pela primeira vez utilizado para remover toxinas do corpo humano. Inicialmente, para tratar envenenamentos agudos e, em seguida, para tratar a insuficiência renal(ENGEL, 2003).

A anemia se agrava em pacientes renais e transplantados, pois o ferro da ferritina e níveis de transferrina tem influência nos processos de inflamação (YAVUZ, et al., 2004).

Miró e Frenzel, 2004, utilizaram a diálise para a determinação de espécies iônicas de ferro, no estudo cinético da transferência de massa de espécies iônicas.

A diálise em sangue pode ser utilizada para a determinação de minerais, separação de proteínas, etc. Kurita et al. (2006), desenvolveram um

chip sensível eletroquimicamente integrado a uma membrana de diálise de 10 kDa, onde foi determinado lactato em sangue de cachorro.

2.6 – Análise em Fluxo

A necessidade de ampliar e melhorar os métodos analíticos do dia a dia e adaptá-los às demandas crescentes da sociedade têm impulsionado o crescimento e o nascimento de muitas áreas na química analítica. Apesar dos esforços para desenvolver sensores seletivos e sensíveis para determinar diretamente a concentração de um analito em uma amostra, a grande variedade dos analitos e a complexidade dos produtos a serem analisados tornam altamente improvável que sensores para a maioria dos compostos de interesse se tornem disponíveis em futuro próximo. Desta forma, separação e/ou conversão química permanecem como etapas essenciais na maioria dos procedimentos de análise quantitativa. Nestes casos, a automação dos procedimentos analíticos implica na automação do processamento das amostras.

Como a maioria das separações e conversões químicas é normalmente conduzida em fase líquida, o conceito lógico e engenhoso proposto por SKEGGS (1957) possibilitou a execução de processos analíticos em um fluxo, os quais transportam a alíquota das amostras do ponto de introdução até a unidade de detecção, recebendo nesse percurso reagentes que possibilitam as diferentes detecções.

Na metade da década de setenta o conceito de sistema em fluxo com dimensões e vazões adequadas foi amplamente aceito, simplificando o sistema analítico e aumentando o número de amostras que poderiam ser

analisadas por unidade de tempo (frequência analítica) e esta abordagem ficou conhecida como análise por injeção em fluxo (FIA- Flow Injection Analysis). Uma alíquota de amostra é inserida no percurso analítico, a qual sofre dispersão (zona de amostra) ao ser conduzida até o detector. No percurso, a amostra pode receber reagentes ou até mesmo sofrer reações químicas para melhorar a detecção (RUZICKA E HANSEN, 1975). A detecção é realizada com a amostra em fluxo e o sinal registrado é um pico, cujo formato esta relacionado com a concentração do analito (RUZICKA E HANSEN, 1988).



Figura 2.4: Base da Análise em fluxo (modificado de www.flowinjection.com)

A figura 2.4 é um esquema simples do que ocorre na análise em fluxo. A propulsão (bomba peristáltica, gravidade, sistema de pressão gasosa, etc.) é o coração do sistema, que irá transportar amostra e o reagente até o detector (espectrofotômetro, potenciômetro, FAAS, etc.). A amostra é inserida no sistema através de um injetor, entra em contato com o reagente, passa pela bobina reacional e é direcionada ao detector. Trata-se de sistema que

minimiza a produção de resíduos e as etapas envolvidas durante o experimento, de fácil utilização, custos relativamente baixos e de ampla aplicação.

Hoje em dia grande parte das análises clínicas utiliza a análise em fluxo para diagnósticos, diminuindo o contato do sangue ou outros materiais contaminados com as pessoas em laboratórios clínicos. A automação, nesta área, foi imprescindível, sendo possível obter um grande número de dados analíticos com rapidez e baixo custo, auxiliando na rapidez e na melhor resposta do paciente ao tratamento (KALLBERG, 1989).

Sistemas com alta frequência analítica são utilizados freqüentemente na indústria farmacêutica para controle de medicamentos, por serem facilmente montados e utilizados. Como exemplo temos a determinação de acetilcisteína (agente mucolítico utilizado em casos de superdosagem de paracetamol), que pode ser analisada através da sua oxidação com o Ce(IV) e uma solução de ferroína como reagente colorimétrico, utilizando espectrofotômetro como detector. (VIEIRA, 2005). Van Staden et al. (1997) determinaram Fe(III) em amostras farmacêuticas utilizando a diálise, para remoção da matriz e interferentes, e Tiron como reagente colorimétrico. Fluxos monosegmentados facilitam a mistura reacional além de minimizar a dispersão da zona de amostra, como no trabalho de Silva e Masini (2002) que utilizaram este tipo de fluxo em análise seqüencial de Fe em drogas anti-anêmicas com o-fenantrolina e detecção espectrofotométrica. Especificação de Fe(II) e Fe(III) em medicamentos possui uma forte ligação com a biodisponibilidade de ferro para o organismo e pode ser feita de maneira simples, ora com uso de agentes redutores ora sem agentes redutores. (OLIVEIRA, 1999).

A preocupação com a quantidade de metais ingerida e sua toxicidade gera inúmeros trabalhos com análises de água nas mais variadas formas. Estes estudos mostram uma variedade enorme de reagentes colorimétricos que podem ser utilizados na determinação de Fe com análise em fluxo. Ferrozina, norfloxacin, tiocianato e o-fenantrolina são alguns dos reagentes colocrimétricos mais utilizados. Em amostras com matrizes mais complexas, como a água do mar e resíduos, nem sempre é possível fazer uma determinação direta, sendo utilizado, nesses casos, resinas quelantes, sensor de fibra ótica e resinas aniônicas para a remoção de interferentes. (SARRADIN, 2005; POJANAGAROON, 2002; VAN STADEN, 2000; OGUMA, 2002; JITMANEE, 2002; PONS, 2005; LOHAN, 2005; PONS, 2005)

2.7 – Hematócrito

O hematócrito é uma medida do volume parcial dos glóbulos vermelhos do sangue. Este é um indicador-chave do estado de hidratação, anemia ou perda grave de sangue do corpo, bem como da capacidade do corpo para transportar oxigênio. Uma redução do hematócrito pode ocorrer em função de uma sobrehidratação, que resulta no aumento do volume de plasma, ou a uma diminuição do número de glóbulos vermelhos provocada por anemias ou perda de sangue. Por outro lado, um aumento do hematócrito pode ocorrer em função da perda de fluidos como, por exemplo, em casos de desidratação, tratamento diurético e queimaduras, ou a um aumento dos glóbulos vermelhos como no caso de distúrbios cardiovasculares e renais, policitemia vera e ventilação diminuída(BULL, 2000).

O hematócrito não é utilizado para diagnóstico de doenças, mas sim como indicativo ou no controle da saúde. Doenças como babesiose (tristeza parasitária bovina) abaixam os níveis de volume globular e o hematócrito auxilia no controle e estudo desse tipo de enfermidade (VIEIRA, 2000). Além disso, TORO et al. (1981) relataram que o hematócrito foi a técnica mais eficiente, rápida e segura forma no diagnóstico de tripanossomas em bovinos.

Em frangos de cortes o hematócrito é uma medida indireta no monitoramento da síndrome ascística (acúmulo excessivo de líquidos na cavidade abdominal (GARCIA NETO, 2004)) e utilizada para avaliar o peso corporal, auxiliando no melhoramento genético dessas aves (ROSÁRIO, 2002).

3. Materiais e Métodos

3. *Materiais e Métodos*

3.1- *Reagentes e vidrarias*

Toda vidraria utilizada neste trabalho foi previamente descontaminada em banho de ácido nítrico (HNO₃) 10% (v/v) por 24 horas, enxaguada com água ultra pura Milli-Q[®] e seca em capela de fluxo laminar.

Os reagentes utilizados foram de pureza analítica e as soluções aquosas preparadas com água ultra pura. As seguintes soluções foram utilizadas:

- Solução precipitadora de proteínas (HCl 1mol L⁻¹ + ácido tricloroacético 10% m/v): 20,83 mL de HCl concentrado (Synth, São Paulo, Brasil) foi diluído em água. A seguir foi adicionado 25g de ácido tricloroacético (Nuclear, Brasil) e volume final completado para 250mL com água;
- Solução colorimétrica (o-fenantrolina - 0,25% m/v em meio acetato de amônio 2mol L⁻¹): 15,24g de acetato de amônio (Synth) foi dissolvido em água. A seguir foi adicionado 0,25g de o-fenantrolina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e o volume foi completado para 100 mL com água;
- Solução redutora (ácido ascórbico 0,02% m/v): 2g de ácido ascórbico (Synth) foi dissolvido em acetona (Synth), sendo o volume final completado para 100 mL com água. Essa solução era preparada diariamente, imediatamente antes de ser utilizada;

- Tampão TRIS: 6,05g de tris-(hidroximetil) aminometano ultra puro (USB Corporation Cleveland, USA) foi dissolvido em água Milli-Q[®] e o valor do pH corrigido para 7 com ácido acético glacial subdestilado. A seguir o volume final era completado para 1L com água;
- Os padrões de Fe²⁺ foram preparados imediatamente antes de serem utilizados, a partir do sal FeSO₄ (Carlo Erba, Itália) em meio aquoso. A curva analítica era preparada a partir de solução concentrada, contendo 100mg L⁻¹, obtida a partir da dissolução de 13,6mg de FeSO₄ para um volume final de 50mL, completado com água;
- As curvas de Fe³⁺ foram preparadas utilizando solução estoque padrão comercial para absorção atômica de 1000mg L⁻¹ (Merck, Brasil);
- Ácido Nítrico concentrado (HNO₃) – Mallinckrodt, Alemanha
- Peróxido de hidrogênio 30% v/v (Nuclear, Brasil)

3.2- Instrumentação

Nos sistemas de análise em fluxo e de diálise foi utilizado: bomba peristáltica (Ismatec, 78001-12, Suíça), injetor-comutador de acrílico, registrador (Kipp & Zonen, modelo BD112, Holanda), cela de diálise (Technicom, USA), membrana de diálise (Spectra/Por 6-8 kDa), espectrofotômetro (Femto, modelo 432, São Paulo, Brasil).

Para as determinações de ferro total em solução foi utilizado espectrômetro de absorção atômica com chama (SpectraAA800, Varian, Austrália) nas condições de operação descritas na tabela 3.1. O equipamento foi programado para fazer as determinações em triplicatas.

TABELA 3.1: Parâmetros utilizados para a determinação do Fe total por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

Parâmetros FAAS	
Ar	13,4 L/min
Acetileno	2,0 L/min
Comprimento de Onda	372 nm
Resolução Espectral	0,2 nm
Corrente da lâmpada	5 mA
Limite de detecção	0,07 mg L ⁻¹

A determinação do ferro não ligado a proteínas presente no sangue foi determinada por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (SpectraAAZ800, Varian, Austrália), com corretor de fundo por efeito Zeeman e amostrador automático. O programa de aquecimento utilizado está descrito na tabela 3.2. O equipamento foi programado para fazer as determinações em triplicatas.

TABELA 3.2: Programa de aquecimento utilizado no GFAAS

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	90	5
2	90	20
3	120	5
4	120	25
5	700	5
6	700	10
7	2200	0,4
8	2200	5
9	2600	1
10	2600	3

A digestão das amostras de sangue, para as determinações dos teores de Fe totais foi feita em frascos fechados e altas pressões em forno com radiação microondas (Millestore, Sorisole, Itália) em potência máxima de 1000 W. O programa de aquecimento utilizado está descrito na tabela 3.3.

TABELA 3.3: Programa utilizado na digestão das amostras

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	291	2
2	0	3
3	640	4
4	872	5
5	1000	5
6	0	15

A determinação do volume globular foi realizada em tubos capilares, após separação em microcentrífuga (Celm, MH, Brasil), por 10 min a 15000 rpm. A separação do plasma sangüíneo foi realizada em centrífuga (Fanem, modelo 206, Brasil) por 15 min, a 3000 rpm.

3.3- Amostras

Para a coleta de sangue foram escolhidos animais que se encontravam nos extremos da classificação de resistência e sensibilidade natural à carrapatos, de acordo com pesquisas em desenvolvimento na Embrapa(SILVA, 2006). No ano de 2005 foram utilizadas vacas em vários estados fisiológicos e idades diferentes. Visando aumento na homogeneidade e diminuição das variáveis, no período seguinte de coleta, realizado em 2006, foram escolhidas vacas nos 3 meses finais de gestação, uma vez que o ferro

pode sofrer variações de acordo com o estado nutricional e fisiológico do animal.



- = com gel para separação de soro sanguíneo
- = apenas vácuo, para coleta do sangue
- = com heparina como anticoagulante
- = com EDTA como anticoagulante

FIGURA 3.1: Tubos à vácuo utilizado para coleta de sangue. As tampas dos frascos possuem colorações diferentes para melhor visualização e diferenciação entre seus conteúdos.

As amostras utilizadas durante o trabalho foram de sangue bovino das raças Angus, Canchim, Nelore e Siemental colhidos em tubos à vácuo da marca Vacutainer[®](BD SST II Advanced, Inglaterra) e Vacuette[®](Labortechnik, Alemanha), com 8,5 mL e 9 mL de capacidade, respectivamente. Foram utilizados tubos com anticoagulante heparina (para análise de sangue total, do plasma e diálise) e com gel (Advanced SST II) para separação do soro, como mostrados na figura 3.1. Os animais utilizados para coleta do sangue pertencem à Embrapa Pecuária Sudeste e utilizados em experimento relacionado à resistência natural à carrapatos. Em agosto de 2005 foram feitas análises em 40 animais do sexo feminino dentro de quatro raças (Canchin, Nelore, Simental e Angus), em agosto/setembro de 2006 foram coletadas 35 amostras de 3 raças diferentes (Canchin, Simental e Angus) de vacas no período final de gestação. As vacas escolhidas para coleta do sangue

representam os extremos dentro da sensibilidade ou resistência à carrapatos, comprovado por estudos anteriores [SILVA, 2006].

3.4- Procedimento

Foram feitos diversos tipos de análises no sangue, na tentativa de determinar as várias formas em que o ferro pode ser encontrado no sangue. Na figura 3.2 está apresentado um esquema com as determinações que foram feitas em cada tipo de amostra e qual a técnica utilizada na determinação.

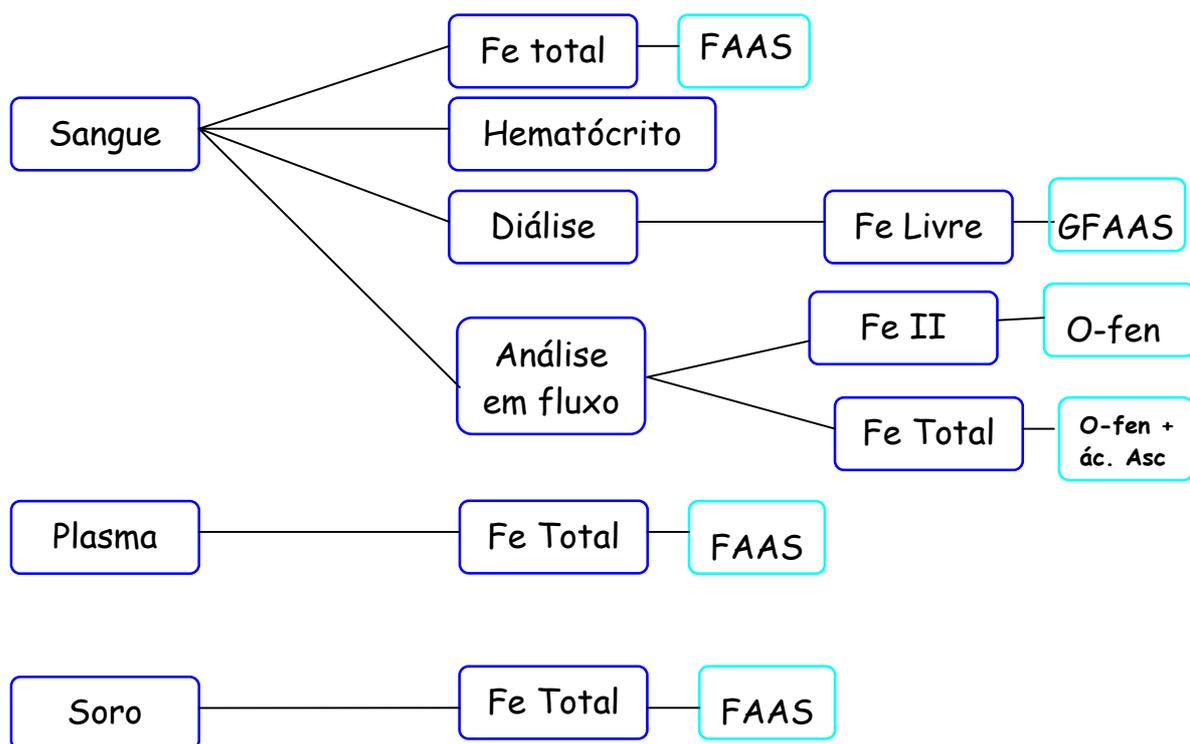


FIGURA 3.2: Esquema das metodologias utilizadas para determinar teores de ferro no sangue.

3.4.1 – Separação do Soro e do Plasma

Para a separação do plasma, o sangue com heparina foi centrifugado por 15 min a 3000 rpm. O sobrenadante (plasma) foi recolhido e armazenado. O soro foi separado do sangue colhido por centrifugação, em tubos com gel de separação específicos para soro. O emprego desse gel evita hemólise, não sendo necessário recolher o sobrenadante, que não entra em contato com os eritrócitos.

3.4.2 – Determinação de Fe total

O ferro total foi determinado no sangue, soro e plasma. Para a determinação em sangue foram comparadas duas metodologias: digestão total das amostras e a simples diluição em meio aquoso. Para fazer a digestão foi utilizado 0,5 mL de sangue com 2 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ em frasco de Teflon modificado. A seguir as amostras foram submetidas ao programa de aquecimento descrito na tabela 3.3. Após a digestão, o volume final do digerido foi completado para 50 mL com água. A outra alternativa avaliada empregou a diluição de 0,5 mL de amostra de sangue em água, sendo o volume final completado para 50 mL. O ferro presente nas soluções foi determinado por FAAS com as condições de operação descritas na tabela 3.1.

O soro e o plasma foram diluídos na proporção 1:1 com água e determinados nas mesmas condições descritas no item anterior.

3.4.3 – *Fe livre*

Todo ferro que não está ligado às proteínas no sangue foi chamado de ferro livre.

Neste estudo foi utilizada uma cela para diálise construída em acrílico e uma membrana Spectra/Por com porosidade de 6-8000 Da, que favorece a passagem apenas dos íons. Foi utilizado um fluxo relativamente baixo ($0,25 \text{ mL min}^{-1}$), visando a máxima transferência do ferro pela membrana. Experimento com a adição de ferro no compartimento superior demonstrou a passagem de 100% pela membrana.

Para coleta do analito foi utilizado tampão Tris-ácido acético com pH 7,0, próximo ao do sangue, evitando possíveis mudanças da matriz, tais como a precipitação das proteínas por mudança de pH. O tampão estava em fluxo contrário ao do sangue e com a mesma vazão para garantir uma melhor eficiência da diálise. Esse mesmo tampão foi utilizado como fluxo transportador das amostras no sistema de análise por injeção em fluxo. Na Fig. 3. são apresentados detalhes do sistema em funcionamento.

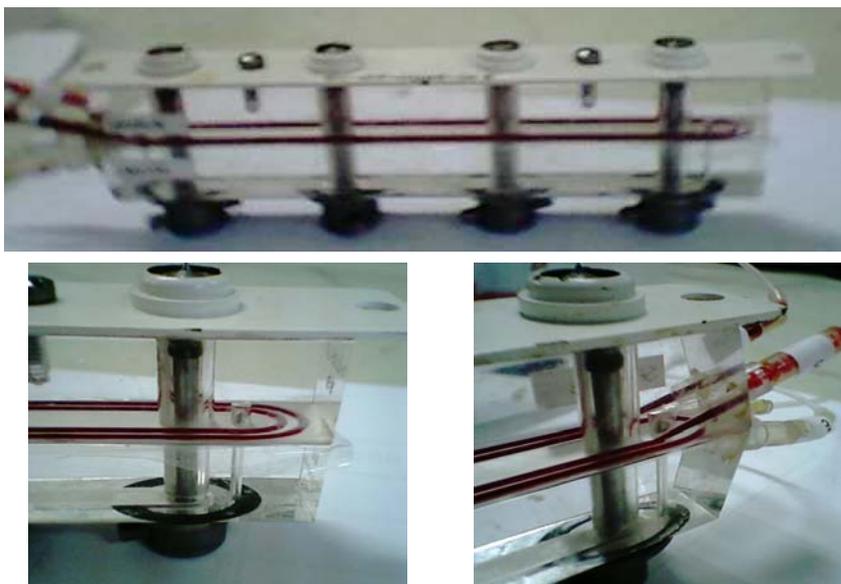


FIGURA 3.3: Fotos da câmara de diálise em funcionamento.

A câmara de diálise possui 4 conexões que podem servir de entrada e saída, duas para a parte superior e duas para a parte inferior. As duas partes são separadas pela membrana e dentro da cela o caminho a ser percorrido é de duas voltas antes de ser direcionada para a outra conexão. Na figura 3.3 é possível observar esse caminho duplo.

O sangue (1 mL) era impulsionado por uma bomba peristáltica e depois de passar por todo sistema era recolhido para descarte apropriado. Na parte inferior da cela ocorria a passagem do tampão Tris, que recolhia os íons com tamanho inferior à porosidade da membrana. Para cada mL de sangue foi coletado de 2 a 3 mL de tampão que esteve em “contato” com o sangue. O volume recolhido foi superior ao da amostra pelo fato de estar em fluxo contrário e, quando era finalizada a passagem da amostra do sistema ainda ocorria a presença de solução tampão que esteve em contato com a amostra e portanto, contendo íons referentes à essa alíquota. Os volumes recolhidos

foram registrados para posterior correções referentes à variação de concentração.

A metodologia utilizada para a determinação dos teores de ferro livre no sangue foi a GFAAS. Para a determinação do programa de aquecimento foi feita uma curva de pirólise e atomização utilizando soluções de tampão Tris-ácido acético como branco e com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe, preparada a partir de solução padrão estoque, sem o uso de modificador químico. Observando a figura 3.4 é possível perceber que as temperaturas de 700°C e 2200°C são as ideais para pirólise e atomização, respectivamente. O limite de detecção do método foi de $4,8 \mu\text{g ml}^{-1}$. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

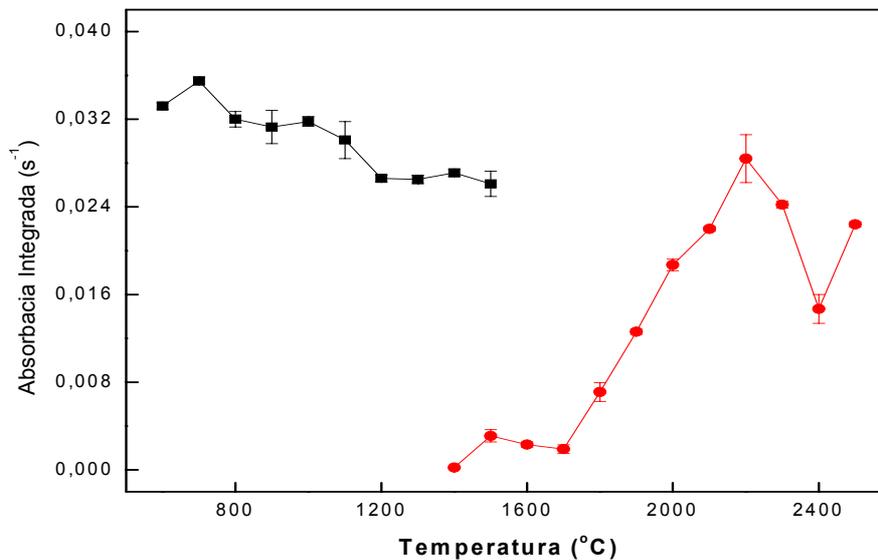


Figura 3.4: Curvas de pirólise e atomização para Tris-ácido acético

3.4.4 – *Fe(II) e Fe(III)*

Burkan e Walker descreveram a precipitação de proteínas em 1940. Esse método foi utilizado para a determinação de ferro em plasma com a utilização de orto-fenantrolina como agente colorimétrico (Burkan et al, 1940).

Neste estudo as proteínas foram precipitadas no sangue para a determinação de ferro fracamente ligado às proteínas, ou seja, o ferro que se encontrava disponível após a desnaturação das proteínas. Foi determinado o estado de oxidação, Fe(III) ou Fe(II), na tentativa de correlacionar esses teores com os animais resistentes ou sensíveis aos carrapatos.

As amostras de sangue tiveram as proteínas precipitadas com ácido tricloroacético. A proporção de 1:1 sangue:ácido tricloroacético foi utilizada e a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi inserido no sistema em fluxo mostrado na figura 3.5 para a determinação de Fe(II) e Fe total utilizando 1,10 fenantrolina como reagente colorimétrico. Com os valores de Fe(II) e Fe total a determinação do Fe(III) foi realizada por diferença [Barker, 1940].

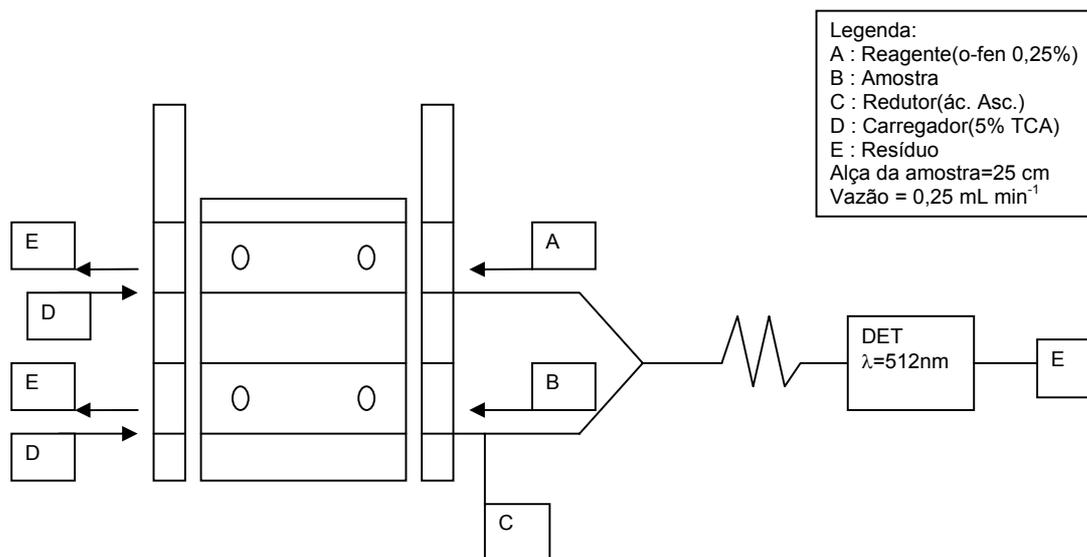


FIGURA 3.5: Esquema do sistema em fluxo utilizado para a especiação de ferro

Neste sistema a amostra é inserida através de injetor comutador e entra em contato com o reagente colorimétrico por zonas coalescentes, após mistura em uma bobina de reação de 50 cm (250 μ L), o Fe(II) é determinado no comprimento de onda 512nm. Para a determinação de Fe total foi adicionado ácido ascórbico para redução do Fe³⁺ para Fe²⁺ seguindo a equação abaixo:

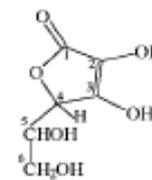
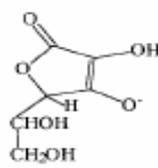
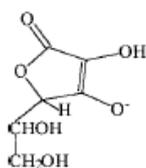


FIGURA 3.6: Reação de redução do ferro para determinação de ferro total

O ácido ascórbico é introduzido na amostra antes dessa entrar em contato com a 1,10 fenantrolina. A curva analítica para esta determinação foi construída em meio 5% ácido tricloroacético contendo Fe(II) e Fe(III). A leitura da curva analítica também no final do experimento indicou que não houve interconversão significativa (Fig. 3.7).

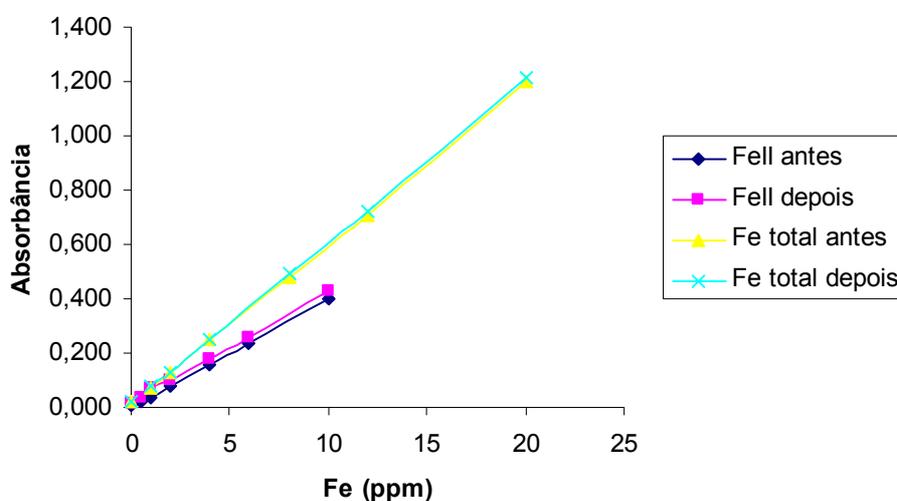


FIGURA 3.7: Curvas analíticas do sistema em fluxo para determinação de Fe II e Fe total, referentes ao início e final de um lote de amostras.

3.4.5 – Hematócrito

Foi feito hematócrito no sangue para se obter volume globular presente nos sangue dos animais, uma vez que esta tem ligação direta com o teor de Fe no organismo.

O sangue coletado com anticoagulante heparina é colocado em capilares apropriados e fechado com uma chama produzida em bico de

Bunsen em uma das extremidades. Os capilares são colocados numa microcentrifuga especial para este tipo de análise, centrifugados por 10 min e, com a separação dos eritrócitos, plasma e glóbulos brancos, é possível medir o volume de glóbulos vermelhos em porcentagem, seguindo uma tabela pré-definida, contendo os valores em %.

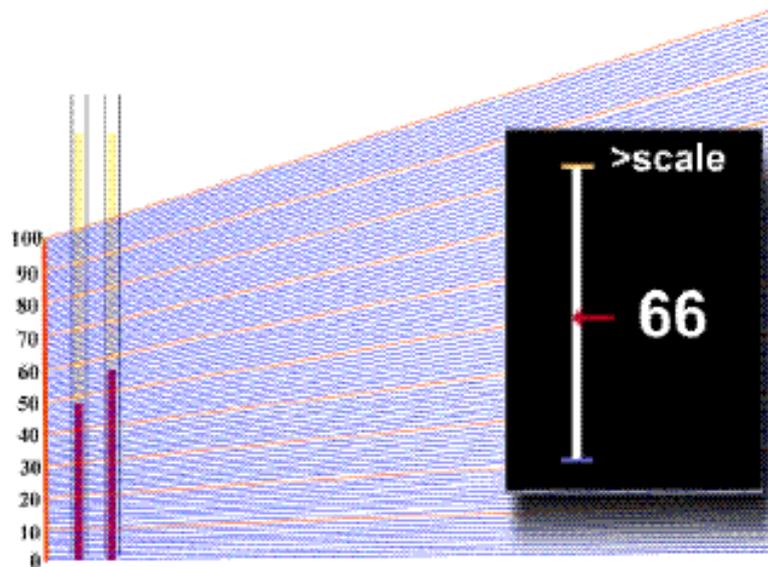


FIGURA 3.8: Exemplo de como é feita a leitura do volume de glóbulos vermelhos em um hematócrito.

4. Resultados e Discussão

4- Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados em forma de gráficos e divididos em função da raça dos animais e do procedimento empregado para a determinação dos diferentes teores de ferro.

4.1 – Ferro Total

A determinação dos teores totais de ferro foi efetuada por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), sendo que foram analisadas amostras de sangue, plasma e soro sanguíneo diluídos em meio aquoso.

4.1.1- Sangue

No ano de 2005 foi colhido o sangue de 40 vacas pertencentes às raças Angus, Canchim, Simental e Nelore. Essas vacas se encontravam em diferentes níveis nutricionais, além de algumas estarem prenhas. A resistência e a sensibilidade do animal ao carrapato foram previamente estabelecidas em outras pesquisas em desenvolvimento na Embrapa Pecuária Sudeste. O sangue foi colhido durante cirurgias de coleta de pele e linfócitos. Os animais haviam sido infestados por carrapatos, visando um melhor entendimento sobre o que ocorre de diferente no metabolismo dos animais resistentes e sensíveis.

Na FIGURA 4.1 estão apresentados os teores de ferro total encontrados no sangue. Os resultados foram obtidos após digestão das amostras empregando radiação microondas e após diluição em meio aquoso.

Os resultados indicaram a possibilidade de se realizar as determinações sem a necessidade de se digerir as amostras, conforme pode ser observado na Figura 4.1. Alguma variação foi observada dentro de uma mesma raça, provavelmente em função da variabilidade do estado nutricional e fisiológico dos animais, já que os teores de ferro são variáveis em função desses parâmetros.

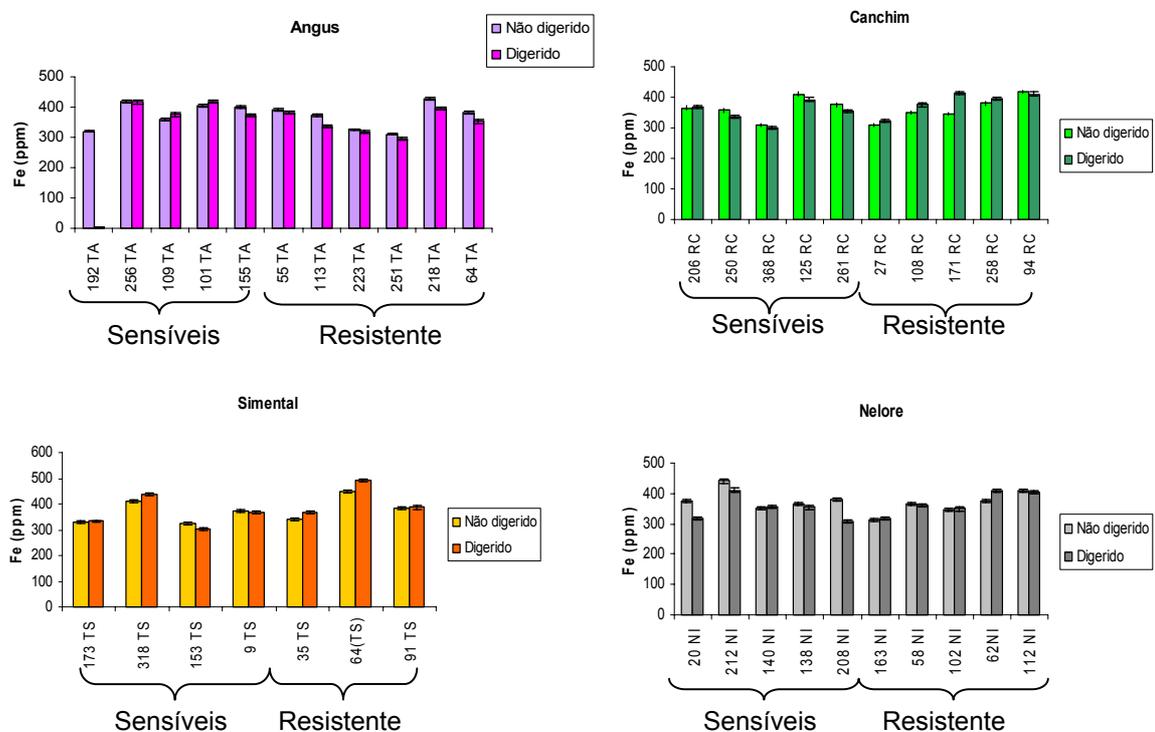


FIGURA 4.1: Teores de Fe total obtidos em amostras de sangue de animais das raças Angus, Canchim, Simental e Nelore no ano de 2005 submetidos à infestação com carrapatos.

No segundo ano do experimento (ano 2, referente a 2006) não foi possível fazer a coleta de sangue nos mesmos animais, em função de sua não

disponibilidade. No entanto, nessa segunda etapa do experimentos procurou-se a obtenção de maior homogeneidade dentro do grupo amostral, optando-se por vacas em final de gestação. Foram escolhidas 35 vacas dentro das raças Canchim, Simental e Angus. Essas vacas não estavam infestadas e nem dentro de algum outro experimento relacionado à resistência ou sensibilidade ao carrapato na época da coleta. Mas foram selecionados quanto à resistência ou sensibilidade a carrapatos, que era determinada através de infestações de 3000 larvas de carrapatos e a contagem era feita manualmente em áreas preferenciais de fixação no lado esquerdo do animal feita após 21 dias [SILVA, 2006]

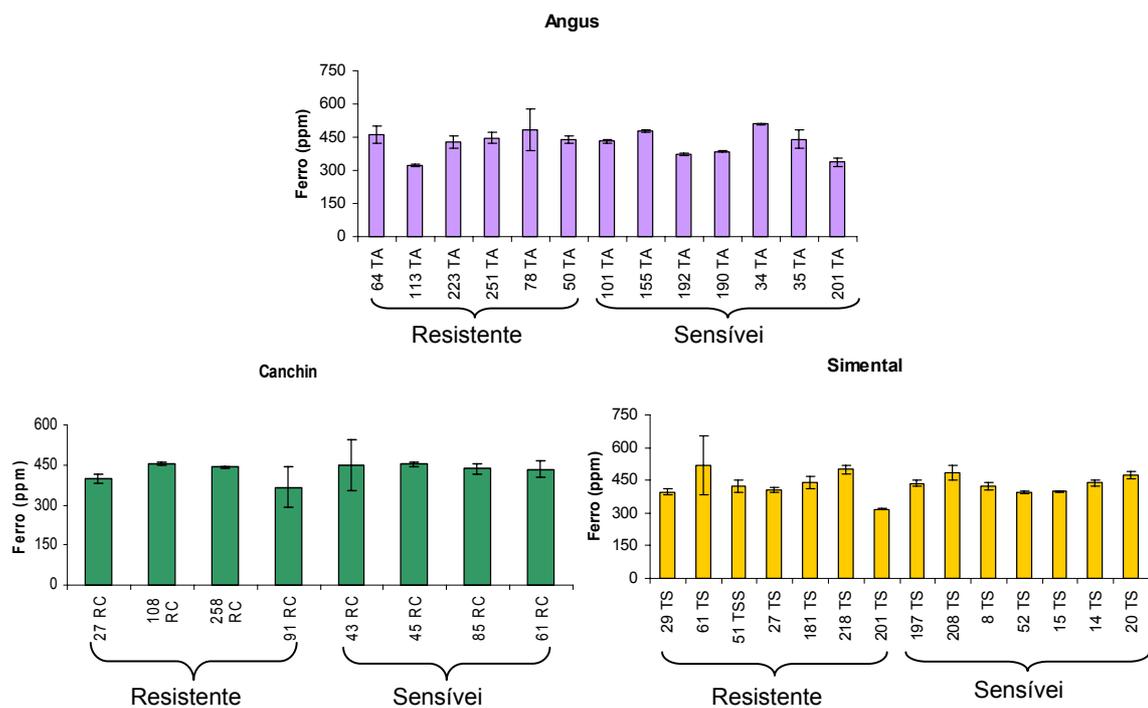


FIGURA 4.2: Teores de Fe total obtidos em amostras de sangue I no segundo período do estudo (ano 2).

Na FIGURA 4.2 são apresentados os resultados de Fe total obtidos no sangue dos animais avaliados no ano 2. Comparando os resultados

obtidos no ano 1 com os obtidos no ano 2 observa-se uma variação no teor médio encontrado dentro de cada raça. É muito difícil explicar essa variação se forem consideradas as variáveis existentes dentro do grupo amostral. No entanto, essa variação pode estar relacionada ao estado fisiológico das vacas, já que no período de gestação é muito importante um alto teor de ferro. A partir dos resultados de ferro total não foi possível se observar uma diferença entre os animais sensíveis e resistentes a carrapatos.

4.1.2 – Soro e Plasma

As amostras de soro e plasma analisadas foram diluídas em água na proporção 1:1 (amostra:água) e inseridas diretamente no FAAS. O plasma foi separado por centrifugação do sangue colhido com anticoagulante. Para a separação do soro foi utilizado frasco à vácuo especial para esta finalidade, não havendo a adição de anticoagulante.

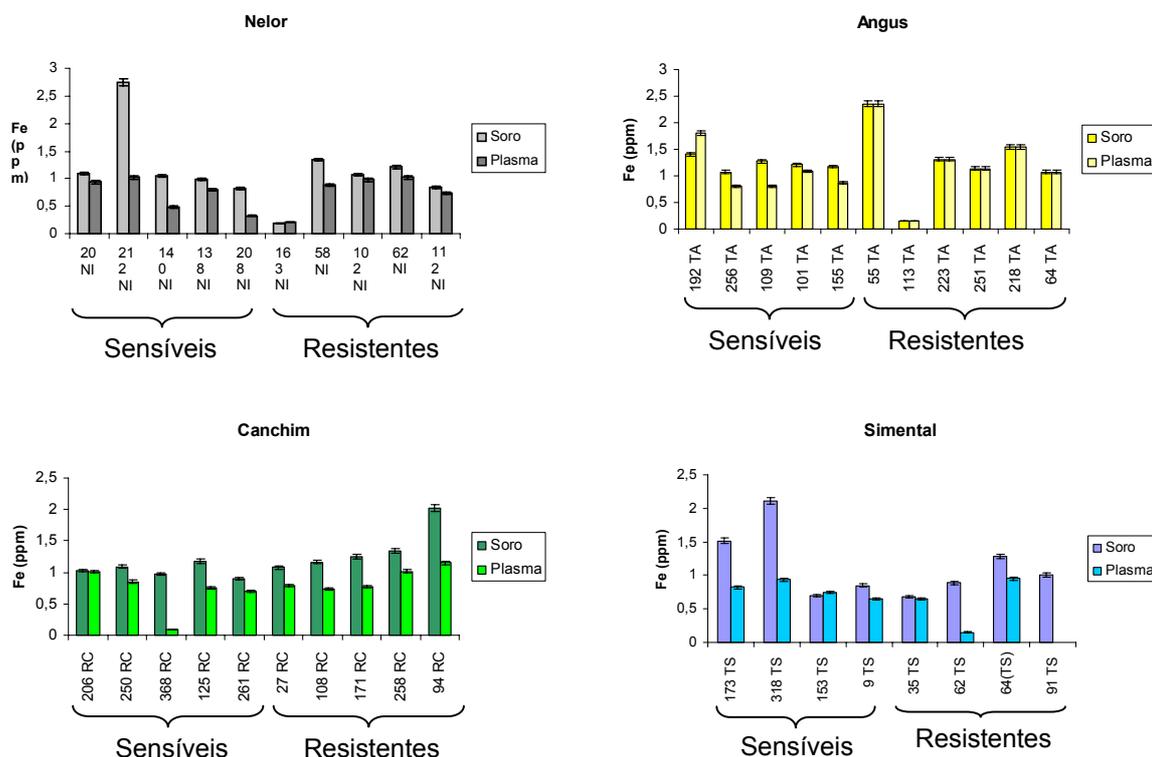


FIGURA 4.3: Teores de Fe total obtidos nas amostras de soro e plasma durante experimento realizado no ano 1 (2005).

Na FIGURA 4.3 são apresentados os resultados de Fe total obtidos nas amostras de plasma e soro dos animais avaliados no ano 1 do experimento (2005). É possível se observar que no soro é encontrado uma maior quantidade de ferro, mesmo considerando-se os menores teores de mais “limpo” por conter menos proteínas em relação ao plasma. Dentro das raças existe uma variação muito grande nos teores de ferro total, sendo difícil a segregação entre os animais resistentes e sensíveis ao carrapato. No entanto, pode-se observar que a raça mais homogênea em relação aos teores totais de ferro foi a Canchim.

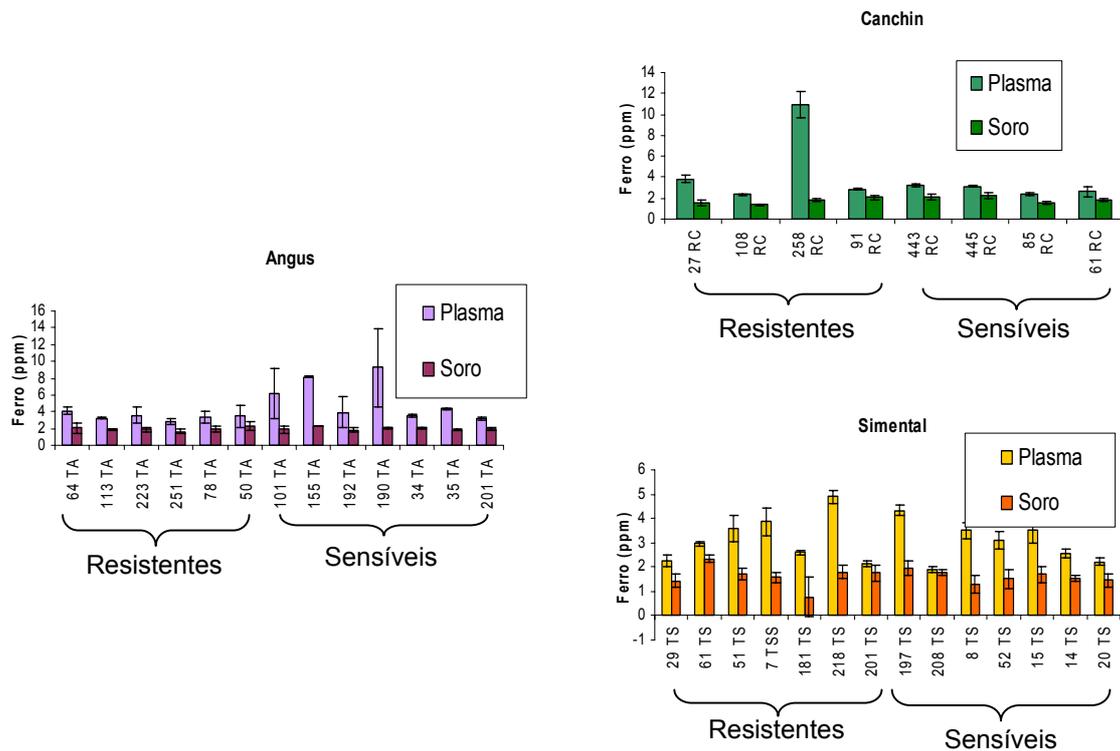


FIGURA 4.4: Teores de Fetal obtidos nas amostras de soro e plasma 1 durante experimento realizado no ano 2 (2006).

Os teores de ferro total obtidos nas vacas prenhas no experimento realizado no ano 2 (2006) se apresentam mais homogêneos dentro das raças. As amostras de plasma apresentaram os teores de ferro mais elevados em todos os animais.

4.2 – Ferro livre

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) foi utilizada para a determinação do ferro livre nas amostras de sangue avaliadas nas duas fases do experimento. O sangue colhido com anticoagulante heparina foi dialisado em câmara de diálise com membrana

Spectra/Porr de porosidade conhecida (6 a 8 KDa), em sistema em fluxo. As amostras eram injetadas na parte inferior da câmara e o ferro que passava pela membrana, considerado livre (não ligado a proteínas), era colhido em volume conhecido (de 2 a 2 mL) de tampão TRIS-ácido acético pH = 7,0. Os teores de ferro livre foram então determinados a partir da introdução direta da solução contendo o ferro no GFAAS.

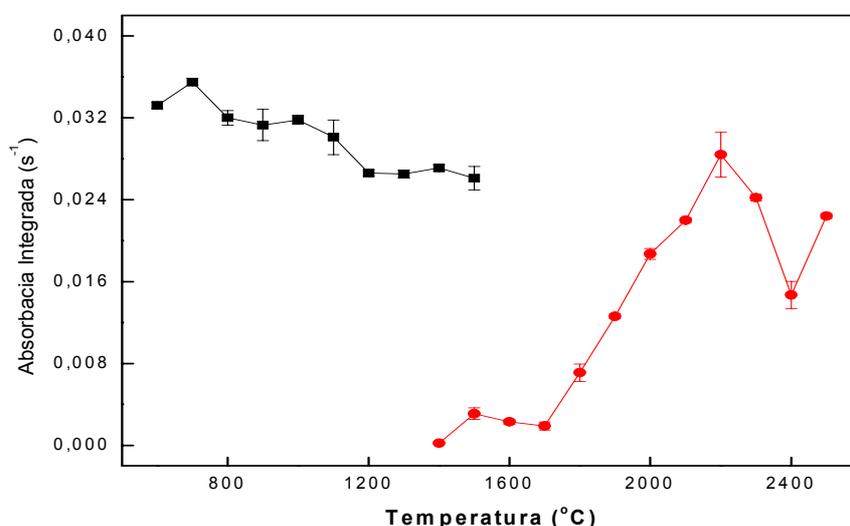


FIGURA 4.5: Curvas de pirólise e atomização, obtidas para a definição do programa de aquecimento para a determinação de ferro livre em meio tampão Tris-ácido acético.

Para a construção do programa do aquecimento no forno de grafite foram feitas curvas de pirólise e atomização utilizando tampão Tris-ácido acético como branco e tampão Tris-ácido acético com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe. A partir dos resultados obtidos e apresentados na FIGURA 4.5 a temperatura de pirólise foi fixada em 700°C e a temperatura de atomização em 2200°C , com a etapa de limpeza fixada como 2600°C .

TABELA 4.1: Programa de aquecimento utilizado no GFAAS

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	90	5
2	90	20
3	120	5
4	120	25
5	700	5
6	700	10
7	2200	0,4
8	2200	5
9	2600	1
10	2600	3

Após a montagem do programa de aquecimento do forno de grafite foi feita a otimização da câmara de diálise. Essa câmara, construída em acrílico, possui uma entrada e uma saída na parte superior e outra entrada e saída na parte inferior. A membrana de diálise é posicionada entre as duas partes da câmara, que são presas por 4 parafusos. O fluxos superior é separado do fluxo inferior pela membrana de diálise, não entrando em contato diretamente entre si. Neste trabalho foi usada uma membrana de porosidade entre 6 e 8 kDa, visando apenas a passagem da parte iônica, ou seja, impedindo que as proteínas, enzimas e outras moléculas grandes passem pela membrana, pois podem estar ligadas ao Fe, impedindo a determinação da forma desejada do analito.

O sistema de diálise em fluxo foi montado de forma simples, com baixo fluxo para garantir que todo ferro livre passasse para o tampão coletor. Um teste foi efetuado para se verificar se o ferro livre realmente iria passar pela membrana: uma solução contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe foi injetada como amostra no sistema e um volume pré definido de tampão Tris-ácido acético utilizado como fluxo acceptor foi analisado, para determinação do teor de Fe. Os resultados indicaram que todo o ferro presente na solução simulando a amostra foi transferido para a solução tampão coletora, passando pela membrana de diálise .

TABELA 4.2: Parâmetros utilizados para a diálise

Parâmetro	
Fluxo	$0,25 \text{ mL min}^{-1}$
Porosidade da membrana	6-8 kDa
Volume de tampão recolhido	de 2 a 3 mL
Volume de amostra injetado	1 mL

Para a determinação de ferro livre nas amostras foi utilizado 1 mL de sangue com anticoagulante heparina, injetado no sistema por injetor/comutador manual e alça de amostragem de 175 cm (1 mL). Os fluxos das soluções doadora e receptora foram iguas, equivalente a $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, sendo recolhidos de 2 a 3 mL de solução tampão receptora contendo o Fe livre dialisado.

Os primeiros testes do sistema, para verificação de sua aplicabilidade, foram empregadas amostras de sangue de bezerros no primeiro mês de vida. Os resultados obtidos indicaram teores de ferro relativamente

altos ($\sim 70 \mu\text{g L}^{-1}$). Dificilmente são encontrados carrapatos em bezerras, mas não se sabe o motivo. Esses altos teores de ferro livre no sangue de bezerras podem estar relacionados às hemoglobinas fetais ainda existentes nos animais nos primeiros meses de vida.

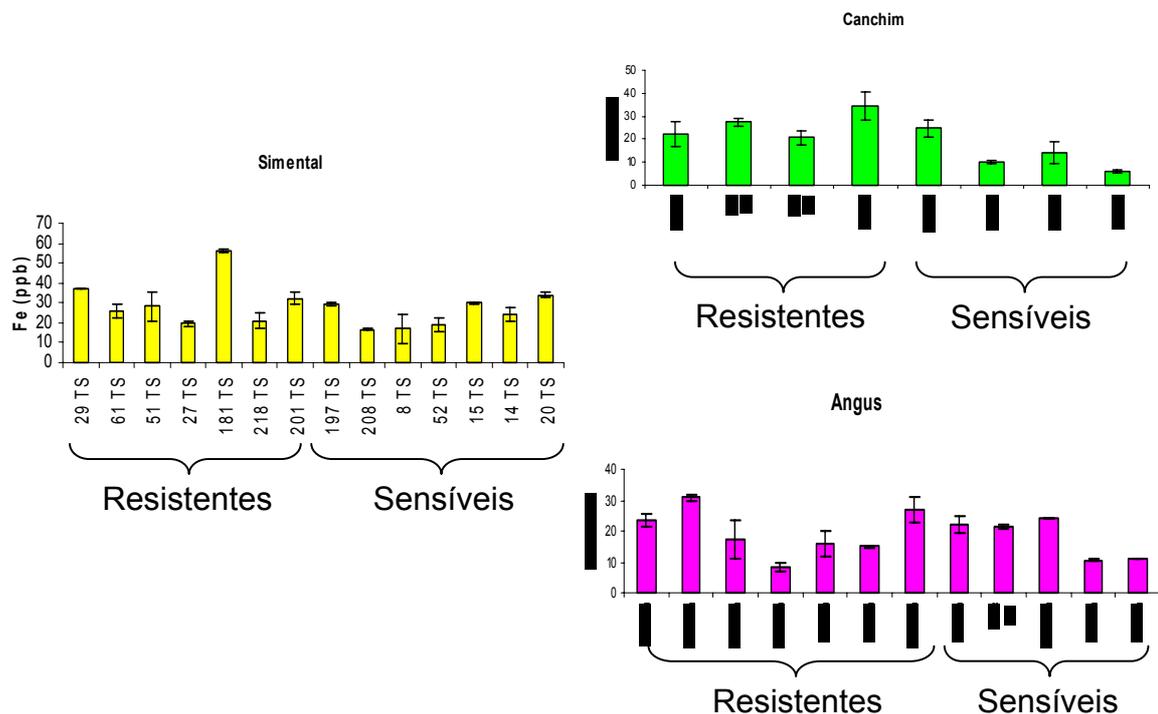


FIGURA 4.6: Teores de ferro livre referente ao segundo período do experimento.

A raça Canchim apresentou diferença nos níveis de ferro livre entre os animais resistentes e sensíveis a carrapato. No entanto, para a confirmação desse resultado, um número maior de animais deve ser analisado, para que outras variáveis que não foram levadas em consideração sejam minimizadas. As raças Simental e Angus não apresentaram diferenças nos teores de ferro livre entre os animais resistentes e sensíveis ao carrapato.

4.3- Sistema de Análise em Fluxo

No sistema de análise em fluxo foram analisados o estado de oxidação do ferro encontrado no sangue. As proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético, desnaturando as proteínas e conseqüentemente liberando os íons ferro. Esse procedimento já é descrito desde 1940 para determinação de ferro sérico [BARKER et al., 1940].

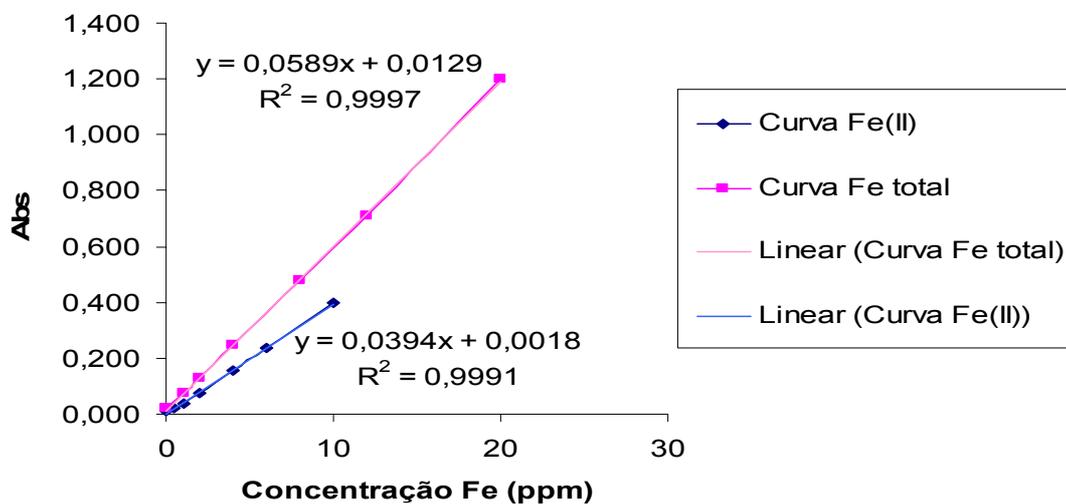


FIGURA 4.7: Curvas analíticas de referência obtidas no sistema por análise em fluxo para determinação de Fe(II) e Fe total.

A curva analítica foi construída no mesmo meio em que se encontra a amostra e se mostrou linear dentro da faixa dos teores encontrados. Os dois estados de oxidação (Fe II e Fe III) estavam presentes. Para verificação da estabilidade das soluções, as soluções analíticas foram analisadas no início e no final das determinações, podendo-se observar que durante o período não houve interconversão significativa entre os estados de oxidação, sendo que esse resultado foi considerado também para as amostras.

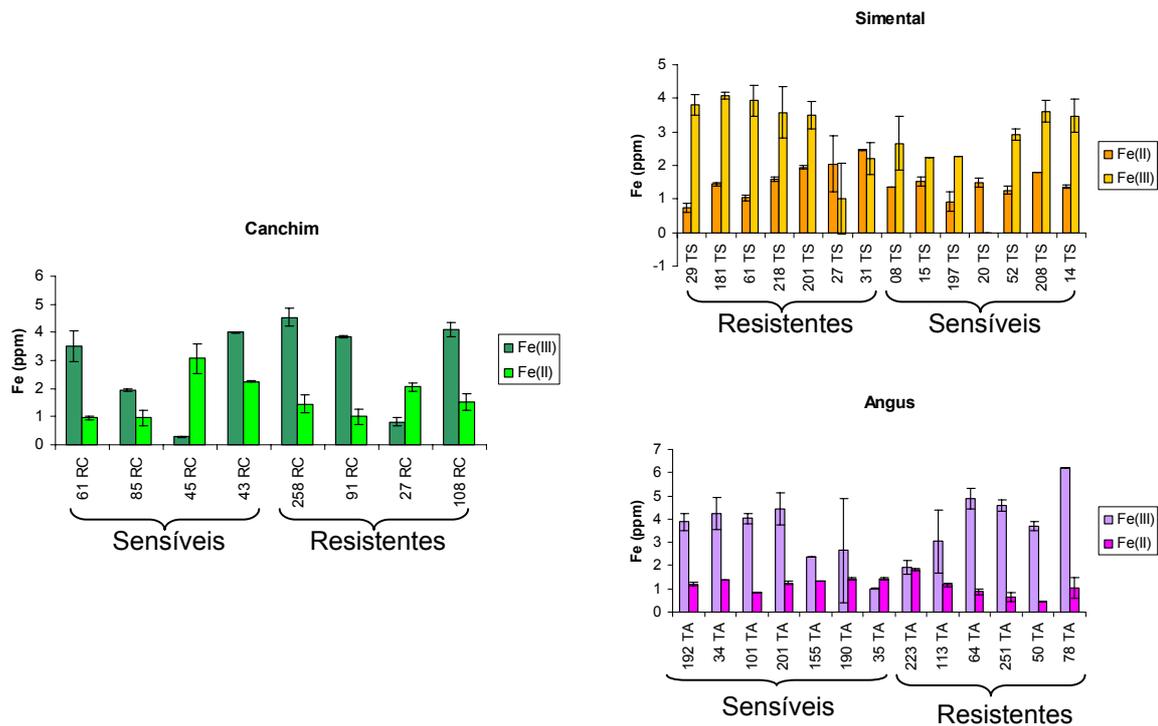


FIGURA 4.8: Teores de Fe(II) e Fe(III) determinados pelo sistema de análise em fluxo apresentado no item 3.4.4 (Materiais e Métodos).

Os resultados apresentados na FIGURA 4.8 indicam uma tendência do teor de Fe(III) ser superior aos teores referentes ao Fé(II) para o sangue de todos os animais avaliados, mas não há diferença entre os animais sensíveis e resistentes ao carrapato. Vale lembrar que a precipitação das proteínas foi feita no sangue e o ferro fortemente ligado a proteínas (como da hemoglobina, por exemplo) não foi liberado.

4.4- Hematócrito

O estudo do volume de glóbulos vermelhos (em %) foi realizado em função de sua correlação com o teor de ferro no sangue, já que é na hemoglobina que se encontra a maior quantidade desse metal no organismo.

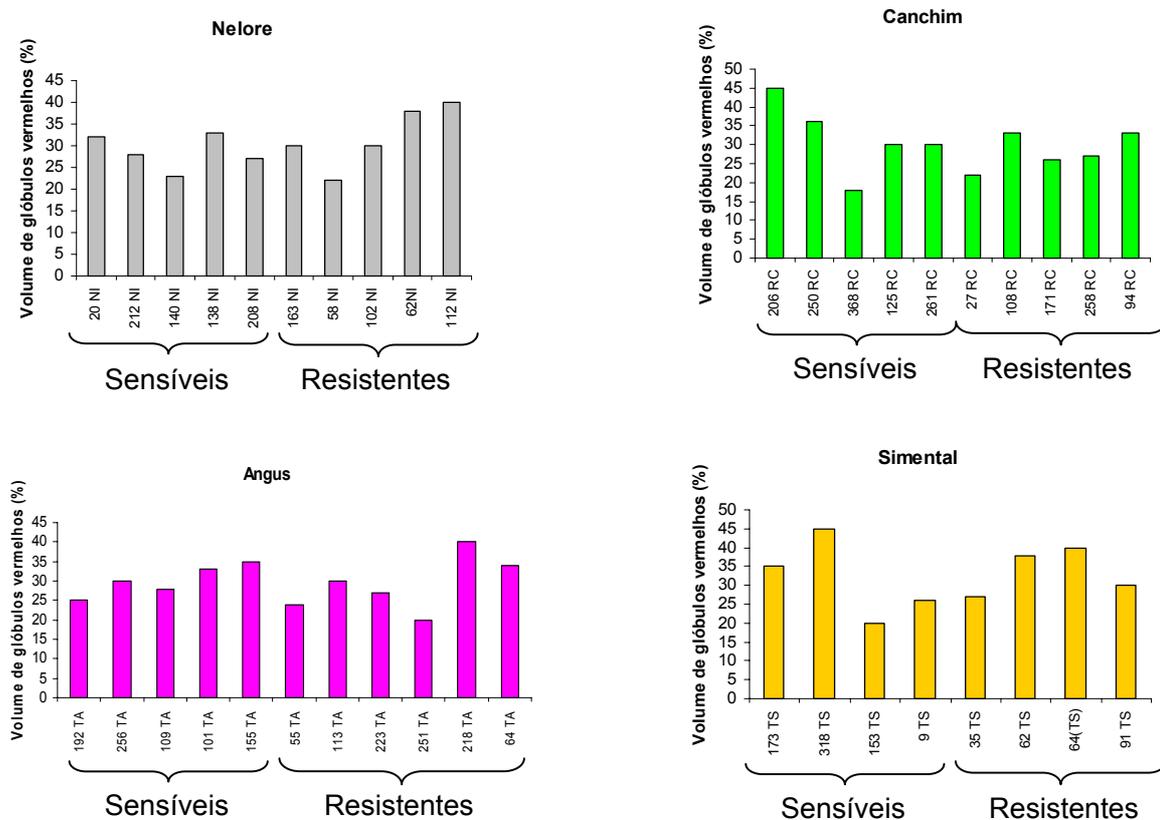


FIGURA 4.9: Hematócrito dos animais analisados no primeiro período do experimento (ano 1 - 2005).

O hematócrito está intimamente ligado à saúde do animal. Permite a detecção de uma anemia, por exemplo. Comparando os teores de hematócritos obtidos com os animais avaliados no ano 1 com os obtidos no ano 2 é possível observar que o volume globular aumentou de uma forma

geral, mostrando um estado fisiológico diferente. Os teores de hematócritos referentes ao ano 2 provavelmente são superiores em função de as vacas estarem prenhas e necessitarem de uma maior quantidade de ferro e de outros minerais.

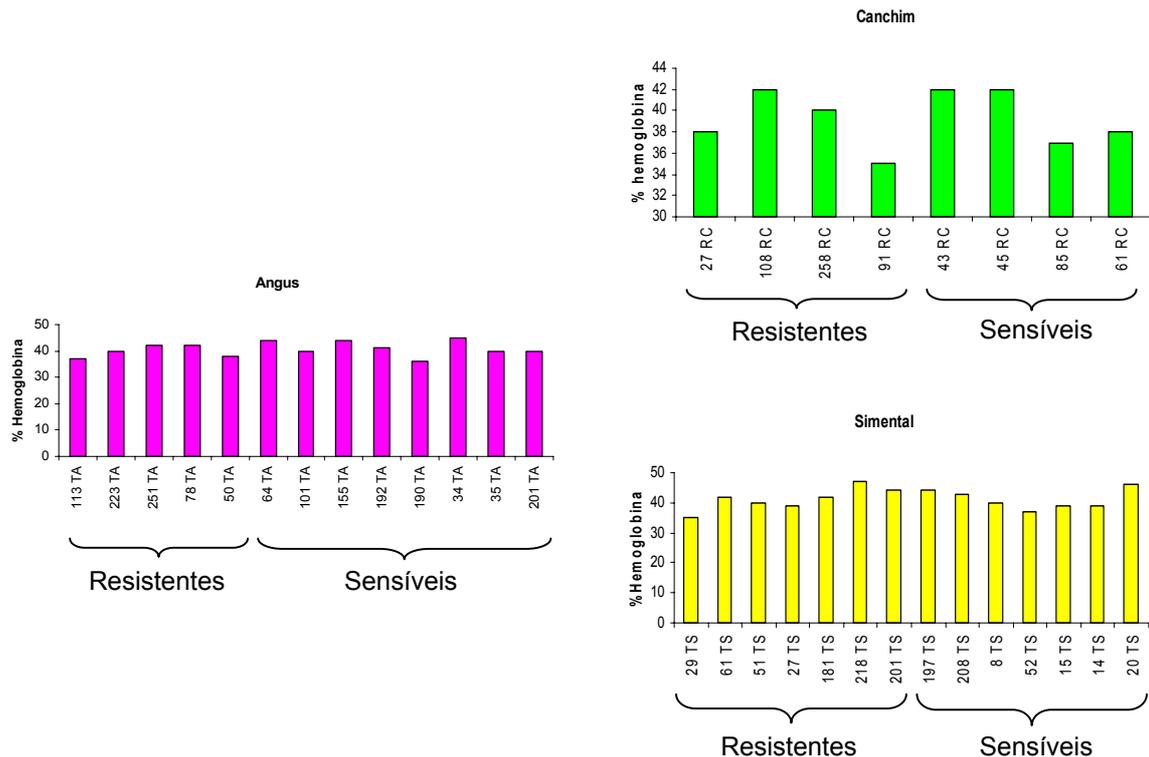


FIGURA 4.10: Teores de hemoglobina determinados no sangue dos animais avaliados no ano 2.

Alguns animais foram analisados nos dois anos e é clara a diferença na percentagem do volume globular entre esses animais, mostrando que o estado fisiológico se apresentava diferente.

4.5 – Análise Estatística

Visando melhor avaliação dos resultados, os dados foram avaliados estatisticamente. Foram aplicados os testes T e de correlação de variáveis.

4.5.1 – Teste T

O teste T é um teste estatístico usado para amostras pequenas. Ele compara e testa a média de dois conjuntos de resultados. É um teste de hipótese, onde o valor encontrado é relacionado a um conjunto de valores presentes na tabela específica que expressa a probabilidade do valor encontrado estar dentro do limite desejado [BARROS NETO, 2001]

Neste trabalho foram analisadas todas as variáveis estudadas dentro de cada raça. As duas médias comparadas foram dos animais resistentes e sensíveis a carrapatos, dentro de cada raça, para observar a existência ou não de algum indicativo de resistência pelo teor de ferro.

TABELA 4.3: Resultados do teste *t* para as variáveis analisadas de acordo com a raça.

	Simental	Canchim	Angus	Nelore
Hematocrito	0,33	0,58	0,50	0,29
Soro	0,74	0,33	0,18	0,31
Plasma	0,65	0,01	0,03	0,85
Total	0,55	0,93	0,89	0,98
Digerido	0,75	0,88	0,55	0,94
Fe II	0,90	0,18	0,61	
Fe III	0,10	0,98	0,02	
Fe livre	0,29	0,55	0,72	

Na tabela 4.4 os valores estão descritos em P, ou seja, na probabilidade das médias terem ou não valores significativos para diferenciar os grupos de animais. Foi utilizado 95% de confiança, isto é, os valores abaixo de 0,05 na tabela possuem uma diferença significativa entre os grupos sensíveis e resistentes a carrapatos. O ferro determinado no plasma apresentou diferença significativa para as raças Canchim e Angus, com valores referentes a 0,0098 e 0,034 respectivamente. O Fe(III) determinado por análise por injeção em fluxo apresentou um valor de 0,0168, abaixo de 0,05 e assim, uma probabilidade dessa variável influenciar na resistência natural a carrapatos na raça Angus.

4.5.2 – Correlação de variáveis

A existência de correlação linear entre as variáveis foi verificada. Essa correlação é verificada através dos valores encontrados quando se correlaciona uma variável com outra. Quando o valor é bem próximo de zero significa que não existe correlação, quanto mais próximo de 1 ou -1 for o valor maior é correlação, que pode ser proporcional (valores próximos de 1) ou inversamente proporcionais (valores próximos de -1) [Vogel, 2002].

Existe uma tabela de valores críticos, que são modificados de acordo com a quantidade de dados que estão sendo correlacionados. Esses valores foram tirados de tabelas apêndices de livros de estatística e probabilidade e se encontram abaixo de cada tabela apresentada. Os valores encontrados dentro do intervalo $-t > x > t$, onde t é o valor encontrado na tabela e x o valor da correlação, indicam que não existe correlação [BARROS NETO, 2001].

TABELA 4.4: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Nelore no ano 1 (2005).

Nelore	Fe (soro)	Fe (plasma)	Fe (digerido)	Fe (ñ digerido)	Hematócrito
Fe (soro)	1				
Fe (plasma)	0,63	1			
Fe (digerido)	0,52	0,17	1		
Fe (ñ digerido)	0,77	0,52	0,71	1	
Hematócrito	-0,25	-0,15	0,40	0,25	1

* valor crítico = 0,56

A tabela 4.5 apresenta os valores de correlação entre as variáveis, onde é observada a correlação entre as variáveis sangue digerido e diluído, Fe no soro e no plasma e Fe no soro com o Fe não digerido. Esses valores significam que de alguma maneira essas variáveis se correlacionam.

TABELA 4.5: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Canchim no ano 1 (2005).

Canchim	Fe (soro)	Fe (plasma)	Fe (digerido)	Fe (não digerido)	Hematócrito
Fe (soro)	1				
Fe (plasma)	0,58	1			
Fe (digerido)	0,64	0,67	1		
Fe (não digerido)	0,61	0,64	0,75	1	
Hematócrito	0,09	0,25	0,33	0,49	1

* valor crítico = 0,56

Na tabela 4.6 estão os dados de correlação entre as variáveis da raça Canchim analisadas no ano 1. Nessa raça, muitas variáveis se correlacionaram: Fe (soro) X Fe (plasma), Fe (soro) X Fe (digerido), Fe (soro) X Fe (não digerido), Fe (plasma) X Fe (digerido), Fe (plasma) X Fe (não digerido) e Fe (digerido) X Fe (não digerido).

TABELA 4.6: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Angus no ano 1 (2005).

Angus	Fe (soro)	Fe (plasma)	Fe (digerido)	Fe (ñ digerido)	Hematócrito
Fe (soro)	1				
Fe (plasma)	0,01	1			
Fe (digerido)	-0,04	-0,81	1		
Fe (ñ digerido)	0,01	-0,59	0,67	1	
Hematócrito	-0,36	-0,19	0,40	0,70	1

* valor crítico = 0,56

Na raça Angus houve tanto correlação positiva como negativa. As correlações positivas foram: Fe (digerido) X Fe (não digerido) e Fe (não digerido) X hematócrito e as correlações negativas: Fe (plasma) X Fe (não digerido) e Fe (plasma) X Fe (digerido).

TABELA 4.7: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Simental no ano 1 (2005).

Simental	Fé (soro)	Fe (plasma)	Fe (digerido)	Fe (ñ digerido)	Hematócrito
Fe (soro)	1				
Fe (plasma)	0,69	1			
Fe (digerido)	0,48	0,61	1		
Fe (ñ digerido)	0,50	0,64	0,89	1	
Hematócrito	0,89	0,89	0,63	0,61	1

* valor crítico = 0,56

A raça Simental foi a que mais apresentou correlação entre as variáveis - Fe (soro) X Fe (plasma), Fe (soro) X hematócrito, Fe (plasma) X Fe (digerido), Fe (plasma) X Fe (não digerido), Fe (plasma) X hematócrito, Fe (digerido) X Fe (não digerido), Fe (digerido) X hematócrito, Fe (não digerido) X hematócrito, sendo todas as correlações positivas.

TABELA 4.8: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Canchim no ano 2 (2006).

Canchim	Fe (sangue)	Fe (plasma)	Fe (soro)	FeII	FeIII	Fe livre	Hematócrito
Fe (sangue)	1						
Fe (plasma)	0,12	1					
Fe (soro)	-0,09	0,07	1				
Fe II	0,34	-0,03	0,33	1			
Fe III	0,04	0,14	-0,14	-0,19	1		
Fe livre	-0,34	-0,04	-0,09	0,11	0,65	1	
Hematócrito	0,84	-0,16	0,43	0,69	0,01	0,01	1

* valor crítico = 0,632

No ano 2 foram avaliadas 7 análises em cada amostra e cada uma foi tratada estatisticamente na tentativa de se obter o maior conjunto de resposta dos dados coletados. A raça Canchim apresentou correlação entre as variáveis Fe (III) X Fe livre, Fe (sangue) X hematócrito e Fe (II) X hematócrito.

TABELA 4.9: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Simental no ano 2.

Simental	Fe (sangue)	Fe (plasma)	Fe (soro)	FeII	FeIII	Fe livre	Hematócrito
Fe (sangue)	1						
Fe (plasma)	0,18	1					
Fe (soro)	0,38	0,23	1				
Fe II	-0,19	0,05	-0,07	1			
Fe III	0,05	-0,17	0,20	-0,29	1		
Fe livre	0,37	0,30	0,35	-0,16	-0,45	1	
Hematócrito	0,42	0,17	0,36	0,19	-0,14	0,56	1

* valor crítico = 0,497

A raça Simental apresentou correlação apenas do Fe livre com o hematócrito, como apresentado na tabela 4.9. A raça Angus apresentou correlações positivas e negativas. As correlações positivas foram entre as variáveis hematócrito X Fe (sangue) e hmatócrito X Fe livre. A correlação negativa foi entre Fe (II) X Fe (III).

TABELA 4.10: Valores de correlação entre as variáveis estudadas na raça Angus no ano 2 (2006)

Angus	Fe (sangue)	Fe (plasma)	Fe (soro)	FeII	FeIII	Fe livre	Hematócrito
Fe (sangue)	1						
Fe (plasma)	0,05	1					
Fe (soro)	0,19	0,37	1				
Fe II	-0,11	0,24	-0,02	1			
Fe III	0,18	-0,37	-0,09	-0,55	1		
Fe livre	0,09	-0,28	-0,11	-0,25	0,34	1	
Hematócrito	0,72	-0,17	0,04	-0,01	0,36	0,69	1

* valor crítico = 0,532

No ano 1 todas as raças apresentaram correlações entre o Fe (digerido) X Fe (não digerido), o que de alguma maneira era esperado. Analisando pelas correlações, as raças Simental e Canchim se mostraram parecidas, pois apresentaram 4 correlações entre as mesmas variáveis. No ano 2 as correlações entre as variáveis foram muito menores e não houve correlações parecidas entre as raças.

5. Conclusão

5 – Conclusões

De acordo com os resultados obtidos não foi encontrada diferença nos teores de ferro presentes no sangue entre os animais resistentes e sensíveis a carrapato. Este resultado não pode ser generalizado pelo fato da grande heterogeneidade do grupo amostral.

Foi possível a determinação do ferro total presente no sangue, soro e plasma diluídos em água ultra pura por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.

A utilização da membrana de diálise possibilitou a separação do ferro não ligado a proteínas presente no sangue. Em função dos baixos teores foi necessário o emprego da Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite para as determinações.

A determinação Espectrofotométrica de Fe(II) e Fe(III) por Análise por Injeção em Fluxo no sangue se mostrou eficiente, sendo uma técnica de manuseio fácil e simples.

As técnicas empregadas se mostraram complementares e adequadas para estudos de especiação de ferro em sangue e futuros estudos dessa natureza. Os resultados indicaram correlações que devem ser melhor compreendidas em futuros estudos com um grupo amostral maior e mais homogêneo.

6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, M. L.; POWELL, K. J. Flow Injection method for iron fractionation by reaction with oxine-derivatised Fractogel. *Analytica Chimica Acta* 433, 289-297. 2001.
- AMPAN, P.; LAPANANTNOPPAKHUN, S.; SOOKSAMITI, P.; JAKMUNEE J.; KRADTAP HARTWELL, S.; JAYASVATI, S.; CHRISTIAN, G. D.; GRUDPAN, K. Determination of trace iron in beer using flow injection system with in-valve column and bead injection. *Talanta* 58, 1327-1334. 2002.
- APPEL, M. J.; KUPER, C. F.; WOUTERSEN, R. A. Disposition, accumulation and toxicity of iron fed as iron(II) sulfate or as sodium iron EDTA in rats. *Food and Chemical Toxicology* 39, 261-269. 2001.
- AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. A. M. *Metais: gerenciamento da toxicidade*. São Paulo – SP: Editora Atheneu, cap 4, p 108-116, 2003.
- BARANY, E.; BERGDAHL, I. A.; BRATTEBY, L. E.; LUNDH, T.; SAMUELSON, G.; SCHÜTZ, A.; SKERFVING, S.; OSKARSSON, A. Trace element levels in whole blood and serum from Swedish adolescents: relation to gender, age, residential area, and socioeconomic status. *Environmental Research Section A*, **89**, 72-84, 2002.
- BARANY, E.; BERGDAHL, I. A.; BRATTEBY, L. E.; LUNDH, T.; SAMUELSON, G.; SKERFVING, S.; OSKARSSON, A. Iron status influence trace element levels in human blood and serum. *Environmental Research* 8, 215-223, 2005.
- BARKER, G.; WALKER, B. S. Determination of serum iron and pseudohemoglobin iron with o-phenantroline. *The Journal of Biological Chemistry* , 37-42. 1940.

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas – SP: Editora da Unicamp, 2001
- BUKHAVE, K.; SORENSE, A. D.; HANSEN, M. A simplified method for determination of radioactive iron in whole-blood samples. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 15, 56-58. 2001.
- BULL, B. S.; KOEPKE, J. A.; SIMSON, E.; van ASSENDEL, O. W. Procedure for determining packed cell volume by microhematocrit method; Approved Standard. *NCCLS*, 20 (18), H7-A3, 2000.
- BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; RONDÓN, C. An on-line flow-injection microwave-assisted mineralization and a precipitation/dissolution system for the determination of molybdenum in blood serum and whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* 58, 1167-1175, 2002.
- CÁMARA, F.; AMARO, M. A.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M. J. Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric) iron from school menus. *Eur. Food Res. Technol.*, 221: 768-773, 2005
- CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Aspectos atuais do metabolismo do ferro. *CiberSaude* . 2005.
- CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry* 40, 450-458, 1971.
- CHILLRUD, D.S.; HEMMING, N. G.; ROSS, J. M.; WALLACE, S.; LOIACONO, N. A rapid and precise procedure for Pb isotopes in whole blood by Fe co-precipitation and MC-ICPMS analysis. *Applied Geochemistry*, 20 (4), 807-813, 2005.

- CHONG C.R.; SULLIVAN Jr. D. J. Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: implications for drug discovery. *Biochemical Pharmacology* 66:2201-2212, 2003.
- COSTA, R. C. C.; ARAÚJO, A. N. Determination of Fe(III) and total Fe in wines by sequential injection analysis and flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 438, 227-233, 2001.
- ENGEL, C. L.; MARINHO, M. H.; DURAND, A. H.; ENGEL, H. F.; Cap. 3: Diálise e Outros Métodos de Substituição Renal; in Anonymous *Nefrologia: Insuficiência Renal Aguda, Insuficiência Renal Crônica e Terapia de Substância Renal*. MEDCURSO: Do internato à Residência, 2003, pp 55-66.
- FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia média. *Rev. Ciên. Farm. Básica Aplicada*, 27 (1), 9-19, 2006.
- FORNARO, A.; COICHEV, N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Química Nova* 21(5), 642-650, 1998.
- FUKUZAWA, K.; SAITOH, Y.; AKAI, K.; KOGURE, K.; UENO, S.; TOKUMURA, A.; OTAGIRI, M.; SHIBATA, A. Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. *Biochimica and Biophysica Acta* 1668:145-155, 2005.
- GARCIA NETO, M.; CAMPOS, E. J. Suscetibilidade de linhagens de frangos de corte à síndrome ascítica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 9(8), 803-808, agosto 2004.

- GOMES, D. M. C.; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C.; RANGEL, A. O. S. S. Spectrophotometric determination of iron and boron in soil extracts using multi-syringe flow injection system. *Talanta* 66, 703-711, 2005.
- GONZALES, J. C. O controle do carrapato do boi. 2ª Edição, Porto Alegre – RS: Edição do Autor, 1995, 80p.
- HARRINGTON, C. F.; ELAHI, S.; MERSON, S. A.; PONNAMPALAVANAR, P. A method for the quantitative analysis of iron speciation in meat by using a combination of spectrophotometric method and high-performance liquid chromatography coupled to detector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 73, 4422-4427, 2001.
- HARRINGTON, C. F.; ELAHI, S.; MERSON, S. A.; PONNAMPALAVANAR, P. Quantitative analysis of iron-containing protein myoglobin in different foodstuffs by liquid chromatography coupled to high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 87:253-258, 2004.
- HÉRMANEZ-CARABALLO, E. A.; RIVAS, F.; PEREZ, A. G.; MARCÓ-PARRA, L. M. Evaluation of chemometric techniques and artificial neural networks for cancer screening using Cu, Fe, Se and Zn concentration in blood serum. *Analytica chimica Acta* 533, 161-168, 2005.
- IDE-EKTESSABI, A.; KAWAKAMI, T.; ISHIHARA, R.; MIZUNO, Y.; TAKEUCHI T. Investigation on metal elements in the brain tissues from DNTC patients. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 137-10, 801-804, 2004.

- JIAGEN, L. V.; ZHANG, Z.; LI, J.; LUO, L. A micro-chemiluminescence determination of cyanide in whole blood. *Forensic Science International* 148, 15-19, 2005.
- JITMANEE, K.; HRTWELL, S. K.; LAKMUNEE, J.; JAYASVASTI, S.; RUZICKA, J.; GRUDPAN, K. A simple flow injection system with bead injection for trace iron determination. *Talanta* 57, 187-192, 2002.
- JOREGE, S. G. Hemacrose Hereditária. Última revisão: 12/12/06. <http://www.hepcentro.com.br/hemocromatose.htm>, acessado em 03/2007.
- KALLBERG, B.; PACEY, G. E. *Flow injection analysis: a practical guide*. Elsevier, Amsterdam, 1989.
- KALPALATHIKA, P. V. M.; CLARK, E. M.; MAHONEY, A. W. Heme iron content in selected ready-to-serve beef products. *Journal of Agric. and Food Chem.* 39, 1091-1093, 1991.
- KRISPER, P.; HADITSH, B.; STAUBER, R.; JUNG, A.; STADLBAUER, V.; TRAUNER, M.; HOLZER, H.; SHNEDITZ. In vivo quantification of liver dialysis: comparison of albumin dialysis and fractionated plasma separation. *Journal of Hepatology* 43:451-457, 2005.
- KRUG, F.J. *Métodos de preparo de amostras*, 6ª edição, revisada e ampliada. Santa Maria: UFSM, 2006, 282 p.
- KURITA, R.; YABUMOTO, N.; NIWA, O. Miniaturized one-chip electrochemical sensing device integrated with a dialysis membrane and double thin-layer flow channels for measuring blood sample. *Biosensors & Bioelectronics* 21(8), 1649-1653, 2006.
- KÖNIGSBERGER, L. C.; KÖNIGSBERGER, E.; MAY, P. M.; HEFTER, G. T. Complexation of iron (III) and iron (II) by citrate. Implications for iron speciation in blood plasma. *Journal of Inorganic Biochemistry* 78, 175-184, 2000.

- LAW, J.H. Insects, oxygen and iron. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292:1191-1195, 2002.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo – SP: Sarvier Editora, 1988
- LEW, V. L.; MACDONALD, L.; GINBURG, H.; KRUGLIAK, M.; TIFFERT, T. Excess haemoglobin digestion by malaria parasites: a strategy to prevent premature host cell lysis. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 32:353-359, 2004.
- LOHAN, M. C.; AGUILAR-ISLAS, A. M.; FRANKS, R. P.; BRULAND, K. W. Determination of iron and copper in seawater at pH 1,7 with a new commercially available chelating resin. NTA Superflow. *Analytica Chimica Acta* 530, 121-129, 2005.
- MANTOVANI, D. M. B. *Especiação de ferro em concentrado de tomate*. Campinas, Programa de Pós Graduação em Química – UNICAMP, Dissertação de Mestrado, 1989, 94 p.
- MEYRICK, D.; WEBB, J.; COLE, C. Iron and iron proteins found in the genetic disease, hereditary spherocytosis. *Inorganica Chimica Acta* 339, 481-487, 2002.
- MIRÓ, M.; FRENZEL, W. Investigation of chemical effects on the performance of flow-through dialysis applied to the determination of ionic species. *Analytica Chimica Acta* 512, 311-317, 2004.
- OGUMA, K.; YOSHIOKA, O. Flow-injection simultaneous determination of iron(III) and copper(II) and of iron(III) and palladium(II) based on photochemical reactions of thiocyanato-complexes. *Talanta* 58, 1077-1087, 2002.
- OLIVEIRA, A. F.; NODREGA, J. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Asynchronous merging zones system: spectrophotometric determination

of Fe(II) and Fe(III) in pharmaceutical products. *Talanta* 49, 505-510, 1999.

OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; FERREIRA, M. M. C. Uso da análise exploratória de dados na avaliação de modificadores químicos para determinação direta e simultânea de metais em álcool combustível por GFAAS. *Ecl. Quím., São Paulo*, 31(1): 7-12, 2006

OLIVEIRA, P. L.; OLIVEIRA, M. F. Vampires, Pasteur and reactive oxygen species. Is the from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? *FEBS Letters* 525:3-6, 2002.

PACUAL-REGUERA, M. I.; ORTEGA-CARMONA, I.; MOLINA-DIAZ, A. Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta* 44:1793-1801, 1997.

PELLERANO, R. G., ORTEGA BARNALES, P.; VAZQUEZ, F. A.; DIAZ, A. M. Especiación de hierro utilizando técnica de espectrofotometria en fase sólida y análisis en flujo continuo.

PEREIRA FILHO, E. R. Análise de suspensões e materiais biológicos por espectrometria de absorção atômica: novas alternativas em atomização empregando análise quimiométrica. Tese de Doutorado, Campinas, Programa de Pós Graduação em Química – UNICAMP, 2003.

POJANAGAROON, T.; WATANESK, S.; RATTANAPHANI, V.; LIAWRUNGRATH, S. Reverse flow injection spectrophotometric determination of iron (III) using norfloxacin. *Talanta* 58, 1293-1300, 2002.

POMAZAL, K.; PROHASKA, C.; STEFFAN, I. Hydrophobic interaction chromatographic separation of proteins in human blood fractions

- hyphenated to atomic spectrometry as detector of essential elements. *Journal of Chromatography A* 960, 143-150, 2002.
- PONS, C.; FORTEZA, R.; CERDA, V. Optical fibre reflectance sensor for the determination and speciation analysis of iron in fresh and seawater samples coupled to a multisyringe flow injection system. *Analytica Chimica Acta* 528, 197-203, 2005.
- PONS, C.; FORTEZA, R.; CERDA, V. The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples. *Talanta* 66, 210-217, 2005.
- PRATA, A. S.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional *in vitro* das proteínas do soro de sangue bovino. *Ciência, tecnologia e Alimentos* 25:327-332, 2005.
- QIAO, H.; JACKSON, K.W. Mechanism of modification by palladium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Pt B*, v.46, n.14, p.1841-1859, 1991.
- RAGHUNATH, R.; TRIPATHI, R. M.; SASTRY, V. N.; KRISHNAMOORTHY, T. M. Heavy metals in maternal and cord blood. *The Science of the Total Environment* 250, 135-141, 2000.
- REBOUCHE, C. J.; WILCOX C. L.; WIDNESS, J. A. Microanalysis of non-heme iron in animal tissue. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 58:239-251, 2004.
- RINKER, A. D.; MORRISON, S. R. Quando um ferro sérico é realmente ferro sérico? Uma avaliação da situação atual dos resultados de ferro sérico. *Clinical Chemistry* 42:109-111, 1996.

- ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, 23(1): 119-125, 2000.
- ROSÁRIO, M. F.; SAVINO, V. J. M.; COELHO, A. A. D.; SILVA, M. A. N.; MARTINS, E. Uso da técnica do micro-hematócrito para predição do peso corporal e de características reprodutivas em frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31:1396-1402, 2001.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, 78, 145, 1975.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Homogeneous and heterogeneous system. Flow injection analysis today and tomorrow. *Analytica Chimica Acta*, 214, 1, 1988.
- SARRADIN, P. M.; BRIS, N. L.; GALL, C. L.; RODIER, P. Fe analysis by ferrozine method: Adaptation to FIA towards in situ analysis in hydrothermal environment. *Talanta* 66, 1131-1138, 2005.
- SILVA, A. M. Estudo da infestação de fêmeas bovinas de corte pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis*. Tese de doutorado, São Carlos, Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução – UFSCar, 2006, 144p.
- SILVA, M. S. P.; MASINI, J. C. Exploiting monisegmented flow analysis to perform in-line standard additions using a single stock standard solution in spectrophotometric sequential injection procedures. *Analytica Chimica Acta* 466, 345-352, 2002.
- SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; NEIMAN, J. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edição, Bookman, Porto Alegre, 2002.
- SRISAWANG, B.; KONGTAWELERT, P.; HARTWELL, S. K.; JAKMUNEE, J.; GRUDPAN, K. A simple flow injection-reduced

- volume column system for hemoglobin typing. *Talanta* 60:1163-1170, 2003.
- STENBERG, A.; MALINOVSKY, D.; ÖHLANDER, B.; ANDRÉN, H.; FORSLING, W.; ENGSTRÖM, L. M.; WAHLIN, A.; ENGSTRÖM, E.; RODUSHKIN, I.; BAXTER, D. C. Measurement of iron and zinc isotopes in human whole blood: Preliminary application to the study of HFE genotypes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 55-60, 2005.
- SWEILEH, J. A. On-line flow injection solid sample introduction digestion and analysis: spectrophotometric and atomic absorption determination of iron, copper and zinc in multi-vitamin tablets. *Microchemical Journal* 65, 87-95, 2000.
- SZITANYI, Z. NEMES, C.; ROZLOSNIK, N. Metallothionein and heavy metal concentration en blood. *Microchemical Journal*, 54, 246-251, 1996.
- TESFALDET, Z. O.; VAN STADEN, J. F.; STEFAN, R. I. Sequecial injection spectrophotometric determination of iron as Fe(II) in multi-vitamin preparations using 1,10-phenanthroline as complexing agent. *Talanta* 64, 1189-1195, 2004.
- TORO, M.; LEON, E.; LOPEZ, R. Haematocrit centrifugation technique for the diagnosis of the bovine trypanosomiasis. *Veterinary Parasitology* 8:23-29, 1981.
- TRIPATHI, R. M.; RAGHUNATH, R.; MAHAPATRA, S.; SADASIVAN, S. Blood lead and its effect on Cd, Cu, Zn, Fe and hemoglobin levels of children. *The Science of the Total Environment* 277, 161-168, 2001.
- TSUNODA, K. I.; ITABASHI, H.; AKAIWA, H. Application of the glass slab optical waveguide to the spectrophotometric determination of trh iron(II)-

- 1,10-phenantroline complex by flow analysis. *Analytica Chimica Acta* 299, 327-332, 1995.
- TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspect of Medicine* 25:211-220, 2004.
- VAN STADEN, J. F.; BOTHA, A. Spectrophotometric determination of thiocyanate by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 403, 279-286, 2000.
- VAN STADEN, J. F.; DU PLESSIS, H.; TALJAARD, R. E. Determination of iron(III) in pharmaceutical samples using dislysis in a sequential injection analysis system. *Analytica Chimica Acta* 357, 141-149, 1997.
- VIEIRA, D.; MENDONÇA, C. L.; KAHAYAGAWA, A.; MADRUGA, C. R.; BICUDO, L.; SCHENKI, M. A.; KESSLER, R. Avaliações da parasitemia, hematócrito e níveis enzimáticos de bezerros Nelore (*Bos indicus*), inoculados com isolados de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Noredeste e Norte do Brasil. *Ciência Animal Brasileira* 1:127-135, 2000.
- VIEIRA, H. J.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação indireta da N-acetil-L-citeína por injeção em fluxo empregando Ce(IV) e ferroína. *Química Nova* 28(05), 797-800, 2005.
- VIEIRA, M. I. B.; LEITE, R. C.; SACCO, A. M. S.; SILVA, J. G. C. Estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) e influência na estabilidade enzoótica da Babesiose Bovina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 12:139-144, (2003).
- WELZ, B.; SPERLING, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3 rd, completely rev. ed., New York: Wiley – VCH, 943 p, 1999.
- <http://www.hemoam.org.br/estudo.html>, acessado em 05/2005

www.carrapatobovino.com, acessado em 08/2006

www.flowinjection.com, acessado em 11/2006

YAVUZ, A.; AKBAS, S. H.; TUNCER, M.; KOLAGASI, O.; ÇETINKAYA, O. R.; GÜRKAN, A.; DEMIRBAS, A.; GULTEKIN, M.; AKAYDIN, M.; ERSOY, F.; YAKUPOGLU, G. Influence of Inflammation on the Relation Between Markers of Iron Deficiency in Renal Replacement Therapy. *Transplantation Proceedings* 36, 41-43, 2004.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análise em fluxo. *Quimica Nova* 22(1), 143-146, 1999.

ZAMARO, P. J. A.; HIDALGO, C. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira. *Revista Brasileira de Hematologia* 25(4), 223-229. 2003.

ZHANG, J. Z.; KELBLE, C.; MILLERO, F. J. Gas-segmented continuous flow analysis of iron in water with a long liquid waveguide capillary flow cell. *Analytica Chimica Acta* 438, 49-57, 2001.