

FATORES A SEREM CONSIDERADOS NA INTERPRETAÇÃO DE VALORES ANALÍTICOS DE FÓSFORO INORGÂNICO NO SORO SANGÜÍNEO DE BOVINOS¹

MILTON DE SOUZA DAYRELL², HENRIQUE O. DA SILVA LOPES³, IVAN B. MACHADO SAMPAIO³ e JURGEN DÖBEREINER⁴

SINOPSE.— Foi estudada a influência da temperatura e do intervalo de tempo de separação do soro após a coleta do sangue, a influência da temperatura e do tempo na conservação do soro e a influência da hemólise sobre o valor real de fósforo inorgânico no soro sangüíneo de bovinos. Através de dosagens desse elemento também no plasma e sangue total foram comparados os valores dessas análises com os encontrados no soro.

Os valores de fósforo inorgânico aumentaram significativamente quando o soro era separado depois de ter o sangue permanecido em temperatura ambiente por mais de três horas; não houve diferença significativa quando o soro era separado após o sangue ter sido mantido refrigerado até 24 horas. O teor de fósforo não sofreu influência substancial quando o soro era estocado, até 7 dias, em geladeira ou congelador, ou em temperatura ambiente com uma gota de formol p.a. para 3 ml de soro.

Hemólise leve ou moderada não interferiu no teor de fósforo inorgânico do soro, quando este foi separado até 24 horas após a coleta do sangue. O tempo de estocagem de até 7 dias não influenciou o teor de fósforo no soro com hemólise leve ou moderada, tanto no mantido em geladeira ou em temperatura ambiente com uma gota de formol p.a. para 3 ml de soro. O soro com grau de hemólise acentuada apresentou níveis de fósforo significativamente mais elevados que os demais.

O soro apresentou um teor de fósforo inorgânico significativamente mais alto do que o plasma ou sangue total, sendo as equações de regressão, respectivamente, Y (fósforo no plasma) = $-0,440 + 0,907 X$ (fósforo no soro) e Y (fósforo no soro) = $1,38 + 1,07 X$ (fósforo no sangue total).

INTRODUÇÃO

Na coleta de amostras de sangue para determinação do fósforo inorgânico no soro, plasma ou sangue total, há fatores que alteram a interpretação do resultado da dosagem. O valor de fósforo inorgânico varia de acordo com o tipo da amostra utilizada, ou seja, soro, plasma ou sangue total. Newman (1968) verificou que a concentração do fósforo inorgânico no sangue total foi aproximadamente 30% mais baixa do que aquela encontrada no plasma ou soro. Mylrea e Bayfield (1968), dosando fósforo inorgânico no sangue total e no soro de bovinos, constataram que os valores desse elemento no sangue total foram significativamente mais baixos que no soro. Little *et al.* (1971) relatam valores de fósforo inorgânico mais baixos no sangue total que no plasma.

No Brasil, uma boa parte das determinações de fósforo inorgânico no sangue de bovinos tem sido feita no soro (Dayrell *et al.* 1973, Mancuso 1972, Tokarnia *et al.*

1970). A temperatura e o intervalo de tempo de separação do soro após a coleta do sangue, a temperatura e o tempo de conservação do soro e a hemólise são fatores que podem influir no valor real do fósforo inorgânico. Há necessidade de mais informações sobre melhores métodos de coleta e mais dados que facilitem a interpretação de valores analíticos de fósforo inorgânico no soro sangüíneo de bovinos. Esses fatores e os níveis desse elemento, em relação aos valores encontrados no plasma e especialmente no sangue total, tipo de amostra usada frequentemente, inclusive nos trabalhos pioneiros sul-africanos sobre deficiência de fósforo em bovinos (Groenewald 1935, Malan *et al.* 1928, Theiler *et al.* 1927) e também por Villares e Silva (1956), foram investigados no presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo consistiu na verificação de fatores que poderiam influenciar o valor real ou a interpretação do nível de fósforo inorgânico no soro sangüíneo de bovinos.

Influência da temperatura e do tempo de separação do soro sangüíneo

Coleta de sangue. Para obtenção do soro foram coletadas, em tubos de centrifuga de fundo redondo, com 15 ml de capacidade, amostras de sangue da veia jugular de cada um de três bovinos jovens, mestiços zebu, desmamados, mantidos junto ao laboratório. A metade das amostras de cada animal foi colocada, imediatamente

¹ Aceito para publicação em 12 abr. 1973. Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq 9544/69).

² Farmacêutico-Bioquímico do Setor de Bioquímica e Hematologia do Serviço de Zoonoses, Departamento de Pesquisas e Experimentação, Fundação Zoobotânica do Distrito Federal, Cx. Postal 10-2435, Brasília, DF, e bolsista do CNPq (7262/71 e 7908/72, respectivamente).

³ Engenheiro Agrônomo da Equipe de Estatística Experimental e Análise Econômica do Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, 9.º andar, 70000 Brasília, DF, e bolsista do CNPq (14450/70).

⁴ Veterinário da Seção de Anatomia Patológica, Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, IPEACS, Km 47, 20.000 Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e bolsista do CNPq (7114/68).

te, em geladeira com temperatura de 6° C e a outra metade foi mantida em temperatura ambiente, que variou entre 25 a 30° C.

Separação do soro. O soro foi obtido por centrifugação, a aproximadamente 3.000 rpm, durante 20 minutos, após as amostras de sangue terem permanecido na geladeira ou temperatura ambiente por 30 minutos, 1 hora, 1 hora e 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas. A dosagem de fósforo sempre foi feita logo após a separação do soro.

Influência da temperatura e do tempo de conservação do soro sanguíneo

Amostras de sangue, obtidas conforme acima mencionado, foram deixadas em temperatura ambiente durante uma hora e meia e, logo após, centrifugadas separando-se os soros. Imediatamente foi feita a dosagem de fósforo inorgânico em uma amostra de soro de cada animal. Os soros restantes foram distribuídos em frascos tipo "Penicilina", 3 ml para cada frasco, e divididos em três grupos. Um grupo de amostras de cada animal foi colocado no congelador a -20° C; o outro foi guardado em geladeira a 6° C; o restante ficou em temperatura ambiente, após ter sido adicionada uma gota de formaldeído em solução p. a. Merck em cada frasco. Após 6, 12 e 24 horas e 3, 4 e 7 dias, foram feitas dosagens de fósforo inorgânico nas amostras de cada grupo de frascos.

Influência da hemólise no tempo de separação do soro sanguíneo

Coleta de sangue. Amostras de sangue foram coletadas pelo método acima mencionado, porém parte em tubos contendo 0,20 ml de água destilada (os tubos foram agitados três vezes por inversão), parte em tubos idênticos sem água destilada servindo como controles. A metade das amostras foi colocada, imediatamente, em geladeira, com temperatura de 6° C; a outra metade foi mantida em temperatura ambiente, que variou entre 22 a 32° C.

Separação do soro. Por centrifugação a 3.000 rpm durante 20 minutos, separou-se o soro das amostras mantidas em temperatura ambiente e de geladeira, nos intervalos de tempo de 1 hora e 30 minutos, 3, 6, 9, 12 e 24 horas. O soro hemolisado apresentava uma coloração que variava entre levemente alaranjada a levemente avermelhada (hemólise leve a moderada). A dosagem de fósforo sempre foi feita logo após a separação dos soros.

Influência da hemólise na conservação do soro sanguíneo

Coleta de sangue. As amostras de sangue foram coletadas como descrito acima, porém em tubos de centrifuga contendo, respectivamente, 0,20, 0,25 e 0,30 ml de água destilada.

Obtenção do soro. Depois que as amostras de sangue permaneceram em repouso durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente, separaram-se os soros por centrifugação. O soro retirado do tubo contendo 0,20 ml de água destilada apresentava hemólise em grau leve, caracterizada por uma coloração levemente alaranjada. O soro do tubo contendo 0,25 ml de água destilada apre-

sentava hemólise em grau moderado, caracterizada por uma coloração levemente avermelhada. Já o soro do tubo contendo 0,30 ml de água destilada apresentava hemólise em grau acentuado, caracterizada por uma coloração vermelha. Logo após as separações dos soros foram feitas as dosagens de fósforo. Os soros hemolisados foram distribuídos em frascos tipo "Penicilina", 3 ml para cada frasco, e divididos em dois grupos. Um grupo foi colocado em geladeira a 6° C; o outro grupo ficou em temperatura ambiente, após ter sido adicionada uma gota de formaldeído em solução p. a. Merck em cada frasco. Após 6, 12 e 24 horas e 3, 4 e 7 dias foram feitas novas dosagens de fósforo inorgânico nas amostras.

Comparação dos teores de fósforo inorgânico no soro, plasma e sangue total

Fósforo no soro e plasma sanguíneos. Foram coletadas da veia jugular de novilhos, durante um estudo realizado para determinar os níveis séricos de fósforo inorgânico em bovinos de quatro regiões do cerrado de Brasília (Dayrell *et al.*, 1973), 648 amostras de sangue para obtenção do soro e plasma. A coleta foi realizada em tubos de centrifuga de fundo redondo, com 15 ml de capacidade. Esses tubos eram deixados em temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos e então eram colocados em caixa de isopor contendo gelo picado e levados para o laboratório. Para obtenção do plasma, as amostras de sangue eram coletadas em tubos contendo solução de EDTA a 3% em salina a 0,85%. O plasma e o soro foram separados através de centrifugação, entre 4 e 6 horas após a coleta do sangue, colocados em frascos tipo "Penicilina" e estocados em congelador a -20° C para as posteriores dosagens de fósforo inorgânico.

Fósforo no soro e sangue total. Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular de 30 bovinos jovens, desmamados, em fazendas próximas a Brasília, em tubos de centrifuga de fundo redondo, com 15 ml de capacidade. Para as dosagens no sangue total as amostras foram coletadas em tubos contendo solução de EDTA a 3% em salina a 0,85%. Os tubos com as amostras foram colocados, depois de terem permanecido em repouso durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente, em caixa de isopor contendo gelo picado e levados para o laboratório. Os soros foram separados através de centrifugação entre 3 e 4 horas após a coleta do sangue. A dosagem de fósforo foi feita simultaneamente no soro e sangue total.

Dosagem de fósforo inorgânico. A dosagem de fósforo inorgânico no soro, plasma e sangue total foi realizada pelo método de Gomori (1942), com três determinações por amostra, tomando-se a média como resultado final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 mostra as médias dos valores de fósforo inorgânico no soro sanguíneo, separado em diferentes intervalos de tempo, após a coleta do sangue mantido em diferentes temperaturas. A diferença mínima significativa (dms) para comparação das médias apresentadas nesse quadro foi de 0,39. Observou-se um aumento significativo no valor de fósforo quando o soro era separado de amostras de sangue mantidas em temperatura

QUADRO 1. Fósforo inorgânico (mg%) no soro sangüíneo de bovinos, separado em vários intervalos de tempo após a coleta do sangue mantido em diferentes temperaturas (médias de 3 amostras)

Conservação	30 min.	1 h	1 h 30 min.	3 h	6 h	12 h	24 h
Ambiente	5,41	5,65	5,68	5,70	5,89	6,05	6,16
Geladeira	5,71	5,53	5,66	5,62	5,67	5,53	5,41

dms = 0,39

ambiente por mais de três horas. Não houve diferença significativa quando o sangue era refrigerado até 24 horas antes da separação do soro.

No Quadro 2, são apresentados os valores de fósforo inorgânico no soro sangüíneo conservado em temperatura ambiente, de geladeira (6°C) e de congelador (-20°C), em intervalos de 6 horas a 7 dias. A diferença mínima significativa (dms) para os valores médios desse quadro foi de 0,08. Observamos que os valores analíticos de fósforo aumentaram um pouco até 24 horas de estocagem nas diferentes temperaturas mas depois voltaram próximas aos valores originais. Tal aumento foi significativo, mas sob o ponto de vista prático, torna-se irrelevante, uma vez que a diferença atinge o valor máximo de somente 0,12 mg%. Um mesmo aumento, porém maior, quando o soro era estocado em geladeira, foi observado por Newman (1968). Esse mesmo autor verificou, ainda, que a temperatura de 32°C, até um dia, teve pouco efeito na estabilidade da concentração de fósforo inorgânico no plasma e sangue total.

O Quadro 3 apresenta os valores médios de fósforo inorgânico no soro normal e hemolisado separado, em

intervalos de 1 hora e 30 minutos até 24 horas, de amostras de sangue mantidas em temperatura ambiente e de geladeira. A diferença mínima significativa (dms) para comparar os valores existentes no quadro é 0,32. Assim sendo, quando o sangue é estocado na geladeira ou em temperatura ambiente, o teor de fósforo do soro hemolisado não apresenta diferenças significativas do soro normal, quando esse é separado até 24 horas após a coleta do sangue.

No Quadro 4, são apresentadas as médias de fósforo inorgânico nos soros com hemólise leve, moderada e acentuada, estocados em temperatura ambiente ou de geladeira, e analisados em diferentes intervalos de tempo. A diferença mínima significativa (dms) para os valores desse quadro foi de 0,31. O tempo de estocagem de até 7 dias não influenciou no teor de fósforo no soro com hemólise leve ou moderada, quando mantido em geladeira ou em temperatura ambiente com uma gota de formaldeído em solução p. a. Merck para 3 ml de soro. O soro com grau de hemólise acentuada apresentou níveis de fósforo significativamente mais elevados que os demais. Esse último grau de hemólise ocorre raramente nas coletas de sangue.

QUADRO 2. Fósforo inorgânico (mg%) no soro sangüíneo de bovinos, conservado por diversos períodos em diferentes temperaturas (médias de 3 amostras)

Conservação	Dosagem inicial	6 h	12 h	24 h	3 dias	4 dias	7 dias
Ambiente	4,79	4,80	4,80	4,89	4,84	4,79	4,83
Geladeira	4,79	4,85	4,80	4,85	4,83	4,75	4,72
Congelador	4,79	4,88	4,91	4,89	4,84	4,75	4,75

dms = 0,08

QUADRO 3. Fósforo inorgânico (mg%) no soro sangüíneo normal e hemolisado, separado em vários intervalos de tempo após a coleta do sangue mantido em diferentes temperaturas (médias de 3 amostras)

Conservação	1 h 30 min.	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
<i>Ambiente</i>						
Soro normal	5,96	6,01	6,00	6,22	6,32	6,42
Soro hemolisado	5,93	6,02	5,99	6,12	6,19	6,31
<i>Geladeira</i>						
Soro normal	5,83	5,83	5,89	5,93	5,98	6,00
Soro hemolisado	5,95	5,95	6,04	6,09	5,94	6,09

dms = 0,32

QUADRO 4. Fósforo inorgânico (mg%) no soro sanguíneo com diferentes graus de hemólise, conservado por vários períodos de tempo em temperatura ambiente e de geladeira. (médias de 3 amostras)

Conservação	Dosagem inicial	6 h	12 h	24 h	3 dias	4 dias	7 dias
<i>Ambiente</i>							
Hemólise leve	6,32	6,37	6,34	6,32	6,36	6,37	6,34
Hemólise moderada	6,27	6,34	6,36	6,29	6,35	6,29	6,27
Hemólise acentuada	6,67	6,60	6,65	6,58	6,68	6,66	6,60
<i>Geladeira</i>							
Hemólise leve	6,32	6,37	6,37	6,30	6,36	6,36	6,34
Hemólise moderada	6,27	6,40	6,38	6,33	6,33	6,28	6,28
Hemólise acentuada	6,67	6,64	6,59	6,63	6,68	6,55	6,62

dms = 0,31

O estudo da relação entre os teores de fósforo no soro e plasma das 648 amostras analisadas, conduziu-nos à equação Y (fósforo no plasma) = $-0,440 + 0,970 X$ (fósforo no soro), com valor de $R = 0,98$. O teor de fósforo no plasma foi sempre menor que o do soro. Isto é evidenciado pelo valor decimal do coeficiente de regressão, além do valor negativo de a .

O Quadro 5 mostra os valores de fósforo inorgânico no sangue total e soro de 30 bovinos. A relação do fósforo destes dois tipos de amostra é expressada pela

QUADRO 5. Fósforo inorgânico (mg%) no sangue total e soro de 30 bovinos

Sangue total	Soro
3,14	4,43
3,46	4,98
3,59	5,04
3,65	5,27
3,67	4,94
3,80	5,91
3,90	5,69
3,92	6,12
3,97	5,23
4,00	5,67
4,22	6,12
4,43	6,46
4,47	6,18
4,54	6,76
4,58	5,27
4,62	6,58
4,64	5,91
4,83	6,43
5,06	7,03
5,13	7,34
5,23	7,17
5,25	7,32
5,27	7,07
5,36	7,17
5,51	7,28
5,63	7,57
5,72	7,36
5,91	7,36
6,33	7,91
7,17	8,90

equação Y (fósforo no soro) = $1,38 + 1,07 X$ (fósforo no sangue total), com $R = 0,95$. Mylrea e Bayfield (1968), estudando essa relação, encontraram a equação $Y = 0,46 + 1,25 X$, com $r = 0,9$, porém achando que a análise provavelmente determinou diferentes componentes fosfóricos nos dois tipos de amostras.

CONCLUSÕES

Na coleta de amostras de sangue para determinação de níveis de fósforo inorgânico no soro, deve-se separar o mesmo até 3 horas, quando não houver possibilidade de refrigeração do sangue. Quando o sangue é colocado em geladeira logo após a coleta, o soro pode ser separado até 24 horas, sem que haja interferência no valor real do fósforo.

As amostras de soro sanguíneo puderam ficar fora da geladeira, sem que houvesse interferência substancial no teor de fósforo inorgânico, até uma semana, quando foi adicionada, como conservador, uma gota de formol p. a. para 3 ml de soro. Na geladeira, as amostras de soro puderam ser mantidas, sem adição de conservador, até uma semana, sem que houvesse aumento do fósforo inorgânico.

Quando comparadas com soro normal, as hemólises leve e moderada não influenciaram o teor de fósforo. Portanto, exceto no caso de hemólise acentuada, para soro hemolisado podemos seguir o mesmo procedimento utilizado para soro sem hemólise.

O valor de fósforo inorgânico no plasma é mais baixo que no soro. Para uma conversão aproximada dos valores desse elemento no soro para valores no plasma, pode-se utilizar a equação Y (fósforo no plasma) = $-0,440 + 0,970 X$ (fósforo no soro).

O valor de fósforo inorgânico no soro é mais alto do que no sangue total. Para conversão aproximada dos valores de fósforo inorgânico no soro para os valores no sangue total, pode-se empregar a equação Y (fósforo no soro) = $1,38 + 1,07 X$ (fósforo no sangue total).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Drs. Jorge Almeida Guimarães, do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo, e Carlos Hubinger Tokarnia, da Seção de Anatomia Patológica do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, pelas sugestões dadas no presente trabalho, e aos Drs. Rômulo Cerqueira Leite, Chefe do Serviço de Zoonoses do Departamento de Pesquisas e Experimentação (DPE) da Fundação Zoobotânica do Distrito Federal (FZDF), e Ney Neves Soares, Diretor do DPE da FZDF, pelo apoio prestado.

REFERÊNCIAS

- Dayrell, M. de S., Döbereiner, J. & Tokarnia, C. H. 1973. Deficiência de fósforo em bovinos na região de Brasília. *Pesq. agropec. bras.*, Sér. Vet., 8:105-114.
- Gomori, G. 1942. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. lab. clin. Med.* 27:955-996.
- Greenwald, J. W. 1935. The influence of rations low in certain minerals on the composition of the blood and milk of cows, and on the blood of their progeny. *Onderstepoort J. vet. Sci. Anim. Ind.* 4(1):94-164.
- Little, D. A., Robinson, P. J., Playne, M. J. & Haydock, K. P. 1971. Factors affecting blood inorganic phosphorus determination in cattle. *Aust. vet. J.* 47:153-156.
- Malan, A. I., Green, H. H. & Du Toit, P. J. 1928. Studies in mineral metabolism. V. Composition of bovine blood on phosphorus deficient pasture. *J. agric. Sci.* 18(3):376-386.
- Mancuso, P. C. 1972. Níveis de cálcio, fósforo e magnésio em soro de bovinos do Rio Grande do Sul. I. Guaíba, Livramento, Rio Pardo, Santa Antônio da Patrulha, São Francisco de Paula e São Gabriel. *Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 1:11-20.
- Mylrea, P. J. & Bayfield, R. F. 1968. Concentrations of some components in the blood and serum of apparently healthy dairy cattle. I. Electrolytes and minerals. *Aust. vet. J.* 44: 565-569.
- Newman, D. M. R. 1968. The preservation of bovine blood for the determination of inorganic phosphate. *Aust. vet. J.* 44: 443-446.
- Theiler, A., Green, H. H. & Du Toit, P. J. 1927. Minimum mineral requirements in cattle. *J. agric. Sci.* 17:291-314.
- Tokarnia, C. H., Canella, C. F. C., Guimarães, J. A., Döbereiner, J. & Langenegger, J. 1970. Deficiência de fósforo em bovinos no Piauí. *Pesq. agropec. bras.* 5:483-494.
- Villares, J. B. & Silva, H. M. T. 1956. Contribuição para o estudo das carências minerais em bovinos no Estado de São Paulo. *Bolm Ind. Anim. S. Paulo*. 15:5-22.

ABSTRACT.- Dayrell, M. de S.; Lopes, H. O. da S.; Sampaio, I. B. M.; Döbereiner, J. [*Factors to be considered in the interpretation of inorganic phosphorus values in the blood serum of bovines.*]. Fatores a serem considerados na interpretação de valores analíticos de fósforo inorgânico no soro sangüíneo de bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1973) 8, 43-47 [Pt. en] Fundação Zoobotânica do Distrito Federal, Caixa Postal 10-2435, Brasília, DF, Brazil.

The factors studied included 1) the effects of temperature after collection on the blood sample, 2) the time interval between collection and separation of serum, 3) the effect of storage at room temperature and in refrigeration for differing periods of time, and 4) influence of different degrees of haemolysis on the inorganic phosphorus level. Inorganic phosphorus was also determined in plasma and whole blood, and the values were compared with those found in the serum.

The inorganic phosphorus values were elevated significantly when the serum was separated after the blood had remained at room temperature for more than 3 hours; there was no significant difference when the serum was separated after the blood had been refrigerated for up to 24 hours. The phosphorus values were not altered when the serum was kept up to 7 days in the refrigerator, deep freezer, or at room temperature with one drop of formalin for each 3 ml of serum.

Slight or moderate haemolysis did not influence the serum inorganic phosphorus values, when the serum was separated within 24 hours after the collection of the blood. When serum with slight or moderate haemolysis was examined there was no difference because of storage for 7 days, of storage in the refrigerator or storage at room temperature with formalin. Serum with severe haemolysis had significantly higher phosphorus values following all three types of storage.

Inorganic phosphorus estimation in the serum gave significantly higher values than those from plasma or whole blood, with a regression coefficient of Y (phosphorus of plasma) = $-0.44 + 0.907 X$ (phosphorus of serum) and Y (phosphorus of serum) = $1.38 + 1.07 X$ (phosphorus of whole blood).