

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CLAUBER POLESE**

**INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA, DO JEJUM PRÉ-COLHEITA E DO  
TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO SORO E  
PLASMA DE FRANGOS DE CORTE**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CLAUBER POLESE**

**INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA, DO JEJUM PRÉ-COLHEITA E DO  
TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO SORO E  
PLASMA DE FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cinthia Eyng

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2022**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Polese, Clauber

Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte / Clauber Polese; orientador Ricardo Vianna Nunes; coorientadora Cinthia Eyng. -- Marechal Cândido Rondon, 2022.

103 p.

Tese (Doutorado Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2022.

1. Frangos de corte. 2. Bioquímica sanguínea. 3. Armazenamento. 4. Metabólitos. I. Nunes, Ricardo Vianna, orient. II. Eyng, Cinthia, coorient. III. Título.

## **CLAUBER POLESE**

### **Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Doutor em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Não-Ruminantes”, APROVADO pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador / Presidente – Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cinthia Eyng  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Prof. Dr. Bruno Serpa Vieira  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso (IFMT)  
*Campus* Alta Floresta

Membro – Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilene Machado Silva  
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina

Membro – Prof. Ph.D. Charles William Starkey  
Auburn University

Membro – Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Marechal Cândido Rondon, 2 de março de 2022.

---



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE  
TESE DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR  
VIDEOCONFERÊNCIA**

Eu, **Prof. Dr. RICARDO VIANNA NUNES**, declaro como **ORIENTADOR** que presidi os trabalhos de defesa à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Clauber Polese**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da Banca Examinadora, **formalizo como Orientador**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da Banca Examinadora de que o candidato foi considerado **APROVADO** na banca realizada em 02/03/2022, com o trabalho intitulado **"Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

**Prof. Dr. RICARDO VIANNA NUNES** – ORIENTADOR/PRESIDENTE

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus de Mal. Cândido Rondon*



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE  
DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR  
VIDEOCONFERÊNCIA**

Eu, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cinthia Eyng**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Clauber Polese**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Interno**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado APROVADO na banca realizada em 02/03/2022, com o trabalho intitulado **"Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

*Cinthia Eyng*

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cinthia Eyng**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Mal. Cândido Rondon  
Centro de Ciências Agrárias



Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

#### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Bruno Serpa Vieira**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Clauber Polese**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado APROVADO na banca realizada em 02/03/2022, com o trabalho intitulado **"Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Nada mais a declarar.

**Prof. Dr. Bruno Serpa Vieira**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT) -  
Campus Alta Floresta





Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

#### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilene Machado Silva**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Clauber Polese**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado APROVADO na banca realizada em 02/03/2022, com o trabalho intitulado **"Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilene Machado Silva**  
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina





**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DECLARATION AND OPINION OF PARTICIPATION IN A DOCTORAL DEFENSE  
EXAMINATING BOARD CARRIED OUT AT DISTANCE, IN A SYNCHRONOUS WAY, BY  
VIDEOCONFERENCE**

I, **Prof. Ph.D. Charles William Starkey**, declare that I have participated remotely, synchronously and by videoconference, from the Thesis Defense Examining Board of candidate **Clauber Polese**, PhD student of this Postgraduate Program.

Considering the work delivered, presented and the argument carried out, I formalize as an External Member, for the purposes of registration, through this statement, my decision that the candidate can be considered APPROVED in the panel held on 03/02/2022, with the work entitled "**Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

I approve of Clauber Polese receiving his doctoral degree. Clauber clearly understands his field of study. He works very hard and is an asset to this field of science. My only comments are that he finish revisions and get his manuscripts published.

*Charles Starkey*

**Prof. Ph.D. Charles William Starkey**  
Auburn University – Poultry Science Dept.



**Unioeste**  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Clauber Polese**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado APROVADO na banca realizada em 02/03/2022, com o trabalho intitulado **"Influência da intensidade luminosa, do jejum pré-colheita e do tempo de estocagem sobre parâmetros bioquímicos no soro e plasma de frangos de corte"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

**Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha**  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

## Agradecimentos

A Deus, àquele que me concedeu o dom da vida, me permitindo chegar até aqui;

A minha família pela ajuda e incentivo nunca me deixando desanimar diante das dificuldades;

Em especial a minha esposa Míriam Noetzold, pelo amor, carinho, apoio e compreensão sendo sempre meu alicerce nos momentos difíceis;

A minha filha Letícia Noetzold Polese que muitas vezes sem entender dizia “*papai deixa isso vem brincar comigo*”, com certeza fonte de inspiração para continuar adiante;

Ao meu orientador professor Dr. Ricardo Vianna Nunes, pela amizade, compreensão, paciência, pelas oportunidades oferecidas, e por sua imensa contribuição para minha formação profissional, intelectual e humana;

A minha Co-orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Cinthia Eyng, pela amizade, auxílio e atenção dispensada;

Ao grupo de estudos em avicultura (GEMADA), pelas trocas de experiências e pelos bons momentos compartilhados durante a realização deste curso, contribuindo com minha formação acadêmica;

A todos os integrantes do grupo de estudos (GEMADA) em especial a Nilton Rohloff Júnior pelo auxílio nas análises estatísticas e a todos os demais: Jomara Broch, Lucas Wachholz, Cleison de Soza, Jessica Lima Damasceno, Edinan Hagdon Cirilo, Guilherme Luis Silva Tesser, André Sanches de Ávila, Karine Isabela Tenório, Vaneila Lenhart Savaris, Felipe Poténza Campos, Daniela Benachio Jablonski, Ana Paula Guimarães Cruz Costa, Tânia Luiza Kohler, Matheus Henrique Zanelato, Cristine Kaufmann, Nathanael Cesar Costa, Lidiane Datsch e a todos aqueles que por ventura não foram mencionados mas que fizeram parte desta equipe durante os anos de realização do Doutorado;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de realização deste curso proporcionando ensino gratuito e de qualidade;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, por seus ensinamentos, contribuindo como fonte do saber;

Ao assistente administrativo do programa de pós-graduação em Zootecnia, Paulo Henrique Morsch pelo excelente trabalho prestado, estando de prontidão para auxiliar a nós discentes;

A todos os funcionários do Núcleo de Estações Experimentais da Unioeste em especial o Emerson Schimidt;

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e Fundação Araucária pela concessão de Bolsa permitindo a conclusão deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

# **INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA, DO JEJUM PRÉ-COLHEITA E DO TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO SORO E PLASMA DE FRANGOS DE CORTE.**

## **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da intensidade luminosa (5 e 20 lux), do tempo de jejum, que as aves foram submetidas e tempo de estocagem a -20 °C de amostras de soro e plasma (fluoreto de sódio + EDTA K<sub>3</sub>), sobre as concentrações de proteínas totais, albumina, globulina, ácido úrico, creatinina, cálcio, fósforo e atividade da enzima fosfatase alcalina, em frangos de corte aos 45 dias de idade. Para tanto, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, foram utilizados 70 frangos, machos, da linhagem Cobb 500 com 45 dias de idade, em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 7 x 3, submetidos a colheitas de sangue após 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de jejum, sendo as análises no soro e plasma realizadas no tempo 0 e após 30 e 60 dias de armazenamento a -20 °C. Não houve efeito dos tempos de jejum e tempos de estocagem sobre as concentrações séricas e plasmáticas de proteínas totais, albumina e globulina. Quando aplicado regressão, creatinina e fosfatase alcalina apresentaram efeito quadrático, com máxima concentração de 0,208 mg dL<sup>-1</sup> com 4 horas e 32 minutos de jejum e fosfatase alcalina com valor mínimo de 2933 mg dL<sup>-1</sup> com 8 horas de jejum. No plasma, proteínas totais, albumina, e creatinina apresentaram efeito quadrático para tempo de jejum, valor máximo de 35,46 g L<sup>-1</sup> com 7 horas e 48 minutos para proteínas totais, 15,36 g L<sup>-1</sup> com 10 horas e 48 minutos para albumina, 0,18 mg dL<sup>-1</sup> com 7 horas e 46 minutos para creatinina. Para as análises de proteínas totais, albumina e globulinas, podem ser utilizadas ambas as frações soro e plasma e 12 horas de jejum e as amostras podem ser armazenadas por até 60 dias a -20 °C. Para as análises de ácido úrico, podem ser utilizadas ambas as frações soro ou plasma e 12 horas de jejum, porém recomenda-se a análise logo após a colheita. Recomenda-se a utilização do soro para análise de creatinina e atividade da fosfatase alcalina, com armazenamento de 30 dias a -20 °C. O plasma para análise da atividade da fosfatase alcalina pode ser armazenado por até 60 dias a -20 °C. No segundo experimento foram utilizados 140 frangos, machos, da linhagem Cobb 500 com 45 dias de idade, em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 7 x 5 x 3, separados em dois ambientes de intensidade luminosa (5 e 20 lux) e realizado colheita de sangue em 10 aves de cada ambiente e em cada período de jejum (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas). As amostras de soro e plasma foram armazenadas a -20 °C por 0, 15, 30, 60 e 120 dias, sendo realizadas as análises

bioquímicas após estes períodos. Houve efeito linear do tempo de jejum sobre a albumina com decréscimo de  $0,097 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto fosfatase alcalina aumentou sua atividade sérica em  $38,55 \text{ IU L}^{-1}$  a cada hora de jejum. Houve ainda efeito tanto quadrático como cúbico para ácido úrico, proteínas totais, globulina e creatinina e ainda efeito linear e cúbico para cálcio. Para o ácido úrico mínima concentração de  $2,20 \text{ mg dL}^{-1}$  foi obtida com 04 horas e 51 minutos de jejum. Proteínas totais teve máxima concentração sérica pelo modelo quadrático de regressão de  $36,18 \text{ g L}^{-1}$  com 04 horas e 30 minutos de jejum, globulina com máxima concentração de  $31,03 \text{ g L}^{-1}$  com 06 horas de jejum. A creatinina teve máxima concentração de  $0,182 \text{ mg dL}^{-1}$  com 5 horas e 15 minutos de jejum. O modelo linear para cálcio estimou redução de sua concentração em  $0,09 \text{ mg dL}^{-1}$  a cada hora de jejum. A análise de regressão indicou aumento linear dos níveis séricos de ácido úrico, proteínas totais e globulina à medida que se aumentou o tempo de estocagem. Pelo modelo quadrático de regressão, a creatinina teve máxima concentração no soro de  $0,184 \text{ mg dL}^{-1}$  aos 42 dias de armazenamento, cálcio e fósforo apresentaram pontos de mínima concentração aos 82 dias e 119 dias de armazenamento, com  $6,63 \text{ mg dL}^{-1}$  e  $7,17 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectivamente. No plasma, houve efeito quadrático para ácido úrico, cálcio e fósforo com mínima de  $2,08 \text{ mg dL}^{-1}$ ,  $1,77 \text{ mg dL}^{-1}$  e  $5,03 \text{ mg dL}^{-1}$ , com 3 horas e 48 minutos, 5 horas e 45 minutos e 30 minutos de jejum, respectivamente. O modelo linear indicou redução da atividade plasmática da fosfatase alcalina em  $24,92 \text{ IU L}^{-1}$  a cada hora de jejum. Globulina e fosfatase alcalina apresentaram aumento de concentração de  $0,0097 \text{ g L}^{-1}$  e  $2,76 \text{ UI L}^{-1}$  a cada dia de estocagem, contrariamente a creatinina teve decréscimo de  $0,00018 \text{ mg dL}^{-1}$ . Ácido úrico e fósforo apresentaram máxima concentração de  $2,64 \text{ mg dL}^{-1}$  e  $5,47 \text{ mg dL}^{-1}$  aos 101 e 62 dias de estocagem, respectivamente. Para análise de proteínas totais ambas as frações podem ser utilizadas. O plasma pode ser armazenado por até 120 dias, para a fração soro recomenda-se estocagem por até 60 dias a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os modelos de regressão quadrático estimaram 6 e 7 horas de jejum para o soro e para o plasma, respectivamente. Podem ser utilizadas ambas as frações soro ou plasma para mensurar ácido úrico e creatinina, porém recomenda-se a análise imediata após a colheita da amostra. As concentrações séricas e plasmáticas de fósforo não foram afetadas pelo tempo de armazenamento, e as amostras podem ser armazenadas por até 120 dias. Com exceção da creatinina e cálcio plasmático as demais variáveis apresentaram maior concentração quando da utilização de 5 lux, tanto no soro como no plasma. Não recomenda-se a utilização do anticoagulante ETDA para a dosagem de cálcio e atividade de fosfatase alcalina.

**Palavras-chave:** bioquímica sanguínea, soro, plasma, armazenamento, metabólitos

# **INFLUENCE OF LIGHT INTENSITY, PRE-HARVEST FASTING AND STORAGE TIME ON BIOCHEMICAL PARAMETERS IN THE SERUM AND PLASMA OF BROILER CHICKENS**

## **Abstract**

The objective of this work was to evaluate the effect of the light intensity (5 and 20 lux), the fasting time, to which the birds were submitted and the storage time at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  of serum and plasma samples (sodium fluoride + EDTA  $\text{K}_3$ ), on the concentrations of total proteins, albumin, globulin, uric acid, creatinine, calcium, phosphorus and alkaline phosphatase enzyme activity in broilers at 45 days of age. For that, two experiments were carried out. In the first one, 70 male Cobb 500 broilers at 45 days of age were used in a completely randomized design in a  $2 \times 7 \times 3$  factorial scheme, submitted to blood samples after 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours of fasting, with serum and plasma analyzes performed at time 0 and after 30 and 60 days of storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . There was no effect of fasting times and storage times on serum and plasma concentrations of total proteins, albumin and globulin. When applied regression, creatinine and alkaline phosphatase showed a quadratic effect, with a maximum concentration of  $0.208\text{ mg dL}^{-1}$  with 4 hours and 32 minutes of fasting and alkaline phosphatase with a minimum value of  $2933.31\text{ mg dL}^{-1}$  with 8 hours of fasting. In plasma, total proteins, albumin, and creatinine showed a quadratic effect for fasting time, maximum value of  $35.46\text{ g L}^{-1}$  at 7 hours and 48 minutes for total proteins,  $15.36\text{ g L}^{-1}$  at 10 hours and 48 minutes for albumin,  $0.18\text{ mg dL}^{-1}$  with 7 hours and 46 minutes for creatinine. For the analysis of total proteins, albumin and globulins, both serum and plasma fractions and 12 hours of fasting can be used and the samples can be stored for up to 60 days at  $-20^{\circ}\text{C}$ . For uric acid analyses, both serum or plasma fractions and 12 hours of fasting can be used, but analysis immediately after collection is recommended. It is recommended to use serum for analysis of creatinine and alkaline phosphatase activity, with storage for 30 days at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Plasma for analysis of alkaline phosphatase activity can be stored for up to 60 days at  $-20^{\circ}\text{C}$ . In the second experiment, 140 male 45-day-old Cobb 500 broilers were used in a completely randomized design in a  $2 \times 7 \times 5 \times 3$  factorial scheme, separated into two environments of light intensity (5 and 20 lux). Blood samples were collected from 10 birds from each environment and at each fasting period (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours). Serum and plasma samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 0, 15, 30, 60 and 120 days, and biochemical analyzes were performed after these periods. There was a linear effect of fasting time on albumin with a decrease of  $0.097\text{ g L}^{-1}$ , while alkaline phosphatase increased its serum activity by  $38.55\text{ IU L}^{-1}$  for each hour of fasting. There was also both quadratic and cubic effects for uric acid, total proteins, globulin and creatinine, as well as linear and cubic effects for calcium. For uric acid, a minimum concentration of  $2.20\text{ mg dL}^{-1}$  was obtained after 4 hours and 51 minutes of fasting. Total proteins had maximum serum concentration by the quadratic



regression model of  $36.18 \text{ g L}^{-1}$  with 04 hours and 30 minutes of fasting, globulin with maximum concentration of  $31.03 \text{ g L}^{-1}$  with 06 hours of fasting. Creatinine had a maximum concentration of  $0.182 \text{ mg dL}^{-1}$  with 5 hours and 15 minutes of fasting. The linear model for calcium estimated a reduction in its concentration by  $0.09 \text{ mg dL}^{-1}$  for each hour of fasting.

Regression analysis indicated a linear increase in serum levels of uric acid, total proteins and globulin as storage time increased. By the quadratic regression model, creatinine had a maximum concentration in serum of  $0.184 \text{ mg dL}^{-1}$  at 42 days of storage, calcium and phosphorus showed minimum concentration points at 82 days and 119 days of storage, with  $6.63 \text{ mg dL}^{-1}$  and  $7.17 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectively. In plasma, there was a quadratic effect for uric acid, calcium and phosphorus with a minimum of  $2.08 \text{ mg dL}^{-1}$ ,  $1.77 \text{ mg dL}^{-1}$  and  $5.03 \text{ mg dL}^{-1}$ , with 3 hours and 48 minutes, 5 hours and 45 minutes and 30 minutes of fasting, respectively. The linear model indicated a reduction in plasma alkaline phosphatase activity by  $24.92 \text{ IU L}^{-1}$  for each hour of fasting. Globulin and alkaline phosphatase showed a concentration increase of  $0.0097 \text{ g L}^{-1}$  and  $2.76 \text{ IU L}^{-1}$  for each day of storage, in contrast to creatinine, which decreased by  $0.00018 \text{ mg dL}^{-1}$ . Uric acid and phosphorus showed maximum concentrations of  $2.64 \text{ mg dL}^{-1}$  and  $5.47 \text{ mg dL}^{-1}$  at 101 and 62 days of storage, respectively. For analysis of total proteins both fractions can be used. Plasma can be stored for up to 120 days, for the serum fraction storage for up to 60 days at  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  is recommended. The quadratic regression models estimated 6 and 7 hours of fasting for serum and plasma, respectively. Both serum and plasma fractions can be used to measure uric acid and creatinine, but analysis is recommended immediately after sample collection. Serum and plasma phosphorus concentrations were not affected by storage time, and samples can be stored for up to 120 days. With the exception of creatinine and plasma calcium, the other variables showed higher concentrations when using 5 lux, both in serum and plasma. It is not recommended to use the anticoagulant ETDA for the measurement of calcium and alkaline phosphatase activity.

**Key words:** blood biochemistry, serum, plasma, storage, metabolites

## Sumário

INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1 Tecido sanguíneo .....	13
2.2 Fração sanguínea soro e plasma.....	15
2.3 Importância dos Anticoagulantes na Bioquímica Sanguínea.....	16
2.4 Influência do jejum sobre os parâmetros sanguíneos .....	20
2.5 Estocagem das amostras .....	22
2.6 Intensidade de luz e seus efeitos no metabolismo de frangos de corte .....	25
2.7 Parâmetros Bioquímicos .....	26
2.7.1 Proteínas totais .....	26
2.7.2 Albumina.....	27
2.7.3 Creatinina .....	30
2.7.4 Ácido úrico.....	30
2.7.5 Fosfatase alcalina .....	31
2.8 Referências.....	33
3 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE JEJUM E DE ESTOCAGEM SOBRE INDICADORES BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS EM FRANGOS DE CORTE.....	42
3.1 Introdução .....	44
3.2 Material e Métodos .....	47
3.3 Resultados.....	49
3.4 Discussão .....	55
3.5 Conclusão.....	60
3.6 Referências.....	61
4 INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA, DO JEJUM PRÉ-COLHEITA E DO TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SORO E PLASMA DE FRANGOS DE CORTE.....	66
4.1 Introdução .....	70
4.2 Material e Métodos .....	72
4.3 Resultados.....	75
4.4 Discussão .....	87
4.5 Conclusão.....	94
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95
6. Referências .....	96

## INTRODUÇÃO

O sangue é o fluído do sistema cardiovascular. Porém não se trata de um fluído puro, mas sim composto por uma série de partículas suspensas em uma base fluída. O plasma é constituído em 90% de água e 1% de eletrólitos e as demais moléculas como proteínas, globulinas, albumina e fibrinogênio constituem o restante dessa fração. Os eletrólitos desempenham papel importante no sangue e são eles que garantem a quantidade correta de fluído intra e extracelular (HOSKINS et al., 2017).

As concentrações de certos analitos no sangue podem refletir a capacidade do corpo em manter a homeostase de processos metabólicos. Neste sentido, a aplicação de análises bioquímicas é uma ferramenta não somente para fins clínicos, mas também como indicador do estado fisiológico dos animais (VILA, 2013).

Procedimentos de colheita, bem como de conservação e, se necessário, armazenamento de amostras sanguíneas são fundamentais para alcançar resultados confiáveis (Cray & Zaias, 2004). Certos parâmetros bioquímicos analisados, podem sofrer alterações pelo modo como é realizada a colheita, a manipulação e o transporte das amostras. Portanto, o aprimoramento e a padronização destes procedimentos são fundamentais para garantir a confiabilidade dos resultados (DONELEY, 2011).

Análises bioquímicas podem ser feitas tanto no plasma como no soro. Após a centrifugação da amostra o soro ou plasma ocupa a parte superior da coluna formada no tubo de colheita, compondo a parte líquida do sangue onde muitas substâncias encontram-se dissolvidas (DUKES, 2017). A determinação laboratorial dos parâmetros bioquímicos presentes no soro ou plasma são importantes principalmente na bioquímica clínica (MURRAY et al., 2009).

O plasma difere do soro em alguns aspectos, pois tem maior viscosidade e teor de proteínas totais, visto que no plasma estão presentes o fibrinogênio e fatores de coagulação. Quando da utilização do plasma deve-se ter o cuidado na escolha do anticoagulante, este deve estar alinhado com qual analito será avaliado. Portanto, denomina-se plasma a parte líquida acelular do sangue, obtido com a utilização de anticoagulante (LADERSON et al., 1974; HORTIN, 2006).

Para a maioria das análises bioquímicas é recomendada a obtenção de amostras após um período de jejum, pois amostras colhidas em momentos pós-prandial podem apresentar elevação nos valores de alguns compostos como ácido úrico e formação de lipemia (plasma

turvo). Este período não está totalmente definido, podendo variar em função da espécie, podendo ser de 12 a 24 horas (HARR, 2002).

Em termos práticos nem sempre é possível estabelecer o real período de jejum em aves, em função de sua fisiologia digestiva própria, pois possuem papo para armazenamento de alimento (CAPITELLI & CROSTA, 2013). No entanto, na produção de frangos de corte, as práticas de manejo possibilitam estimar o tempo de jejum de modo mais adequado, fazendo-se a retirada da alimentação sólida mantendo-se a água.

Na clínica humana, Lima-Oliveira et al. (2012) observaram aumento das concentrações plasmáticas de ácido úrico, proteínas totais, albumina e creatinina após pacientes receberem uma refeição leve, no entanto, o aumento observado não foi de importância clínica. No caso da albumina esta manteve maior concentração até quatro horas após a refeição, pois a ingestão de alimento estimula a síntese de albumina no fígado. A albumina é uma molécula transportadora na corrente sanguínea, que pode levar ao aumento nos níveis de aminoácidos circulantes o que pode interferir no resultado de proteínas totais e da própria albumina.

Fang et al. (2014) avaliaram tempos de jejum de 24 e 48 horas e realimentação por 24 horas das aves submetidas a 48 horas de jejum. Não observaram diferença nos níveis de proteínas totais em relação ao grupo sem jejum e entre os dois tempos de jejum, porém foi observada menor concentração de proteínas totais, albumina e ácido úrico no grupo das aves realimentadas.

Contudo, é importante destacar a falta de valores de referência para diversos parâmetros bioquímicos em espécies aviárias (DONELEY, 2011; TANG et al., 2013). Na área clínica, principalmente, é comum utilizar valores de referência baseados na literatura, no entanto, muitas vezes foram obtidos com um número reduzido de amostras, fato que justifica o estabelecimento de valores de referência para frangos de corte.

A refrigeração ou congelamento das amostras até o momento da análise tem sido empregada como solução para o armazenamento a fim de garantir sua preservação (IALONGO, 2017). Para Russel e Russel (2007), a maioria dos analitos sanguíneos são estáveis a 4 °C por até 36 horas, porém quando a análise é realizada após tempo maior, a estocagem a -20 °C torna-se necessária.

Para armazenamento de curto prazo (24 horas) recomenda-se a rápida centrifugação seguida de refrigeração a 4 °C. Para longo prazo como meses ou anos, o congelamento a -20 °C ou -80 °C se mostra confiável na preservação das amostras (JANSEN et al., 2013b).

Cuhadar et al. (2013), avaliaram a estabilidade de vários parâmetros sanguíneos na medicina humana, em amostras estocadas por três meses e submetidas a dez ciclos de

descongelamento. A albumina apresentou estabilidade até o sétimo ciclo de descongelamento, e foi estável durante os três meses de estocagem. Também apresentaram estabilidade a estocagem em suas concentrações os parâmetros de proteínas totais e cálcio. A creatinina apresentou comportamento instável com diminuição de sua concentração até o sétimo ciclo de descongelamento. O ácido úrico apresentou comportamento semelhante ao da creatinina. Esta instabilidade para creatinina e ácido úrico também foi observada por Nunes et al. (2018).

A intensidade luminosa é um importante fator que compõe o microclima nas instalações avícolas. A utilização de programas de luz, incluindo intensidade e fotoperíodo é largamente utilizada na produção avícola. O manejo da intensidade luminosa permite controlar a produção e o bem-estar das aves através de mecanismos comportamentais ou fisiológicos (Alvino et al., 2009; Deep et al., 2013).

A redução na intensidade da luz faz com que as aves apresentem comportamento mais calmo e, com a diminuição do estresse, é possível melhorar a produtividade (Carvalho et al., 2015). Fidan et al. (2017) avaliaram o efeito da intensidade luminosa em frangos de corte, para tanto, dividiram as aves em dois grupos (2,5; 5 e 12,5 lux) versus 20 lux, e observaram aumento nas concentrações de parâmetros bioquímicos da via glicolítica, entre eles triglicerídeos e colesterol, com as aves expostas a menor intensidade de luz.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de intensidades de luz (5 e 20 lux), intervalo de jejum e tempos de armazenamento a -20 °C sobre parâmetros bioquímicos nas diferentes frações do sangue soro e plasma de frangos de corte.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tecido sanguíneo

O sangue, fluído circulante do sistema cardiovascular, possui em suspensão de várias partículas: células, fragmentos celulares e macromoléculas em uma base fluida. Estas partículas têm influência direta sobre a dinâmica do fluxo sanguíneo principalmente no que se refere a este fluído como meio de transporte (HOSKINS & HARDMAN, 2017).

O sangue é um tipo especial de tecido conjuntivo originado pelo tecido hematopoiético, produzido na medula óssea, localizada nos ossos longos, ossos da região pélvica e no esterno. Apresenta-se na forma líquida e tem como função o transporte de nutrientes, gases, hormônios, eletrólitos, células de defesa e diversas substâncias pelo organismo, também exerce importante função na manutenção da temperatura corporal (GAYTON & HALL, 2006).

Este tecido é constituído por células sanguíneas denominadas eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), plaquetas, relacionadas a fatores de coagulação e leucócitos (glóbulos brancos), nas aves, estes últimos se dividem em basófilos, linfócitos, monócitos, heterófilos e eosinófilos (SCANES, 2014).

Diferentemente dos mamíferos, os eritrócitos em aves são nucleados, quando observados sob coloração em microscópio óptico. As células apresentam forma elíptica, núcleo também elíptico em posição central e o citoplasma apresenta coloração rosa. O tempo de vida dos eritrócitos de espécies aviárias é menor que dos mamíferos, portanto a eritropoiese em aves é mais intensa, sendo controlada pelos níveis de eritropoietina, produzida pelos rins, sob estímulo de oxigênio sanguíneo e níveis de estrógeno e andrógenos (MITCHELL & JOHNS, 2008; CAPITELLI & CROSTA, 2013). Segundo estes autores, tal comportamento nas aves, pode-se sugerir que estas têm rápida recuperação, quando da colheita do sangue, considerada uma perda ou derramamento sanguíneo.

Em relação aos leucócitos, os basófilos, parecem estar envolvidos nas fases iniciais de inflamações porém, nem sempre este processo desencadeia basofilia. Do mesmo modo que nos mamíferos os basófilos contêm histamina em seus grânulos, acredita-se que em aves essas células tenham papel nas reações de hipersensibilidade de modo semelhante aos basófilos e mastócitos nos mamíferos (MITCHELL & JOHNS, 2008).

Morfológica e fisiologicamente os linfócitos em aves são semelhantes aos mamíferos, sendo os linfócitos B dependentes da Bursa de Fabrício e responsáveis pela imunidade humoral, e os linfócitos T são dependentes do timo atuando na imunidade celular.

Os glóbulos brancos ou leucócitos, dividem-se em diferentes formas, atuando no sistema imunológico, sendo: 1- neutrófilos atuam contra fungos e bactérias, capazes de englobar matéria particulada por meio de fagocitose. 2 - eosinófilos atacam parasitas maiores e atuam diminuindo ou interrompendo reações inflamatórias locais de origem alérgica. 3 - monócitos são transportados pelo sistema cardiovascular para diferentes tecidos onde se transformam em células denominadas macrófagos, que fagocitam vírus, bactérias e complexos antígeno-anticorpo da corrente sanguínea. 4 - linfócitos atuam na resposta imune, principalmente contra vírus e bactérias e também auxiliam na eliminação de células doentes do corpo principalmente por infecção viral (HOSKINS & HARDMAN, 2017; DUKES, 2017).

As plaquetas, que possuem esta denominação por possuírem forma semelhante a uma placa, são fragmentos de células muito maiores chamadas megacariócitos. Estas existem em sua forma ativa ou inativa. A maior parte das plaquetas circulantes encontra-se na sua forma inativa. Quando ativadas tornam-se pegajosas e mais esféricas com projeções (pseudópodes), que são importantes para que as plaquetas ativadas aglomerem-se. Desta forma as plaquetas estão envolvidas na coagulação do sangue e na reparação de danos endoteliais (HOSKINS & HARDMAN, 2017; DUKES, 2017).

Em relação aos leucócitos, os basófilos por sua vez, parecem estar envolvidos nas fases iniciais de inflamações, porém, nem sempre este processo desencadeia basofilia. Do mesmo modo que nos mamíferos os basófilos contêm histamina em seus grânulos, acredita-se que em aves essas células tenham papel nas reações de hipersensibilidade de modo semelhante aos basófilos e mastócitos nos mamíferos (MITCHELL & JOHNS, 2008).

Morfológica e fisiologicamente os linfócitos em aves são semelhantes aos mamíferos, sendo os linfócitos B dependentes da Bursa de Fabrício e responsáveis pela imunidade humoral, e os linfócitos T são dependentes do timo atuando na imunidade celular.

Souza & Elias (2006), destacaram que a pressão osmótica é responsável pela manutenção das concentrações dos componentes do sangue. Mecanismo que pode ser explicado, exemplificando o mecanismo da osmose que é a passagem de água de um meio mais concentrado para outro menos concentrado através de uma membrana semipermeável até que as soluções entrem em equilíbrio. Entende-se por pressão osmótica como sendo a pressão aplicada à solução sanguínea evitando que ocorra o fluxo osmótico, ou seja, que ocorra o processo de osmose de maneira espontânea.

Neste sentido, destaca-se a importância da albumina, pois é responsável por aproximadamente 80% da pressão osmótica do plasma devido à sua concentração e baixo peso molecular. Como a albumina é a proteína em maior concentração no plasma, sendo a pressão



osmótica inversamente relacionada com o peso molecular e diretamente relacionada com sua concentração, conclui-se que em termos numéricos a pressão osmótica está relacionada ao número de partículas presentes no plasma e não com a massa molecular (DUKES, 2017).

Para a realização adequada das análises do perfil metabólico sanguíneo, é necessário a utilização do conhecimento bioquímico e fisiológico dos animais, assim como conhecer a fonte e a função de cada um dos metabólitos avaliados e utilizar métodos adequados na sua determinação (WITTWER, 1995).

A avaliação de parâmetros bioquímicos é uma importante ferramenta que possibilita a detecção de problemas metabólicos, distúrbios e intoxicações nutricionais, entre outros problemas hepáticos. Uma vez que este órgão é responsável por todo metabolismo nutricional, sendo que todo nutriente ou metabólito absorvido passa pelo fígado e é direcionado para outros órgãos (REECE, 2015).

## **2.2 Fração sanguínea soro e plasma**

Quando o sangue é centrifugado, obtêm-se uma coluna onde os componentes são separados de acordo com a sua densidade específica. A fração celular composta por eritrócitos, leucócitos e plaquetas ocupam a porção inferior desta coluna. O plasma ou soro ocupa a parte superior da coluna e compõe a fração líquida do sangue no qual as células, os colóides como fibrinogênio e as imunoglobulinas encontram-se em suspensão, enquanto as demais substâncias que são transportadas encontram-se dissolvidas (DUKES, 2017).

O plasma é composto por água, eletrólitos, metabólitos, nutrientes, proteínas e hormônios. A determinação laboratorial das concentrações ou atividade destes componentes ou parâmetros bioquímicos presentes no soro ou plasma são importantes principalmente na bioquímica clínica (MURRAY et al., 2009).

O plasma difere do soro em aspectos importantes, sendo que o primeiro tem maior viscosidade e teor de proteínas totais (aproximadamente  $4 \text{ g L}^{-1}$  maior que o soro), pois no plasma estão presentes o fibrinogênio e fatores de coagulação. No que diz respeito a composição do plasma em água e eletrólitos esta é praticamente a mesma dos demais fluidos corporais. O plasma pode conter concentrações ligeiramente mais baixas de potássio e atividade da lactato desidrogenase, comparado ao soro (LADERSON et al., 1974; HORTIN, 2006). Portanto, quando o plasma será utilizado para as análises deve-se ter cuidado para selecionar o anticoagulante apropriado.

Denomina-se plasma a parte líquida acelular do sangue, que é obtido do sangue colhido onde sua coagulação é impedida. Quando, após a colheita, deixamos o sangue coagular, os fatores de coagulação são removidos e a porção líquida obtida é denominada soro. O plasma, portanto, não é apenas a fração líquida do sangue, mas um líquido complexo composto por numerosas substâncias quimicamente ativas que fornece o meio de troca entre os vasos sanguíneos e as células do organismo. Como a maior parte do plasma é composta por água (entre 92 e 94%), pode-se afirmar que as variações encontradas são dependentes das concentrações de proteínas, pois estas são as substâncias mais abundantes dissolvidas ou em suspensão e sua concentração pode variar de 6 a 8 g dL<sup>-1</sup> (DUKES, 2017).

### **2.3 Importância dos Anticoagulantes na Bioquímica Sanguínea**

A fase pré-analítica que inclui fatores técnicos, entre eles a escolha do anticoagulante é necessária para que os resultados dos testes sejam confiáveis e a qualidade das amostras sejam otimizadas (BRAUN et al., 2015; SILVA et al., 2015). O uso de tubos com vácuo, que se enchem sem qualquer operação extra, é recomendado a fim de padronizar os procedimentos de colheita (IALONGO, 2017).

Os anticoagulantes são aditivos que inibem a coagulação do sangue, portanto, a escolha do mesmo deve ser de forma que a concentração ou atividade da substância a ser medida não sofra alterações (MOHRI et al., 2007; SILVA et al., 2015). No entanto, para a maioria dos exames bioquímicos o soro é mais indicado, porém o plasma quando obtido com anticoagulante específico pode ser utilizado obtendo-se resultados igualmente válidos (MOHRI & REZAPPOR, 2009)

Fatores como tipo de ativador de coágulo, anticoagulante, quantidade de sangue colhido e métodos analíticos utilizados podem influenciar nos resultados. Assim, os resultados laboratoriais, devem ser comparados com valores ou publicações de referência, levando-se em consideração a mesma espécie, idade e raça, além de estabelecidos com os mesmos métodos e, se possível, no mesmo laboratório (LUMEIJ, 2008).

Entre os anticoagulantes o EDTA é recomendado na área hematológica porque suas propriedades mantêm a melhor preservação da morfologia celular. O EDTA contém, quatro grupos de ácido e dois grupos de amina contendo um par de elétrons que quelam o cálcio bem como outros metais. O cálcio ativa uma ampla gama de enzimas necessárias à cascata de coagulação e sua remoção evita que tais enzimas sejam ativadas, evitando a coagulação do sangue in vitro (BANFI et al., 2007).

Mohri et al. (2007), ao avaliarem diferentes anticoagulantes na rotina bioquímica de equinos, constataram que a albumina e creatinina plasmática não apresentaram diferença de seus valores comparadas ao soro, quando da utilização de amostras colhidas com heparina e EDTA. Porém, para proteínas totais observou-se redução em 7,30% quando da utilização de EDTA, comparado com o soro. Quando da utilização de citrato de sódio, este causou redução dos valores dos compostos bioquímicos acima citados, no entanto, quando se fez a correção para a diluição do anticoagulante não se observou diferença. Comportamento semelhante também foi observado para o sangue de ovinos (MOHRI & REZAPPOR, 2009).

Pode se dizer que o EDTA não é o anticoagulante mais adequado para análises químicas para fins clínicos, devido à sua complexação com íons metálicos bivalentes. É recomendada sua utilização para análise de colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), apolipoproteínas, compostos ou isoformas da amônia e creatina quinase onde a quelação dos íons zinco é fundamental para inativação das carboxipeptidases (BANFI et al., 2007).

Para análises bioquímicas em mamíferos o EDTA é considerado o melhor anticoagulante no que se refere a preservação da morfologia celular e boa coloração, no entanto, esta não é uma verdade absoluta em hematologia para espécies aviárias. Na maioria das espécies aviárias o EDTA causa rompimento dos glóbulos vermelhos. Hawkey et al. (1983) relataram que o EDTA produziu hemólise progressiva em amostras de sangue de aves exóticas. Dein (1986a; 1986b) encontrou reação semelhante em corvos e perus. Fourie (1977) diz que a heparina foi o anticoagulante mais adequado para hematologia em pombos.

É recomendada a utilização do EDTA, em ensaios que envolvam homocisteína, embora a suplementação de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido cítrico é eficaz em inibir a transformação de metionina a cisteína (WILLEMS et al., 1998). No entanto, a concentração de homocisteína no citrato é significativamente mais baixa que no plasma em EDTA (CALISKAN et al., 2001).

A concentração da homocisteína é estável por até três horas a  $8^\circ\text{C}$  no sangue com EDTA e citrato de sódio. Porém, ocasionalmente é possível alguns resultados superestimados ao medir homocisteína em EDTA quando comparado com citrato (SALAZAR et al., 1999). Willems et al. (1998) não confirmaram estes resultados, destacando que a fonte mais provável de divergência, pode ser o uso de diferentes técnicas analíticas como fluorescência ou cromatografia (CALISKAN et al., 2001).

Entretanto, como já mencionado, o EDTA devido a sua propriedade quelante pode interferir nos resultados de algumas análises, além de quelar cálcio pode também quelar íons ferro, magnésio e zinco. Os efeitos da utilização do EDTA parecem depender da química que

envolve o que se está avaliando bem como o método analítico empregado (GOODE et al., 1995; MOHANTY et al., 2012).

Neste sentido, como o EDTA geralmente é pulverizado em sua forma liofilizada, na parede do tubo de coleta, deve-se ter o cuidado quanto a proporção de sangue:anticoagulante, a fim de obter a quantidade correta de sangue no momento da colheita para que se tenha a correta diluição, é indicada atenção à capacidade descrita no tubo, do contrário, enchimento parcial do tubo haverá uma superconcentração do anticoagulante podendo causar hemólise (UNGER et al., 2007; IALONGO, 2017).

Em contraste, a heparina pode ser utilizada para obtenção de plasma, pois a anticoagulação é obtida por meio da inibição mediada por antitrombina dos fatores de coagulação Xa, IXa e IIa. O plasma em heparina pode ser obtido de maneira mais rápida em relação ao soro (BANFI et al., 2007). A heparina desempenha papel importante no sistema antioxidante, embora as evidências apontem para melhor eficácia *in vivo* do que *in vitro* (DZIECIUCHOWIZC et al., 2002; MOHANTY et al., 2012).

A heparina ou heparina de lítio, pode ser utilizada em praticamente todas as investigações hematológicas e bioquímicas de rotina. A heparina possibilita a utilização de uma única amostra, pois se obtêm maior volume de amostras (plasma), evitando-se a colheita de sangue em excesso, sendo um fator importante ao trabalhar com aves, principalmente com pássaros e aves exóticas. Quando se utiliza plasma no lugar do soro, obtêm-se maior quantidade de amostra para um tubo de mesmo volume. Um motivo para se utilizar plasma e não soro em aves é o risco de coagulação do sobrenadante (soro) quando a amostra é processada somente algumas horas após a colheita (LUMEIJ, 2008).

O citrato de sódio quando comparado com o ácido cítrico possui menor força para quelar íons metálicos e atividade pró-oxidante para produção de radicais hidroxila. No entanto, tem demonstrado ser eficaz na prevenção da ativação plaquetária (GAUTIER-LUNEAU et al., 2007; BOWEN & REMALEY, 2014).

De modo semelhante o fluoreto de sódio é um anticoagulante fraco recomendado para a dosagem de glicemia plasmática, também utilizado na determinação dos demais parâmetros bioquímicos. Este atua prevenindo o metabolismo da glicose pelas hemácias e leucócitos, através da inibição da enzima enolase (fosfopiruvato hidratase), da via glicolítica, a qual é responsável pela conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (SACKS et al., 2011).

Podem ser utilizados tubos de coleta contendo fluoreto de sódio associado ao EDTA, normalmente a concentração é de 1,5 mg ml<sup>-1</sup> de sangue, sendo que as amostras estocadas com seu uso permanecem estáveis por 8 horas a 25 °C e por 28 horas entre 2 a 8 °C. Sem a utilização

de fluoreto de sódio a concentração da glicose diminui em torno de 10 mg dL<sup>-1</sup> por hora à temperatura de 25 °C (GUPTA et al., 2016).

Amostras de boa qualidade também podem ser obtidas com sangue total sem utilização de anticoagulantes (LUMEIJ, 2008). Neste caso, podem ser utilizados tubos para colheita com ativador de coágulo, destaca-se aqui a utilização da sílica. Quando é coletado o soro para análise este deve coagular rapidamente para facilitar a separação do coágulo durante a centrifugação. Geralmente quando se utiliza tubos de plástico, estes requerem ativadores de coágulo (BOWEN et al., 2010).

De maneira geral, os tubos de coleta têm de 40 a 80% de suas paredes cobertas por sílica, geralmente na forma esférica de 0,01 µm a 100 µm de diâmetro. Os ativadores de coágulo, possuem benefício na sua utilização pois atuam diminuindo a formação de fibrina no soro após sua separação (BOWEN et al., 2010).

Na medicina humana, intervalo de 60 minutos é considerado normal entre a colheita do sangue até sua separação em plasma e fração celular (LAESSIG et al., 1976). Entretanto, em bioquímica clínica aviária é recomendável o processamento da amostra para separação do plasma e porção celular imediatamente após a colheita por meio de centrifugação (LUMEIJ, 2008).

Em pombos, a concentração de proteínas totais no plasma é cerca de 1,5 g L<sup>-1</sup> maior que no soro, pois o primeiro também contém fibrinogênio, segundo Lumeij e McLean (1996), esta diferença entre plasma e soro apresenta correlação significativa ( $p = 0,000001$ ;  $R^2 = 0,99$ ;  $n = 50$ ). Quando é utilizado plasma, e não o soro, é possível que no plasma haja elevada concentração de fibrinogênio que pode levar a interferências nos valores de exames e de referência. Isso pode ser observado na eletroforese de proteínas e é refletido por elevação das proteínas de fase aguda ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), por exemplo (ROMAN et al., 2005).

O aumento artificial da albumina em amostras de plasma heparinizado, comparado com soro e outros anticoagulantes, quando da utilização do método colorimétrico verde de bromocresol já foi relatado em cães, ovinos e bovinos (STOKOL et al., 2001; CERÓN et al., 2004; MOHRI et al., 2007; MOHRI & REZAPPOR, 2009). Falsos resultados de baixa albumina sanguínea podem ocorrer em pacientes em hemodiálise. Acredita-se que a heparina pode impedir a ligação da albumina com o verde de bromocresol, reduzindo assim a formação do complexo colorimétrico (MENG e KRAHN, 2008) interferindo nos resultados quando da utilização de espectrofotometria (BOWEN et al., 2010).

Alguns anticoagulantes e inibidores glicolíticos, podem ser inadequados para certas análises. Nem sempre os fabricantes especificam o aditivo utilizado para obtenção do plasma

usado para validar seus testes. Cabe ao laboratório verificar em suas análises, o desempenho dos diferentes tubos com anticoagulante para plasma, de acordo com as particularidades e plataforma de instrumentos utilizada. Deve-se seguir as recomendações do fabricante dos kits comerciais, para o tipo de diagnóstico, o tipo de amostra a ser utilizada, o volume do tubo e ordem de colheita, afim de garantir a quantidade adequada de aditivo e sangue (BOWEN et al., 2010).

O plasma é uma alternativa quando se quer preservar os níveis de antioxidantes da amostra, principalmente na área de química clínica (GHISELLI et al., 2000). Neste sentido, a escolha do anticoagulante deve levar em consideração o potencial de atividade antioxidante, conseqüentemente preservando a amostra.

Diante disso, abre-se uma lacuna na bioquímica sanguínea em frangos de corte de qual anticoagulante é mais indicado, pois os dados de literatura na maioria das vezes estão associados à bioquímica clínica humana e de outros mamíferos.

#### **2.4 Influência do jejum sobre os parâmetros sanguíneos**

Na área clínica humana, o adequado tempo de jejum antes da colheita do sangue é um dos muitos detalhes que compõe a fase pré-analítica, pois pode influenciar os resultados, afetando os diagnósticos (LIPPI et al., 2010; LIMA-OLIVEIRA et al., 2012). Portanto, a padronização do tempo de jejum se torna essencial para evitar resultados equivocados (LIMA-OLIVEIRA et al., 2012).

A colheita de sangue de animais em jejum é decorrente dos valores de referência serem estabelecidos sob esta interferência técnica (FRIEDRICHS et al., 2012). Portanto, aves quando alimentadas podem apresentar alterações nos parâmetros sanguíneos e para a obtenção de uma amostra estável, cada animal deveria ser avaliado levando o tempo de jejum que recebeu. Segundo Harr (2002), é comum a utilização de 12 horas de jejum em frangos de corte, para a coleta de amostras para análises bioquímicas, no entanto, há pouca padronização quanto ao tempo de jejum.

Savenije et al. (2002) avaliaram os metabólitos glicolíticos, comparando o fornecimento de alimento e o tempo de jejum de cinco horas até o momento do abate de frangos aos 42 dias. Os autores observaram maior valor para a glicose sanguínea nas aves alimentadas até o abate e não observaram diferença para os níveis de lactato entre os tratamentos.

A ingestão de alimento ativa alguns gatilhos fisiológicos e a resposta destes podem afetar os resultados bioquímicos no sangue. Por exemplo, a ingestão de alimento aumenta a

secreção de ácido clorídrico no estômago e de bicarbonato no sangue (alcalose pós-prandial) (JOHNSON et al., 1995). Além disso, há o estímulo de hormônios como insulina e glucagon fazendo com que moléculas e nutrientes presentes no intestino passem para a corrente sanguínea. Portanto, a ingestão de alimento pode causar aumento de componentes séricos, que é resultante da interação de vários elementos (BATTERHAM et al., 2002; KORBONITS et al., 2007).

É possível que ocorra aumento das concentrações de ácido úrico, proteínas totais, albumina e creatinina após as aves se alimentarem. A ingestão de alimento estimula a síntese da albumina no fígado, esta atua como molécula transportadora no sangue o que pode levar ao aumento nos níveis de aminoácidos circulantes, em consequência tem-se aumento nas concentrações de proteínas totais (LIMA-OLIVEIRA et al., 2012).

Em aves jovens, com 15 dias de idade submetidas ao jejum prolongado de 24 e 48 horas e realimentação por 24 horas das aves submetidas a 48 horas de jejum, não foram observadas diferenças nas concentrações de proteínas totais quando comparadas com aves sem jejum e entre os tempos de 24 e 48 horas de jejum. Porém, foi observado menor concentração de proteínas totais no grupo realimentado. Este comportamento também foi observado para albumina e ácido úrico (FANG et al., 2014).

A justificativa para tal comportamento dá-se por meio de mecanismos via hipotálamo onde a enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), localizada na matriz mitocondrial é um regulador chave da troca de energia advinda da glicose ou oxidação aeróbica. Portanto, a piruvato desidrogenase quinase diminui a conversão de piruvato em acetil-CoA reduzindo o metabolismo da glicose (BUCK et al., 2002). Porém, há ação de outras enzimas como a carnitina palmitoil transferase 1 $\alpha$  (CPT1  $\alpha$ ) e enzima ativadora dos peroxissomos (PPAR  $\alpha$ ). Estas enzimas atuam mediando o transporte de ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial para  $\beta$ -oxidação (JOGL et al., 2004). Assim, a regulação positiva por intermédio destas enzimas em resposta ao jejum, através de mecanismos via hipotálamo é o aumento da utilização da oxidação lipídica, preservando compostos como proteínas.

Entre os genes regulados diretamente pela PPAR  $\alpha$  no fígado, estão aqueles que codificam acil-CoA oxidase, que está envolvida na  $\beta$ -oxidação peroxissômica de ácidos graxos. A CPT1  $\alpha$  transporta ácidos graxos através da membrana mitocondrial externa. A hidroximetilglutaril-CoA sintase 2 catalisa uma etapa fundamental na síntese de corpos cetônicos (INAGAKI et al., 2007).

Um aspecto fundamental, da resposta adaptativa ao jejum é a mudança da utilização de carboítratos para corpos cetônicos como principal fonte de energia. Durante o jejum os ácidos



graxos são mobilizados do tecido adiposo para o fígado, onde são oxidados a acetil-CoA. Esta então é utilizada para sintetizar corpos cetônicos, incluindo  $\beta$ -hidroxibutirato e acetoacetato, que são reconvertidos em acetil-CoA em outros tecidos e oxidados via ciclo de Krebs para produção de energia (FUKAO et al., 2004; INAGAKI et al., 2007).

Certos mecanismo induzidos pelo jejum não são bem compreendidos. A fome ou jejum bloqueiam as ações do hormônio do crescimento (GH). Recentemente demonstrou-se que o fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), um hormônio induzido pelo jejum, causa resistência ao GH (INAGAKI et al., 2008).

Muitas ações anabólicas do GH são mediadas pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). O jejum reduz os níveis circulantes de IGF-1 (THISSEN et al., 1994). Esta redução é causada pela diminuição nos níveis de RNA mensageiro de IGF-1 no fígado, onde ocorre a maior parte de sua produção (MAES et al., 1983; EMLER & SCHALCH, 1987; BORNFELDT et al., 1989; LOWE et al., 1989). O jejum diminui os níveis circulantes de IGF-1, diminuindo também os níveis de RNAm hepático e as concentrações circulantes de ácido lábil, que se complexa com IGF-1 para estabiliza-lo (KONG et al., 2002). No entanto, os mecanismos envolvendo esses efeitos induzidos pelo jejum não sejam conhecidos.

Estudos recentes têm demonstrado que o fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), que funciona como um hormônio, é induzido no fígado por meio do jejum através de um mecanismo que requer a ação da enzima ativadora dos peroxissomos (PPAR  $\alpha$ ) (INAGAKI et al., 2007). O FGF21 também induz a expressão hepática de proteínas que se ligam a IGF-1 e supressores de citocina que atenuam a sinalização do GH. Esses estudos sugerem que o FGF21 desempenha uma função central em causar resistência ao hormônio do crescimento em resposta à privação de nutrientes quando da utilização de jejum (INAGAKI et al., 2008).

Após a ingestão de alimento, há aumento na concentração nos níveis de ácidos graxos, aminoácidos e peptídeos decorrentes da digestão e absorção para a corrente sanguínea (HOSKINS & HARDMAN, 2017). Neste contexto, justifica-se a busca pela padronização do tempo de jejum para a realização de análises bioquímicas do sangue em frangos de corte.

## **2.5 Estocagem das amostras**

A refrigeração ou congelamento das amostras até o momento da análise apresenta-se como solução adequada de armazenamento a fim de garantir sua preservação. Evidentemente, do ponto de vista pré-analítico o manuseio da amostra deve ser evitado, como por exemplo: ciclos de congelamento e descongelamento, pois a exposição às condições ambientais pode ser

degradante para a amostra. O manuseio da amostra da colheita até seu armazenamento pode ser considerado etapa preliminar e este deve ser realizado o mais rápido possível, pois pode determinar o armazenamento de curto e longo prazo (IALONGO, 2017).

Segundo Russel e Russel (2007) a maioria dos analitos são estáveis a 4 °C por até 36 horas, porém quando a análise das amostras se dá em prazo maior, a estocagem a -20 °C é necessária. Recomenda-se que logo após a colheita, o processamento das amostras seja realizado o mais rápido possível, seguido de refrigeração ou congelamento, com finalidade de prevenir a degradação de componentes termolábeis (CRAY et al., 2009).

Dados de literatura, com diferentes espécies animais demonstram que a estocagem inadequada de amostras, tanto de soro como plasma, é fonte potencial de erros pré-analíticos, podendo interferir nos resultados de ácido úrico, cálcio, fósforo, creatinina e atividade da fosfatase alcalina (DIVIA & JAYAVARDHANAN, 2010; OLIVEIRA et al., 2011; ODDOZE et al., 2012; CUHADAR et al., 2013; MOE et al., 2018).

O plasma pode ser obtido logo após a colheita da amostra, utilizando centrífuga, recomenda-se que esta seja refrigerada, reduzindo assim o potencial de interferência nos antioxidantes produzidos pelo metabolismo dos glóbulos vermelhos (BALCERCZYK e BARTOSZ et al., 2003). Esta recomendação é mais voltada a ensaios que medem a capacidade total de antioxidante do sangue.

Foi demonstrado em um estudo sobre a estabilidade sérica, que amostras à temperatura ambiente por até três horas produziu uma leve, porém crescente, aumento da capacidade total antioxidante (JANSEN et al., 2013a). A mesma pesquisa apontou que não houve diferença entre as condições de armazenamento, quando a amostra foi descongelada e deixada à temperatura ambiente por quatro horas.

O ácido úrico e albumina, apresentam grande estabilidade e podem permanecer quase inalterados por até 24 horas à temperatura ambiente independentemente da separação da fração soro ou plasma, ao contrário da glutatona que sofre extensa degradação (autooxidação) após 20 minutos (MICHELET et al., 1995; BOYANTON Jr & BLICK, 2002).

Para armazenamento de curto prazo (até 24 horas) a rápida centrifugação seguida de refrigeração (4 °C) parece estar adequada. Já para o longo prazo, meses ou anos, tem-se o congelamento a -20 ou -80 °C, que se mostra confiável na preservação da amostra, sem a necessidade de métodos caros de armazenamento como o nitrogênio líquido (-196 °C), (JANSEN et al., 2013b).

Deve-se considerar que amostras estocadas a -80 °C sofrem congelamento mais acentuado e descongelamento mais lento do que a -20 °C, sendo demonstrado que isso causa

maior grau de degradação de proteínas (CAO et al., 2003). Tal efeito pode estar relacionado ao desdobramento de proteínas causado pelo ciclo de congelamento e descongelamento que expõe resíduos de tiol que afetam principalmente a reatividade de alguns métodos de análise.

Em outras espécies como cães, alguns analitos sanguíneos apresentaram maior estabilidade à estocagem a 4 °C e a temperatura ambiente (20 °C), quando armazenado o soro em comparação ao plasma heparinizado. Porém, vale destacar que o tempo total de estocagem foi de três dias, procurando retratar à prática laboratorial (THORESEN et al., 1992).

Boyanton & Blick (2002), observaram instabilidade para creatinina ao avaliarem vários analitos sanguíneos armazenados a temperatura ambiente (25 °C) por até 56 horas. Houve incremento nas concentrações de creatinina de 110% no plasma e 60% no soro após 24 horas. As alterações podem ser atribuídas a interferência de pseudo-creatininas, envolvidas com a cinética da reação de Jaffe, método empregado para análise baseado no verde de bromocresol. Porém, isso não está muito claro pois outros metabólitos como albumina, proteínas totais, sódio e ureia apresentaram aumento de 2 a 6%.

Na medicina humana, estudos indicam estabilidade de alguns componentes bioquímicos do sangue, entre eles, a albumina, proteínas totais e cálcio em amostras estocadas por três meses a -20 °C e submetidas a ciclos de descongelamento. A albumina, proteínas totais e cálcio foram estáveis até o sétimo ciclo de descongelamento, e ao tempo de estocagem. A concentração de creatinina apresentou comportamento instável com diminuição de sua concentração, já o ácido úrico apresentou aumento de sua concentração até o sétimo ciclo de descongelamento e ao tempo de estocagem (CUHADAR et al., 2013).

Todavia, são poucos os dados de literatura que relatam a influência do tempo de estocagem de amostras e seu efeito na concentração ou atividade enzimática das variáveis bioquímicas do sangue em frangos de corte, bem como da estabilidade dos parâmetros bioquímicos em amostras estocadas sob refrigeração ou congelamento por longos períodos (TOTHOVA et al., 2012).

Portanto, justifica-se a estocagem das amostras de plasma ou soro a -20 °C, recomendando-se o descongelamento no máximo de duas vezes com a utilização de banho quente a fim de evitar o desdobramento de proteínas (GUNGOR et al., 2011). Alesci et al. (2009), recomendaram a utilização de banho maria a 37 °C por cinco minutos, para o descongelamento de amostras armazenadas em microtubos a -20 °C.

## 2.6 Intensidade de luz e seus efeitos no metabolismo de frangos de corte

O manejo de luz é um fator importante e que afeta a produtividade em frangos de corte. Programas de iluminação são continuamente utilizados e estudados na avicultura moderna. Geralmente inicia-se com maior intensidade, 20 lux, reduzindo para 5 lux ou menos dos 14 aos 21 dias mantendo-se esta intensidade até o abate das aves (OLANREWAJU et al., 2010).

A intensidade da luz baseia-se no seu brilho ao nível dos olhos das aves, sendo as unidades de medida mais utilizadas: fóton, lúmen ou lux. A intensidade luminosa é de suma importância na avicultura moderna pois é possível modular a produção e o bem-estar das aves através de mecanismos comportamentais ou fisiológicos (DEEP et al., 2013).

Há uma grande variedade de programas de luz, considerando o comprimento de onda e sua intensidade, bem como equipamentos e dispositivos para seu manejo (OLANREWAJU et al., 2010). A manipulação da intensidade da luz é amplamente utilizada na indústria avícola para controlar o comportamento das aves. A redução na intensidade da luz faz com que as aves apresentem comportamento mais calmo e com a diminuição do estresse é possível melhorar a produtividade (CARVALHO et al., 2015).

A intensidade da luz pode influenciar não somente a produtividade, mas também pode causar alterações fisiológicas e isto deve ser considerado. Olanrewaju et al. (2010) não observaram influência de três intensidades de luz (0,5; 3,0 e 20 lux), sobre parâmetros hematológicos e níveis de proteínas totais em frangos dos 21 aos 56 dias de idade, porém observaram efeito sobre alguns metabólitos da via energética como triglicerídeos e HDL.

Grande parte das pesquisas sobre o manejo de luz, baseia-se em quatro pontos principais: intensidade, fotoperíodo, cor ou comprimento de onda e fonte, esta última refere-se ao tipo de lâmpada utilizada, incandescente, fluorescente ou diodo emissor de luz (LED). Embora haja estudos publicados sobre os efeitos da iluminação em frangos de corte sobre seu comportamento, desempenho e saúde, poucos avaliam os efeitos interativos ou sinergismo entre intensidade e fotoperíodo (BLATCHFORD et al., 2012).

Olanrewaju et al. (2017) avaliaram alguns parâmetros bioquímicos do sangue simulando a entrada de luz pelo sistema de ventilação do aviário e um ambiente controlado em 2,5 lux. Até os 35 dias de idade todas as aves permaneceram em ambiente controlado. De 36 a 63 dias de idade, as aves foram divididas em dois grupos. A entrada de luz proporcionou picos de 35 lux, com fotoperíodo efetivo de 18 horas de luz e 6 horas de escuro, ante 16 horas de luz, 08 horas de escuro do ambiente controlado. Aos 35 dias foram colhidas e analisadas amostras de sangue utilizados como *baseline*. Aos 63 dias, as aves que receberam picos de 35 lux

apresentaram aumento nas concentrações de proteínas totais, albumina e creatinina (32,58%, 16,22%, 22,97%) e diminuição das concentrações de ácido úrico, ureia e atividade da fosfatase alcalina (13,56; 29,33; 92,48%), respectivamente.

Neste sentido, tem-se a oportunidade para investigar os efeitos da intensidade de luz sobre os parâmetros bioquímicos em frangos de corte.

## **2.7 Parâmetros Bioquímicos**

### **2.7.1 Proteínas totais**

As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente pelo fígado (DUKES, 2017), sendo que a taxa de síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal, principalmente em relação à proteína e da vitamina A advinda da dieta, e com a funcionalidade hepática (GONZÁLEZ & SCHEFER, 2003). As imunoglobulinas são produzidas pelos linfócitos B e plasmócitos que representam uma quantidade significativa na concentração das proteínas plasmáticas totais (CAMPBELL, 2004).

As concentrações de proteínas totais em espécies aviárias é em torno de 2,5 a 4,5 g dL<sup>-1</sup> compreendendo a maior porção dos sólidos do plasma (HARR, 2002). As proteínas plasmáticas são uma mistura complexa, incluindo não apenas proteínas simples, mas também proteínas conjugadas, como glicoproteínas e uma gama variada de lipoproteínas (MURRAY et al., 2009).

As principais proteínas plasmáticas são albumina, globulinas e o fibrinogênio. Entre suas diversas funções destacam-se a manutenção da pressão osmótica e da viscosidade sanguínea, transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios, lipídeos e produtos da excreção, que atuam na regulação do pH e na coagulação sanguínea (GONZÁLEZ & SCHEFER, 2003). As proteínas plasmáticas também atuam como catalizadores nas reações químicas por meio das enzimas e na defesa do organismo, através dos anticorpos, e na manutenção do volume sanguíneo, através do efeito osmótico coloidal (MELILLO, 2013).

Além das proteínas plasmáticas mencionadas anteriormente, é importante mencionar a pré-albumina, encontrada nos psitacídeos, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-globulina e a gamaglobulina, sendo importantes para análise de respostas inflamatórias na bioquímica clínica (KERR, 2003; KANEKO et al., 2008).

Concentração aumentada de proteínas totais podem indicar desidratação, perda de fluidos, infecções, tumores e amostra hemolisada. As concentrações diminuídas podem indicar

subnutrição, cirrose hepática, sobreidratação, enteropatia, hemorragia, síndrome nefrótica e síndrome de mal absorção (GONZÁLEZ & SCHEFER, 2003).

Casos de desnutrição proteica grave onde a concentração de proteínas plasmáticas é drasticamente diminuída podem levar a ocorrência de edema. Isso ocorre pois o líquido não será atraído de volta para o compartimento intravascular e se acumulará nos espaços extravasculares dos tecidos. Assim, a deficiência de proteína pode ser uma das causas de edema (MURRAY et al., 2009).

Na ocorrência de insuficiência hepática há diminuição nos valores das proteínas totais, levando a alterações gastrointestinais e renais, que podem levar ao quadro de hipoproteinemia (LEWANDOWSKI et al., 1986; LUMEIJ, 2008). Quando da ocorrência de inflamação, peritonite, aspergilose, tuberculose e psitacose pode ocorrer diminuição na relação albumina/globulina (JONES, 1999; LUMEIJ, 2008).

As proteínas plasmáticas desempenham funções importantes, no entanto, quando da ocorrência de doenças hepáticas, ocorre deficiência na síntese adequada de proteínas, e caso essa deficiência de proteína seja prolongada, pode levar ao comprometimento das funções orgânicas do organismo (DUKES, 2017).

Algumas globulinas são sintetizadas pelas células sanguíneas, enquanto certas proteínas plasmáticas são sintetizadas em outros locais, como as células endoteliais. Antes de entrar no plasma sanguíneo estas substâncias atravessam a principal via secretora na célula, a membrana endoplasmática rugosa e membrana endoplasmática lisa das vesículas secretoras do aparelho de Golgi. Neste sentido, a maioria das proteínas plasmáticas são sintetizadas como pré-proteínas que inicialmente contêm peptídeos sinalizadores da porção terminal amino. Estas estão sujeitas a alterações traducionais que podem ser por meio de proteólise, glicólise ou fosforilação à medida que percorrem as células. De modo geral, os tempos de trânsito do local de síntese até os hepatócitos ou plasma, por exemplo, pode variar de 30 minutos a muitas horas dependendo das características individuais de cada proteína (MURRAY et al., 2009).

De forma geral, os principais fatores que afetam as concentrações das proteínas totais nas aves são: idade, sazonalidade, estado nutricional, condições de criação (manejo) e doenças (LUMEIJ, 2008).

### **2.7.2 Albumina**

A albumina é a mais importante das proteínas do plasma, representando de 40 a 50% das proteínas totais (KANEKO et al., 2008). Sua síntese ocorre no fígado e contribui com 80%

da osmolaridade do plasma sanguíneo, devido a sua abundância e baixo peso molecular (DUKES, 2017). É importante reserva proteica, atua como transportadora de ácidos graxos livres, aminoácidos, metais, cálcio, hormônios e bilirrubina. A albumina atua como um ânion na regulação do pH sanguíneo (GONZÁLEZ & SCHEFER, 2003).

No plasma humano a albumina é a principal proteína (3,4 a 4,7 g dL<sup>-1</sup>) compondo cerca de 60% da proteína plasmática total. No entanto, aproximadamente 40% da albumina está presente no plasma e os demais 60% estão presentes no espaço extracelular. O fígado sintetiza aproximadamente 12 g de albumina por dia, o que representa cerca de 25% da síntese proteica total e 50% das proteínas hepáticas secretadas. É inicialmente sintetizada como pré-proteína. Seu peptídeo sinalizador é removido à medida que passa para as cisternas do retículo endoplasmático rugoso, trata-se de um hexapeptídeo com grupo terminal amino que é clivado ao longo da via secretora (DUKES, 2017).

Dos sólidos do plasma mais de 70% são proteínas plasmáticas, principalmente albumina plasmática, imunoglobulinas que são os anticorpos circulantes, apolipoproteínas envolvidas no transporte de lipídeos, transferrina e proteínas da coagulação sanguínea, como fibrinogênio e protrombina (NELSON & COX, 2014).

Em humanos a albumina é composta por uma cadeia polipeptídica de 585 aminoácidos contendo 17 ligações dissulfeto. Com a utilização de proteases ela pode ser subdividida em três domínios com funções diferentes. A forma em elipse da molécula da albumina, confere a ela uma propriedade de não aumento da viscosidade do plasma. Sua massa molecular é relativamente baixa (69 kDa), porém sua concentração é alta, esta particularidade faz com que a albumina desempenhe papel importante na regulação da pressão osmótica do plasma (MURRAY et al., 2009).

Cada fração proteica contribui de maneira diferente na manutenção da pressão osmótica, sendo inversamente relacionada com o peso molecular e diretamente relacionada com sua concentração. Em termos numéricos significa que a pressão osmótica está relacionada ao número de partículas presentes no plasma e não com a massa molecular. Os pesos moleculares da albumina, globulinas e fibrinogênio são de 70.000, 180.000 e 300.000 Da, respectivamente. O peso molecular do fibrinogênio é alto e sua concentração plasmática é baixa, assim, sua contribuição para a pressão osmótica é pequena. Para fins comparativos, quando as concentrações de globulinas e albumina são semelhantes, a albumina contribui de duas a três vezes mais para a pressão osmótica do que as globulinas, pois há de duas a três vezes mais moléculas de albumina em relação ao mesmo peso para a globulina (DUKES, 2017).



A albumina atua na regulação do equilíbrio dos fluídos corporais. Seu nível no sangue pode ser indicativo do conteúdo proteico da dieta, níveis baixos de albumina no sangue são devidos à falta de proteína na dieta, deficiência de sua produção no fígado ou ainda em virtude de doença renal. Baixa concentração de albumina resulta em desequilíbrio dos fluidos, resultando em edema generalizado acompanhado de retenção de líquido nos tecidos, ou seja, o desequilíbrio nas concentrações de albumina pode ser a causa de formação de edema. Níveis elevados de albumina no sangue, é sugestivo de excesso de proteína na dieta, porém, a causa mais provável é desidratação, quando os níveis de líquido nos tecidos estão baixos (HOSKINS & HARDMAN, 2017).

Outra função importante da albumina é sua capacidade de se ligar a vários ligantes, esta propriedade é de fundamental importância principalmente na área farmacológica. Entre os ligantes estão ácidos graxos livres, cálcio, hormônios, esteroides, bilirrubina e triptofano plasmático. Uma gama de drogas como sulfonamidas, penicilina G, dicumarol e aspirina são transportadas ligadas à albumina. Nota-se a sua importância como agente transportador no organismo (MURRAY et al., 2009).

Contudo, mudanças nas concentrações de albumina sanguínea ocorrem lentamente. Para que seja possível a detecção de alterações significativas em sua concentração são necessários 30 dias, devido a sua baixa velocidade de síntese e degradação. Em mamíferos, níveis de albumina diminuídos juntamente com baixos níveis de ureia são indicativos de deficiência proteica. Diminuição nos níveis de albumina com níveis normais de uréia, ou elevados, acompanhados de níveis elevados de enzimas indicam falha hepática (DUKES, 2017).

Hipoalbuminemia pode afetar o metabolismo de outras substâncias, devido ao seu papel como transportador, levando à queda da pressão osmótica do plasma e ao quadro de ascite ou edemas (GONZÁLEZ & SCHEFER, 2003). Em doenças hepáticas a síntese de albumina é deprimida, em pessoas com doenças hepáticas o plasma mostra uma diminuição na proporção de albumina em relação a globulinas, esta síntese de albumina diminui principalmente em condições de desnutrição proteica (NELSON & COX, 2014).

Níveis aumentados de albumina podem indicar: desidratação e perda excessiva de fluidos. Já níveis diminuídos podem indicar: dano hepático crônico, deficiência de proteína na alimentação, parasitas gastrointestinais, doença renal, hemorragia e sobreidratação (DUKES, 2017).

Neste sentido, tem-se a oportunidade de investigar os efeitos do jejum sobre as concentrações de albumina em frangos de corte, pois, os dados de literatura não trazem de maneira clara, como o jejum pode afetar este parâmetro bioquímico do sangue.

### 2.7.3 Creatinina

A creatinina plasmática é derivada quase que em sua totalidade do metabolismo da creatina muscular. A creatina é produzida pelo fígado, rins e pâncreas e então transportada até os músculos, onde é utilizada como reserva energética na forma de fosfocreatina, e sua degradação a creatinina ocorre de maneira constante, sendo que aproximadamente 2% de toda creatina é metabolizada para creatinina. A conversão de fosfocreatina em creatinina é uma reação não enzimática, irreversível e dependente de fatores estequiométricos (GONZÁLEZ & SCHEFER, 2003; KLEIN, 2014).

Pode-se afirmar que a creatinina é um subproduto nitrogenado do metabolismo muscular. A principal reação para sua produção é a perda espontânea do ácido fosfórico da fosfocreatinina, no músculo. Sua produção é independente do metabolismo das proteínas e a quantidade produzida depende da massa muscular no corpo e sua produção é consistente e constante, sendo sua excreção da mesma forma, as concentrações plasmáticas de creatinina em mamíferos são de 0,5 a 2,0 mg dL<sup>-1</sup>, concentrações plasmáticas elevadas de creatinina podem indicar doença renal (DUKES, 2017).

A excreção da creatinina ocorre exclusivamente por via renal, pois não é reabsorvida ou reciclada pelo organismo. Portanto, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, níveis elevados de creatinina são indicativos de deficiência da funcionalidade renal como, fluxo renal reduzido, hipotensão, desidratação, obstrução urinária, doenças renais, síndrome hepato-renal, dano muscular e exercício intenso. Já níveis diminuídos de creatinina são indicativos de insuficiência hepática, sobreidratação e miopatia (GONZÁLEZ & SCHEFER, 2003).

Neste sentido, se faz necessário investigar as concentrações de creatinina no soro e plasma de frangos de corte, haja vista que as aves atualmente são selecionadas para rápido crescimento e deposição muscular.

### 2.7.4 Ácido úrico

A principal forma de excreção de componentes nitrogenados nas aves ocorre na forma de ácido úrico, já que as aves são animais uricotélicos (HOCHLEITHNER, 1994; THRALL et al., 2004). Como as aves não possuem o ciclo da ureia ativo devido à ausência da enzima carbamoil fosfato sintetase, que é responsável pela fixação da amônia livre nos mamíferos, as

aves utilizam glutamina sintase mitocondrial para desintoxicar a amônia originada dos processos metabólicos (KLASING, 1998; SAKOMURA et al., 2014).

O ácido úrico apresenta menos toxicidade do que outros metabólitos, como a amônia e a ureia. A justificativa se deve ao fato das aves serem ovíparas, onde o desenvolvimento embrionário ocorre dentro do ovo, o que não permite a difusão de produtos de excreção para o exterior (HARR, 2002). As aves sintetizam purinas e estas são degradadas a urato. Esse mecanismo tem função de conservação de água no organismo (SAKOMURA et al., 2014).

As concentrações de ácido úrico podem ser influenciadas pela idade, com valores maiores nos animais mais jovens, com a dieta, sendo maiores nos animais alimentados com maiores teores proteicos ou ainda em alterações fisiológicas ou metabólicas (HOCHLEITHNER, 1994; ALONSO-ALVAREZ, 2005; CAPITELLI & CROSTA, 2013).

A avaliação das concentrações séricas de ácido úrico é utilizada para diagnóstico de alterações na função renal nas aves. Nas espécies aviárias, o aumento é verificado quando ocorre nível de comprometimento renal superior de 70 a 80% (HOCHLEITHNER, 1994). A restrição alimentar, que implica na utilização de proteínas estruturais, através do catabolismo proteico, também pode provocar o aumento dos valores séricos de ácido úrico (RAJMAN et al., 2006).

O ácido úrico tem baixa solubilidade em água ( $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ), quando comparado com a ureia. Sua concentração no plasma pode variar de 40 a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dependendo do estado nutricional da ave. Quando em jejum, há diminuição da excreção de ácido úrico. No entanto, consumo de dieta rica em proteína leva ao aumento na excreção renal. No sangue o nível de ácido úrico fica entre 5 e  $10 \text{ mg dL}^{-1}$ , sendo raro ultrapassar esses valores, mesmo em aves adultas que podem excretar de 4 a 5 gramas de ácido úrico por dia (SAKOMURA et al., 2014).

### **2.7.5 Fosfatase alcalina**

A fosfatase alcalina é uma enzima glicoproteica com função hidrolítica, responsável pela remoção de grupamentos fosfato de muitos tipos de moléculas (KANEKO et al., 2008). A principal atividade da fosfatase alcalina, está relacionada com o metabolismo do cálcio e fósforo, atuando nas atividades condrogênicas e osteoblásticas, sendo fundamental para o crescimento das aves (RAJMAN et al., 2006).

No soro sanguíneo está presente em sua forma solúvel, porém, pode ser encontrada na maioria das membranas dos tecidos. Nas membranas canaliculares dos hepatócitos e na superfície luminal das células epiteliais das vias biliares, a fosfatase alcalina pode estar

envolvida no transporte da colina através das membranas celulares. Na mucosa intestinal, mais precisamente na borda em escova, pode estar envolvida na hidrólise e absorção de fosfatos advindos da alimentação. É encontrada também nas membranas dos osteoblastos e é necessária para a mineralização óssea (FERNANDEZ & KIDNEY, 2007).

Hochleithner (1994) observou variações nas concentrações séricas de fosfatase alcalina em aves de postura, encontrando valores maiores nas aves mais jovens, decorrentes do crescimento ósseo. Maior atividade da fosfatase alcalina também é observada nas aves antes da postura, onde se tem uma demanda maior de cálcio para a formação da casca dos ovos.

Embora muitos tecidos ou células apresentem alguma atividade da fosfatase alcalina, células do fígado, ossos, rins, mucosa intestinal e placenta são os sítios de maior atividade por grama de tecido sendo a mucosa intestinal com maior atividade em relação aos demais sítios. Entretanto, a atividade sérica da fosfatase alcalina não é um reflexo da concentração nos tecidos. Na maioria das espécies domésticas a fosfatase alcalina intestinal não pode ser estimada via soro, porém, a atividade intestinal e no fígado pode contribuir com mais da metade da atividade sérica (HOFFMANN & SOLTER, 2008).

Valores alterados da atividade da fosfatase alcalina podem indicar desequilíbrio fisiológico, além daqueles de origem hepática, podendo ser de origem patológica. O processo patológico é o conjunto de alterações morfológicas, moleculares e/ou funcionais que surgem nos tecidos, após algum tipo de agressão por agente externo, o agente patológico (FERNANDEZ & KIDNEY, 2007).

As aves em particular possuem pouca produção de fosfatase alcalina, além do fígado, as aves apresentam produção de fosfatase alcalina também nos ossos, pulmões, músculo esquelético, testículos, rins e músculo cardíaco. Patos possuem maior atividade de fosfatase alcalina no duodeno e rins, enquanto que perus têm maior atividade nos testículos (FUDGE, 2000). Sua atividade pode ser indicativa de lesão hepática (KALINA et al., 1990).

Embora a fosfatase alcalina seja uma enzima bastante estudada, pode-se dizer que suas funções fisiológicas não estão totalmente compreendidas, a mesma pode ser localizada na superfície de muitas células o que sugere papel no transporte de membrana (KANEKO et al., 2008). Neste sentido, têm-se a oportunidade de investigar os efeitos da intensidade luminosa e do jejum sobre a atividade da fosfatase alcalina em frangos de corte, haja vista que são poucos os dados de literatura para esta espécie.

## 2.8 Referências

- ALESCI, S.; BORGGREFE, M.; DEMPFLER, C.E. Effect of freezing method and storage at -20 °C and -70 °C on prothrombin time, aPPT and plasma fibrinogen levels. **Thrombosis Research**, 124: 121-126, 2009.
- ALONSO-ALVAREZ, C. Age-dependent changes in plasma biochemistry of yellow-legged gulls (*Larus cachinnans*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A: 140: 512-518, 2005.
- ALVINO, G.M.; ARCHER, G.S.; MENCH, J. Behavioural time budgets of broiler chickens reared in varying light intensities. **Applied Animal Behavior Science**, 118 (1-2): 54-61, 2009.
- BALCERCZYK, A.; BARTOSZ, G. Thiols are main determinants of a total antioxidant capacity of cellular homogenates. **Free Radical Research**, 37 (5): 537-541, 2003.
- BANFI, G.; SALVAGNO, G.L.; LIPPI, G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 45 (5): 565-576, 2007.
- BATTERHAM, R.L.; COWLEY, M.A.; SMALL, C.J.; HERZOG, H.; COHEN, M.A.; DAKIN, C.L.; WREN, A.M.; BRYNES, A.E.; LOW, M.J.; GHATEI, M.A.; CONE, R.D.; BLOOM, S. Gut hormone PYY 3-36 physiologically inhibits food intake. **Nature**, 418: 650-654, 2002.
- BLATCHFORD, R.A.; ARCHER, G.S.; MENCH, J.A. Contrast in light intensity rather than day length influences the behavior and health of broiler chickens. **Poultry Science**, 91 (8): 1768-1774, 2012.
- BOWEN, R.A.R.; RAMALEY, A.T. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. **Biochemia Medica**, 24 (1): 31-44, 2014.
- BOWEN R.A.R.; HORTIN, G.L.; CSAKO, G.; OTAÑEZ, O.H.; REMALEY, A.T. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. **Clinical Biochemistry**, 43 (1-2): 4-25, 2010.
- BORNFELDT, K.E.; ARNQVIST, H.J.; ENBERG, B.; MATHEWS, L.S.; NORSTEDT, G. Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. **Journal of Endocrinology**, 122 (3): 651-656, 1989.
- BOYANTON Jr, B.L.; BLICK, K.E. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. **Clinical Chemistry**, 48 (12): 2242-2247, 2002.
- BRAUN, J.P.; ABELLA, N.B.; GREFFRE, A.; CONCORDET, D.; TRUMEL, C. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology, **Veterinary Clinical Pathology**, 44 (1): 8-25, 2015.

BUCK, M.J.; SQUIRE, T.L.; ANDREWS, M.T. Coordinate expression. Of the PDK4 gene: A means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. **Physiological Genomics**, 8 (1): 5-13, 2002.

CALISKAN, S.; KURALAY, F.; ONVURAL, B. Effects of anticoagulants on plasma homocysteine determination. **Clinica Chimica Acta**, 309 (1): 53-56, 2001.

CAMPBELL, T.W. Clinical chemistry of birds. In: THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. p. 479-492

CAO, E.; CHEN, Y.; CUI, Z.; FOSTER, P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, 82 (6): 684-690, 2003.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice**, 16 (2): 71-120, 2013.

CARVALHO, R. H.; SOARES, A. L.; GRESPAN, M.; SPURIO, R. S.; CORÓ, F. A. G.; OBA, A.; SHIMOKOMAKI, M. The effects of the dark house system on growth, performance and meat quality of broiler chicken. **Animal Science Journal**, 86 (2): 189-193, 2015.

CERÓN, J. J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; HENNEMANN, C.; TECLES, F. The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. **The Veterinary Journal**, 167 (3): 294-301, 2004.

CRAY, C.; ZAIAS, J. Laboratory procedures. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 7 (2): 487-518, 2004.

CRAY, C.; RODRIGUEZ, M.; ZAIS, J.; ALTMAN, N.H. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 48 (2): 202-204, 2009.

CUHADAR, S.; KOSEOGLU, M.; ATAY, A.; DIRICAN, A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. **Biochemia Medica**, 23 (1): 70-77, 2013.

DEEP, A.; RAGINSKI, C.; SCHWEAN-LARDNER, K.; FANCHER, B.I.; CLASSEN, H.L. Minimum light intensity threshold to prevent negative effects on broiler production and welfare. **British Poultry Science**, 54, (6): 686-694, 2013.

DEIN, F.J. In: **Clinical Avian Medicine and Surgery** (Harrison, G.J.; HARRISON, L.R. Eds), Saunders, Philadelphia, p.174-191, 1986a.

DEIN, F.J. **Proceeding Annual Meeting Association Avian Veterinarians**, p.41-42, 1986b.

DIVYA, P.D.; JAYAVARDHANAN, K.K. Effect of temperature and storage time on hepatobiliary enzyme activities in goat serum. **Veterinary World**, 3 (6): p. 277, 2010.

DONELEY, B. Clinical techniques in the practice diagnostic laboratory – A Review. **Journal of Exotic Pet Medicine**, 20 (2): 117-123, 2011.

DUBIN, S.; HUNT, P. Effect of anticoagulants and glucose on refractometric estimation of protein in canine and rabbit plasma. **Laboratory Animal Science**, 28: 541-544, 1978.

DUKES. **Fisiologia dos animais domésticos**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2017. 1594p.

DZIECIUCHOWICZ, L.; CHECINSKI, P.; KRAUSS, H. Heparin reduces oxidative stress in the postoperative period. **Medical Science Monitor**, 8 (9): 657-660, 2002.

EMLER, C.A.; SCHALCH, D.S. Nutritional-induced changes in hepatic insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in rats. **Endocrinology**, 120 (2): 832-834, 1987.

FANG, X.L.; ZHU, X.T.; CHEN, S.F.; ZHANG, Z.Q.; ZENG, Q.J.; DENG, L.; PENG, J.L.; YU, J.J.; WANG, L.N.; WANG, S.; GAO, P. Differential gene expression. Pattern in hypothalamus of chickens during fasting-induced metabolic reprogramming: Functions of glucose and lipid metabolism in the feed intake of chickens. **Poultry Science**, 93: 2841-2854, 2014.

FERNANDEZ, N.J.; KIDNEY, B.A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. **Veterinary Clinical Pathology**, 36 (3): 223-233, 2007.

FIDAN, E.D.; NAZLIGUL, A.; TURKYILMAZ, M.K.; AYPAK, S.U.; KILIMCI, F.S.; KARAARLAN, S.; KAYA, M. Effect of photoperiod length and light intensity on some welfare criteria, carcass, and meat quality characteristics in broilers. **Brazilian Journal of Animal Science**, 46 (3): 202-210, 2017.

FOURIE, F.R. Effect of anticoagulante on the haematocrit, osmolality and pH of avian blood. **Poultry Science**, 56: 1842-1846, 1977.

FRIEDRICHS, K.R.; HARR, K.E.; FREEMAN, K.P.; SZLADOVITS, B.; WALTON, R.M.; BARNHART, K.F.; BLANCO-CHAVEZ, J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, 41 (4): 441-453, 2012.

FUDGE, A.M; JOSEPH, V. Avian Complete Blood Count. In: FUDGE, A.M. **Laboratory Medicine - Avian and Exotic Pets**, Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p.19-27

FUKAO, T.; LOPASCHUK, G.D.; MITCHELL, G.A. Pathways and control of ketone body metabolism on the fringe of lipid biochemistry. **Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids**, 70 (3): 243-251, 2004.

GAUTIER-LUNEAU, I.; BERTET, P.; JEUNET, A.; SERRATRICE, G.; PIERRE, J.L. Iron-citrate complexes and free radicals generation: is citric acid an innocent additive in foods and drink? **Biometals**, 20 (5): 793-796, 2007.

GAYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006, 1128p.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidante capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, 29 (11): 1106-1114, 2000.

GONZÁLES, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: GONZÁLES, F.H.D.; CAMPOS, R. **Anais do I simpósio de patologia clínica veterinária de região sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.73-89, 2003.

GOODE, H.F.; RICHARDSON, N.; MYERS, D.S.; HOWDLE, P.D.; WALKER, B.E.; WEBSTER, N.R. The effect of anticoagulant choice on apparent total antioxidante capacity using three diferente methods. **Annals Clinical Biochemistry**, 32 (4): 413-416, 1995.

GUNGOR, N.; OZYUREK, M.; GUCLU, K.; CEKIC, S.D.; APAK, R. Comparative avaluation of antioxidante capacities of thiol-based antioxidants measured by diferente in vitro methods. **Talanta**, 83 (5): 1650-1658, 2011.

GUPTA, S.; GUPTA, A. K.; VERMA, M.; SINGH, K.; KAUR, A.; CHOPRA, B.; KAUR, V. A study to compare the plasma glucose levels obtained in sodium fluoride and citrate buffer tubes at a tertiary care hospital in Punjab. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, 6 (1): 50-53, 2016.

HARR, K.E. Clinical chemistry of companion avian species a review. **Veterrinary Clinical Pathology**, 31 (3): 140-151, 2002.

HASSAN, MD.R.; SULTARA, S.; CHOE, H.S.; RYU, K.S. Effect of monochromatic and combined light colour on performance, blood parameters, ovarian morphology andreproductive hormones in laying hens. **Italian Journal of Animal Science**, 12 (3): 358-364, 2013.

HAWKEY, C.; SAMOUR, J.H.; ASHTON, D.G.; HART, M.G.; CINDERY, R.N.; FINCH, J.M.; JONES, D.M. Normal and clical haematology of captive cranes (gruiformes). **Avian Pathology**, 12 (1): 73-78, 1983.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L.R. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p.176-198

HOFFMANN, W.E.; SOLTER, P.F. Diagnostic Enzymology of domestic animals. In: In: KANEKO, J. J; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. Waltham: Academic Press, 2008. p. 351-370.

HORTIN, G.L. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. **Clinical Chemistry**, 52 (7): 1223-1237, 2006.

HOSKINS, P.R.; HARDMAN, D. Blood and Blood Flow. In: HOSKINS, P.R.; LAWFORD, P.V.; DOYLE, B.J. **Cardiovascular Biomechanics**. Cham, Switzerland: Springer, 2017. p.37-64.



HUBER-EICHER, B.; SUTER, A.; SPRING-STAHLI, P. Effects of colored light-emitting diode illumination on behavior and performance of laying hens. **Poultry Science**, 92: 869-873, 2013.

INAGAKI, T.; DUTCHAK, P.; ZHAO, G.; DING, X.; GAUTRON, L.; PARAMESWARA, V.; LI, Y.; GOETZ, R.; MOHAMMADI, M.; ESSER, V.; ELMQUIST, J.K.; GERARD, R.D.; BURGESS, S.C.; HAMMER, R.E.; MANGELSDORF, D.J.; KLIEWER, S.A. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR $\alpha$ -mediated induction of Fibroblast Growth Factor 21. **Cell Metabolism**, 5(6): 415-425, 2007.

INAGAKI, T.; LIN, V.Y.; GOETZ, R.; MOHAMMADI, M.; MANGELSDORF, D.J.; KLIEW, S. Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. **Cell Metabolism**, 8 (1): 77-83, 2008.

IALONGO, C. Preanalytic of total antioxidante capacity assays performed in sérum, plasma urine and saliva. **Clinical Biochemistry**, 50 (06): 356-363, 2017.

JANSEN, E.H.J.M.; BEEKHOF, P.K.; CREMERS, J.W.J.M.; VIEZELIENE, D.; VIEZELIENE, D.; MUZAKOVA, V.; SKALICKY, J. Short-term stability of biomarkers of oxidative stress and antioxidante status in humam sérum. **ISRN Biomarkers** (2013): 2013. 5p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/316528>

JANSEN, E.H.J.M.; BEEKHOF, P.K.; CREMERS, J.W.J.M.; VIEZELIENE, D.; MUZAKOVA, V.; SKALICKY, J. Long-term stability of parameters of antioxidante status in human serum. **Free Radical Research**, 47 (6-7): 535-540, 2013.

JOGL, G. HSIAO, Y.S.; TONG, L. Structure and function of carnitine acyltransferases. **Annals of The New York Academy of Sciences**, 1033 (1): 17-29, 2004.

JOHNSON, C.D.; MOLE, D.R.; PESTRIDGE, A. Postpradial alkaline tide: Does it exist? **Digestion**, 56: 100-106, 1995.

JONES, M.P. Avian clinical pathology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, 2 (3): 663-687, 1999.

KALINA, M.; LEVI, D.; RIKLIS, S. Modulation of alkaline phosphatase activity in alveolar type II like cells. **Histochemistry**, 95: 97-103, 1990.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6th ed., San Diego: Academic Press, 2008. 928 p.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária - Bioquímica Clínica e Hematologia**, 2ed., São Paulo: Roca, 2003. 436p.

KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, 77 (8): 1119-1125, 1998.

KLEIN, B.G. In: **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 1599p.

KONG, S.E.; BAXTER, R.C.; DELHANTY, P.J. Age-dependent regulation of the acid-labile subunit in response to fasting-refeeding in rats. **Endocrinology**, 143 (12): 4505-4512, 2002.

KORBONITS, M.; BLAINE, D.; ELIA, M.; POWELL-TUCK, J. Metabolic and hormonal changes during the refeeding period of prolonged fasting. **European Journal of Endocrinology**, 157: 157-166, 2007.

LADERSON, J.H.; LII-MEI, B.T; MICHAEL, J.M.; KESSLER, G.; HEINZ JOIST, J. Serum versus heparinized plasma for Eighteen common chemistry test: Is serum the appropriate specimen? **American Journal of Clinical Pathology**, 62 (4): 545-552, 1974.

LAESSING, R.H.; INDRIKSONS, A.A.; HASSEMER, D.J.; PASKEY, T.A.; SCHWARTZ, T.H. Change in serum chemical values as a result of prolonged contact with the clot. **American Journal of Clinical Pathology**, 66 (3): 598-604, 1976.

LEWANDOWSKI, A.H.; CAMPBELL, T.W.; HARRISON, G.J. Clinical Chemistries. In: HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Clinical Avian Medicine**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1986, p. 192-200.

LIMA-OLIVEIRA, G.; SALVAGNO, G.L.; LIPPI, G.; GELATI, M.; MONTAGNANA, M.; DANESE, E.; PICHETH, G.; GUIDI, G.C. Influence of a regular, standardized meal on clinical chemistry analytes. **Annals of Laboratory Medicine**, 32 (4): 250-256, 2012.

LIPPI, G.; LIMA-OLIVEIRA, G.; SALVAGNO, G.L.; MONTAGNANA, M.; GELATI, M.; PICHETH, G.; DUARTE, A.J.; FRANCHINI, M.; GUIDI, G.C. Influence of a light meal on routine haematological tests. **Blood Transfusion**, 8 (2): 94-99, 2010.

LOWE Jr, W.L.; ADAMO, M.; WERNER, H.; ROBERTS Jr, C.T.; LEROIYH, D. Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor. Effects on gene expression. and binding. **The Journal of Clinical Investigation**, 84 (2): 619-626, 1989.

LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. Waltham: Academic Press, 2008. p. 839-872.

LUMEIJ, J.T.; MACLEAN, B. Total protein determination in pigeon plasma and serum: comparison of refractometric methods with de biuret method. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, 10: 150-152, 1996.

MAES, M.; UNDERWOOD, L.E.; KETELSLEGRS, J.M. Plasma somatomedin-c in fasted and refeed rats: close relationship with changes in liver somatogenic but not lactogenic binding sites. **Journal of Endocrinology**, 97 (2) 243-252, 1983.

MELILLO, A. Applications of serum protein electrophoresis in exotic pet medicine. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 16 (1): 211-225, 2013.

MENG, Q.H.; KRAHN, J.; Lithium heparinised blood-collection tubes give falsely low albumin results with na automated bromocresol green method in haemodialysis patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 46 (3): 396-400, 2008.

MICHELET, F.; GUEGUEN, R.; LEROY, P.; WELLMAN, M.; NICOLAS, A.; SIEST, G. Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biologicals variables, and life habits. **Clinical Chemistry**, 41 (10): 1509-1517, 1995.

MITCHELL, E.B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice**, 11: 501-522, 2008.

MOE, M. O.; OKSTAD, W.; BERLAND, S.; FRAMSTAD, T. Effects of storage duration and temperature conditions on biochemical analytes in porcine clotted, uncentrifuged blood samples. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, 7 (1): 1-6, 2018.

MOHANTY, K.; MISHRA, S.; PANI, J.; HASAN, T.; PUROHIT, A.; SHARMA, S.; DADA, R. Heparin or EDTA; anticoagulant of choice in free radical estimation? **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, 1 (1): 21-24, 2012.

MOHRI, M.; ALLAHYARI, L.; SARDARI, K. Effects of common anticoagulants on routine plasma biochemistry of horse and comparison with serum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.7, p.313-316, 2007.

MOHRI, M.; SHAKERI, H.; ZADEH, S.L. Effect of common anticoagulants (heparina, citrate and EDTA) on routine plasma biochemistry of cattle. **Comparative Clinical Pathology**, 16 (3): p.207-209, 2007.

MOHRI, M.; REZAPOOR, H. Effects of heparina, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of sheep: comparison with serum. **Research in Veterinary Science**, 86: p.111-114, 2009.

MURRAY, R.K.; BENDER, D.A.; BOTHAM, K.M.; KENNELLY, P.J.; RODWELL, V.W.; WEIL, A.P. **Harper's illustrated biochemistry**. 28 ed. USA: McGraw-Hill Companies, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250p.

NUNES, R.V.; BROCH, J.; WACHHOLZ, L.; DE SOUZA, C.; DAMASCENO, J.L.; OXFORD, J.H.; BLOXHAM, D.J.; BILLARD, L.; PESTI, G.M. Choosing sample sizes for vários blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. **Poultry Science**, 97: 3746-3754, 2018.

ODDOZE, C.; LOMBARD, E.; PORTUGAL, H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. **Clinical Biochemistry**, 45, 464-469, 2012.

OLANREWaju, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effect of ambiente temperature and light intensity on physiological reactions of heavy broiler chickens. **Poultry Science**, 89: 2668-2677, 2010.

OLANREWaju, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Interactive effects of photoperiod and light intensity on blood physiological and biochemical reactions of broilers grow to heavy weights. **Poultry Science**, 92: 1029-1039, 2013.

OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effects of color temperature (Kelvin) of LED bulbs on blood physiological variable of broilers grown to heavy weights. **Poultry Science**, 94: 1721-1728, 2015.

OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effects of color temperature (Kelvin) of LED bulbs on the growth performance, carcass characteristics, and acular development índices on bloilers grown to heavy weights. **Poultry Science**, 94: 338-344, 2015b.

OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effects of lighth ingress through ventilation fan apertures on selected blood variables of male broilers. **Internatonal Journal of Poultry Science**. 16 (8): 288-295, 2017.

OLIVEIRA, F. S.; FALBO, M. K.; SANDINI, I. E.; ISHIY, L. E. Efeito do congelamento e do tempo de armazenamento do soro sanguíneo de cordeiros na determinação de parâmetros bioquímicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 717-722, 2011.

RAJMAN, M.; JURÁNI, M.; LAMOSOVA, D.; MACAJOVA, M.; SEDLACKOVA, M.; KOSTAL, L.; JEZOVA, D.; VYBOH, P. The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens (*Gallus gallus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular Integrative Physiology**, 145 (3): 363-371, 2006.

REECE, W.O. In: **Duke`s Physiology of Domestic Animals**. 13th. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2015.

ROMAN, Y.; ORDONNEAU, D.; CHASTE-DUVEROY, D.; SAINT JALME, M.; BOMSEL, M.C.; HINGRAT, Y. In: **Proceeding 8<sup>th</sup> Conference European Association Avian Veterinarians Arles**, p.290-297, 2005.

RUSSELL, K.; ROUSSEL, A. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics Food and Animal Practice**, 23: 403-426, 2007.

SACKS, D.B.; ARNOLD, M., BAKRIS, G.L.; BRUNS, D.E.; HORVATH, A.R.; KIRKMAN, M.S.; LERNMARK, A.; METZGER, B.E.; NATHAN, D.M. Executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clinical Chemistry**, 57 (6): 793-798, 2011.

SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; FERNANDES, J.B.K. **Nutrição de não Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014, 678p.

SALAZAR, J.F.; HERBETH B.; SIEST, G.; LEROY, R. Stability of blood homocysteine and ather thiols: EDTA or acidic citrate. **Clinical Chemistry**, 45 (11): 2016-2019, 1999.

SAVENIJE, B.; LAMBOOIJ, E.; GERRITZEN, M.A.; VENEMA, K.; KORF, J. Effect of fed deprivation and transport on preslaughter blood metabolites, early post-mortem muscle metabolites, and meat quality. **Poultry Science**, 81: 699-708, 2002.

SCANES, C.G. **Sturkie`s Avian Physiology**. 6th, Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 2014, 1028p.

SILVA, B.R.; MAREZE, M.; FALBO, M.K.; SANDINI, I.E.; GROFF, P.M. Bioquímico plasmático de cães: efeitos dos diferentes anticoagulantes em comparação ao soro. **Colloquium Agrariae**, v.11, n.1, p.33-41, 2015.

SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. **Fundamentos da circulação extracorpórea**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, 2006, 808p.

STOKOL, T.; TARRANT, J.M.; SCARLETT, J.M. Overestimation of canine albumin concentration with bromocresol green method in heparinized plasma samples. **Veterinary Clinical Pathology**, 30 (4): 170-176, 2001.

TANG, F.; MESSINGER, S.; CRAY, C. Use of an indirect sampling method to produce reference intervals for hematologic and biochemical analyses in psittaciform species. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, 27 (3): 194-203, 2013.

THISSEN, J.P.; KETELSLEGERS, J.M.; UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocrine Reviews**, 15 (1): 80-101, 1994.

THORESEN, S.I.; HAVRE, N.G.; MORBERG, H.; MOWINCKEL, P. Effects of storage time on chemistry results from canine whole blood, heparinized whole blood, serum and heparinized plasma. **Veterinary Clinical Pathology**, 21 (3): 88-94, 1992.

THRALL M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSSEN, E.D.; REBAR, A., WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 618p.

TOTHOVA, C.; NAGY, O.; SEIDEL, H.; KOVAC, G. The effect of storage temperature and time on the concentrations of bovine serum amyloid A and its mammary associated isoform. **Veterinary Medicine International**, 2012, ID 861458, 6p., DOI: 10.1155/2012/861458

UNGER, J.; FILLIPI, G.; PATSH, W. Measurements of free hemoglobina and hemolysis index: EDTA or lithium-heparine plasma? **Clinical Chemistry**, 53 (9): 1717-1718, 2007.

VILA, L.G. Bioquímica em Aves: Revisão de Literatura. **Seminário** – Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária e Zootecnia. Goianía – GO, 46p. 2013.

WILLEMS, H.P.; BOS, G.M.; GERRITS, W.B.; DEN HEIJER, M.; VLOET, S.; BLOM, H.J. Acidic citrate stabilizes blood samples for assays of total homocysteine. **Clinical Chemistry**, 44 (2): 342-345, 1998.

WITTEWER, F. Empleo de los perfiles metabólicos em el diagnóstico de desbalances metabólicos nutricionales em el ganado. **Buiatria**, 2: 16-20, 1995.

### 3 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE JEJUM E DE ESTOCAGEM SOBRE INDICADORES BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS EM FRANGOS DE CORTE

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho de delineamento inteiramente casualizado com estrutura de tratamento fatorial 7 x 3 x 2 foi avaliar o efeito de 7 tempos de jejum, 3 tempos de armazenamento em 2 frações sanguínea soro e plasma (fluoreto de sódio e EDTA K<sub>3</sub>), sobre as concentrações de proteínas totais, albumina, globulina, ácido úrico creatinina e atividade da enzima fosfatase alcalina, em frangos de corte aos 45 dias de idade. Foram utilizados 70 frangos de corte, machos Cobb 500, com 45 dias de idade distribuídos em 7 boxes (10 aves por box). Cada box representou um dos 7 tempos de jejum. O sangue foi coletado por meio de punção da veia ulnar em intervalos de 2 horas durante o jejum de 12 horas (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h) As frações soro e plasma foram coletadas após centrifugação e analisadas após 0, 30 e 60 dias de armazenamento em microtubos a - 20 °C. Não houve efeito dos tempos de jejum e estocagem sobre as concentrações séricas e plasmáticas de proteínas totais, albumina e globulina. Houve efeito de estocagem para ácido úrico, creatinina e fosfatase alcalina com aumento das concentrações séricas e plasmáticas para ácido úrico e redução na concentração de creatinina e atividade sérica da fosfatase alcalina com o aumento do tempo de estocagem. No soro, creatinina e fosfatase alcalina apresentaram efeito quadrático, com concentração máxima de 0,208 mg dL<sup>-1</sup> com 4 horas e 32 minutos de jejum e com concentração mínima de 2933 IU L<sup>-1</sup> com 8 horas de jejum, respectivamente. No plasma, proteínas totais, albumina, e creatinina apresentaram efeito quadrático para tempo de jejum, com máxima concentração de 35,46 g L<sup>-1</sup> com 7 horas e 48 minutos para proteínas totais, 15,36 g L<sup>-1</sup> com 10 horas e 48 minutos para albumina, 0,18 mg dL<sup>-1</sup> com 7 horas e 46 minutos para creatinina. Para as análises de proteínas totais, albumina e globulina, pode ser utilizado soro e plasma, tempo de jejum de 12 horas e estocagem por até 60 dias a - 20 °C. Para as análises de ácido úrico, podem ser utilizadas ambas as frações soro ou plasma, porém recomenda-se a análise imediata após a colheita da amostra, podendo ser utilizado 12 horas de jejum. Recomenda-se a utilização do soro para análise de creatinina e atividade da fosfatase alcalina, com armazenamento de 30 dias a - 20 °C.

**Palavras chave:** bioquímica sanguínea, metabolismo, soro, plasma, analitos

## INFLUENCE OF FASTING TIME AND STORAGE ON BLOOD BIOCHEMICAL INDICATORS IN CHICKENS.

### ABSTRACT

The objective of this completely randomized design study with a 7 x 3 x 2 factorial treatment structure was to evaluate the effect of 7 fasting times, 3 storage times in 2 blood serum and plasma fractions (sodium fluoride and EDTA K3) on the concentrations of total proteins, albumin, globulin, uric acid, creatinine and alkaline phosphatase enzyme activity, in broilers at 45 days of age. 70 broilers, male Cobb 500, with 45 days of age distributed in 7 boxes (10 birds per box) were used. Each box represented one of the 7 fasting times. Blood was collected via ulnar venipuncture at 2-hour intervals during a 12-hour fasting period (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h). Serum and plasma fractions were collected after centrifugation and analyzed after 0, 30 and 60 days of storage in microtubes at -20 °C. There was no effect of fasting and storage times on serum and plasma concentrations of total proteins, albumin and globulin. There was a storage effect for uric acid, creatinine and alkaline phosphatase with increasing serum and plasma concentrations for uric acid and a reduction in creatinine concentration and serum alkaline phosphatase activity as the storage time increasing. In serum, creatinine and alkaline phosphatase showed a quadratic effect, with a maximum concentration of 0.208 mg dL<sup>-1</sup> with 4 hours and 32 minutes of fasting and with a minimum concentration of 2933 IU L<sup>-1</sup> with 8 hours of fasting, respectively. In plasma, total proteins, albumin, and creatinine showed a quadratic effect for fasting time, with maximum concentration of 35.46 g L<sup>-1</sup> at 7 hours and 48 minutes for total proteins, 15.36 g L<sup>-1</sup> at 10 hours and 48 minutes for albumin, 0.18 mg dL<sup>-1</sup> with 7 hours and 46 minutes for creatinine. For the analysis of total proteins, albumin and globulin, serum and plasma can be used, fasting time of twelve hours and storage for up to 60 days at -20 °C. For uric acid analyses, both serum or plasma fractions can be used, however, immediate analysis is recommended after sample collection, and 12 hours of fasting can be used. It is recommended to use serum for analysis of creatinine and alkaline phosphatase activity, with storage for 30 days at -20 °C.

**Keywords:** blood biochemistry, metabolism, serum, plasma, analytes

### 3.1 Introdução

Diferenças anatômicas e fisiológicas entre aves e mamíferos afetam os valores bioquímicos do sangue bem como sua avaliação. A interpretação dos resultados das análises bioquímicas com um padrão já conhecido pode auxiliar no diagnóstico ou comparativo (HARR, 2002).

A avaliação bioquímica do plasma em aves permite a identificação de alterações metabólicas, que podem estar associadas a fatores genéticos, condições de manejo, idade, estado fisiológico ou patológico (HARR, 2002; ALONSO-ALVAREZ, 2005).

Os experimentos com frangos de corte visam principalmente avaliar o desempenho das aves, sem comprometer o metabolismo e integridade sanitária dos animais. Neste sentido, as análises bioquímicas do sangue são importantes ferramentas para o diagnóstico de enfermidades e distúrbios metabólicos, proporcionando diagnóstico de maneira rápida, segura e eficiente (YARI et al., 2014).

O tempo de jejum anterior à colheita do sangue compõe a fase pré-analítica na área clínica, pois pode influenciar os resultados podendo interferir na precisão dos diagnósticos (LIPPI et al., 2010; LIMA-OLIVEIRA et al., 2012). O jejum ou sua utilização errônea pode influenciar nos resultados obtidos, portanto, a padronização do tempo de jejum se torna essencial para evitar resultados equivocados (LIMA-OLIVEIRA et al., 2012). Segundo Harr (2002) a utilização de 12 horas de jejum é comumente utilizada em frangos de corte para a colheita de amostras de sangue para análises bioquímicas.

As proteínas totais no sangue, são comumente utilizadas para estimar a condição corporal das aves. Sendo que a albumina, atua como o principal meio de transporte de nutrientes na corrente sanguínea e pode ser utilizada como fonte de proteína em condições de baixa ingestão de nutrientes ou em jejum, apresentando valores baixos em condições de restrição alimentar em aves (YAMAN et al., 2000a).

O principal produto residual do metabolismo do nitrogênio em aves é o ácido úrico (Harr, 2002), atua como regulador potente do estresse oxidativo. Concentrações aumentadas de ácido úrico estão associados ao jejum e restrição alimentar (ALONSO-ALVAREZ & FERRER, 2001).

A creatinina é subproduto do metabolismo muscular, proveniente do metabolismo da fosfocreatina músculo-esquelética (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Suas concentrações são diretamente proporcionais a massa muscular e inversamente em relação à



idade. Existem evidências de que o aumento nas concentrações de creatinina esteja relacionado à redução da ingestão de ração, jejum ou outros agentes estressores (WORK et al., 1999).

Os níveis plasmáticos de cálcio e fósforo são dependentes da dieta e refletem intensa atividade osteoblástica comum ao metabolismo ósseo, necessária para o crescimento. Modificações nas concentrações de cálcio e fósforo podem estar relacionadas a atividade da fosfatase alcalina, esta enzima está associada ao metabolismo desses dois minerais, atuando como mecanismo regulatório no crescimento das aves (VIÑUELA & FERRER, 1997).

Aumento da atividade da fosfatase alcalina, pode ser indicativo de lesão hepática biliar (colestase), que consiste na obstrução do ducto biliar, impedindo o fluxo do fígado para o duodeno. Na colestase metabólica ocorre distúrbio na produção da bile, por razão genética ou efeito colateral de algum medicamento. Quando isso ocorre há dano nos hepatócitos o que eleva a secreção de fosfatases de forma indireta (GONZALEZ & SILVA, 2006).

Gatilhos fisiológicos são ativados em respostas à ingestão de alimento, o que pode afetar os resultados bioquímicos do sangue. A ingestão de alimento aumenta a secreção de ácido clorídrico no estômago e de bicarbonato no sangue (JOHNSON et al., 1995). Além disso, há o estímulo dos hormônios insulina e glucagon, fazendo com que os nutrientes passem para a corrente sanguínea. Portanto, a ingestão de alimento pode causar alterações nos componentes séricos e plasmáticos (BATTERHAM et al., 2002; KORBONITS et al., 2007).

A maioria dos analitos sanguíneos são estáveis a 4 °C por até 36 horas, no entanto, quando a análise das amostras é realizada no longo prazo (meses ou anos) a estocagem a -20 °C é necessária (Russel e Russel, 2007). Dados de literatura, com diferentes espécies, demonstraram que a estocagem inadequada de amostras, tanto soro como plasma, é fonte potencial de erros pré-analíticos, que podem interferir nos resultados das concentrações de diversos analitos (DIVIA & JAYAVARDHANAN, 2010; OLIVEIRA et al., 2011; ODDOZE, et al., 2012; CUHADAR et al., 2013; MOE et al., 2018).

Todavia, são poucos os dados de literatura que relatam a influência do tempo de estocagem de amostras e seu efeito na concentração ou atividade enzimática das variáveis bioquímicas do sangue em frangos de corte, bem como da estabilidade dos parâmetros bioquímicos em amostras estocadas sob refrigeração, ou congelamento por longos períodos (TOTHOVA et al., 2012).

O presente estudo visou avaliar a hipótese de que o jejum e o tempo de armazenamento (congelamento a -20 C°), têm efeito sobre a estabilidade de amostras de soro e plasma sanguíneo de frangos de corte, para análises bioquímicas após centrifugação. Para tanto foram analisadas

amostras de soro e plasma para os parâmetros bioquímicos: proteínas totais, albumina, globulina, ácido úrico, creatinina e fosfatase alcalina.

### 3.2 Material e Métodos

Este estudo foi realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, no aviário experimental do Centro de Pesquisa em Avicultura do Núcleo de Estações Experimentais Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente ao *Campus* de Marechal Cândido Rondon-PR. Os cuidados com as aves foram tomados com o propósito de atender ao bem-estar animal e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Unioeste (CEUA) sob protocolo nº 23/20.

Para este trabalho um total de 70 pintos, machos, da linhagem Cobb 500, foram criados até 42 dias de idade ( $3072 \pm 859$ g), recebendo água e ração *ad libitum*, e os mesmos cuidados em relação ao manejo, iluminação e temperatura recomendados pelo manual da linhagem. As dietas foram formuladas para atender as necessidades nutricionais de cada fase de criação das aves de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2017), divididas em três fases de alimentação (inicial, crescimento e final).

Aos 42 dias de idade as aves foram redistribuídas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em sete boxes ( $1,76 \text{ m}^2$ ), com 10 aves por box, com densidade de 5,7 aves por  $\text{m}^2$ . Os boxes estavam equipados com bebedouros tipo *nipple* e um comedouro tubular. O piso possuía uma camada de 10 cm de maravalha de pinus.

Aos 45 dias de idade, as aves foram mantidas em jejum por uma hora e, em seguida, foram alimentadas por 30 minutos. Este procedimento foi adotado para que todas as aves apresentassem o mesmo quadro alimentar pós-prandial. Após esse período de arraçoamento foi realizada a primeira colheita de sangue. Cada um dos sete boxes representou um tempo de jejum diferente para a colheita de sangue (0; 2; 4; 6; 8; 10; e 12 horas). Cabe ressaltar que para fins de colheita do sangue cada ave pertencente ao mesmo box foi considerada como sendo uma unidade experimental.

Em cada um dos boxes foram colhidos aproximadamente 16 mL de sangue de cada unidade experimental, 8 mL em cada tubo, sendo a primeira amostra colhida para obtenção do soro em tubo (BD Vacutainer®) seco para soro com ativador de coágulo (sílica em pó) jateado na parede do tubo. A segunda amostra colhida foi utilizada para obtenção do plasma em tubo (BD Vacutainer®) com inibidor glicolítico fluoreto de sódio 5 mg e anticoagulante EDTA – K<sub>3</sub> 4 mg. Após a colheita as amostras permaneceram 15 minutos em posição horizontal e, em seguida, foram centrifugadas a 2500 rpm (1050G) por 10 minutos.

A escolha do anticoagulante fluoreto de sódio + EDTA-K<sub>3</sub>, se deu pelo fato de haver poucos trabalhos avaliando o mesmo em amostras sanguíneas para aves.

Após centrifugação e separação do soro e plasma, as amostras foram identificadas e divididas em três alíquotas, as quais foram acondicionadas em microtubos de 2 mL (Eppendorf®) sendo uma alíquota encaminhada imediatamente ao laboratório para realização das análises. As demais alíquotas (dois microtubos) foram estocadas a -20 °C, por períodos de 30 e 60 dias.

Para realização das leituras as amostras foram descongeladas sob refrigeração (4 °C), permanecendo em geladeira por 24 horas. Antes da realização das análises as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga para retirada de possível formação de fibrina. As leituras foram realizadas nos tempos 0, 30 e 60 dias de estocagem, por meio de espectrofotometria utilizando analisador bioquímico automático Flexor EL 200 da marca Elitech® (Elitechgroup, Netherlands) utilizando reagentes, calibradores (Elical II) e padrões de aferição (Elitrol I) da marca Elitech®. As leituras dos indicadores bioquímicos foram as seguintes: proteínas totais, albumina, globulina, ácido úrico, creatinina e fosfatase alcalina.

A determinação da concentração de proteínas totais (Total Protein Plus) foi realizada pelo método de biureto de ponto final. O princípio do método de biureto consiste na formação de um complexo colorido entre proteínas e sais de cobre em meio alcalino, sendo a leitura realizada a 546 nm (RIFAI et al., 2018). A determinação da albumina baseou-se no método colorimétrico verde de bromocresol (BCG) onde em pH ácido (4,20) o verde de bromocresol fixa-se seletivamente a albumina, conferindo-lhe coloração azul, sendo a leitura realizada a 620 nm (DOUMAS & BIGGS, 1972; WU, 2006). Os valores de globulina foram obtidos pela diferença entre proteínas totais e albumina. As leituras de ácido úrico foram realizadas com base no método Trinder, enzimático colorimétrico de ponto final (TRINDER, 1969), a 540 nm. A determinação dos valores de creatinina (Creatinine Jaffe) baseou-se no método de Jaffe colorimétrico cinético, onde é medida a taxa de formação do complexo colorido formado entre a creatinina e picrato alcalino, leituras realizadas a 500 nm, onde o efeito de substâncias interferentes é reduzido utilizando-se o procedimento cinético (RIFAI et al., 2018). A atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP – DEA SL) foi mensurada pelo método enzimático cinético, baseado nas recomendações da Sociedade Germânica de Química Clínica (DGKC). Na presença de íons magnésio e de dietanolamina como aceptor de fosfato, o *p*-nitrofenilfosfato é decomposto pelas fosfatases alcalinas em fosfato e *p*-nitrofenol, formando um composto amarelo sendo as leituras realizadas a 405 nm (HENDERSON & DONALD, 2001).

Após as leituras das amostras e obtenção dos dados analíticos, estes foram tabulados para realização das análises estatísticas em esquema fatorial 2 x 7 x 3 para fração sanguínea (soro ou plasma), tempo de jejum (0; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas) e tempo de estocagem (0; 30 e

60 dias). Os dados foram submetidos a teste de homogeneidade e normalidade, para posterior análise de variância sendo os testes realizados a 5% de probabilidade. Em caso de significância foi realizado teste F para fração sanguínea (soro ou plasma) e análise de regressão para tempo de jejum. Adicionalmente foi aplicado o teste de Scott-Kontt para tempo de jejum e tempo de estocagem, com o objetivo de separar os tratamentos em grupos homogêneos evitando-se a sobreposição de médias. As interações de interesse para este estudo foram apenas as interações duplas, fração sanguínea (soro ou plasma) e tempo de jejum, e fração sanguínea e tempo de estocagem. Porém, mesmo não havendo interação as mesmas foram apresentadas, sendo avaliado os efeitos principais, tempo de jejum e estocagem em cada amostra para os parâmetros bioquímicos estudados. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o pacote GLM do SAS (SAS, 2014).

Modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + J_i + E_j + F_k + (J.E)_{ij} + (J.F)_{ik} + (E.F)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que:

$Y_{ijk}$  = valor da variável em estudo referente ao tratamento  $ijk$ ;

$m$  = média de todas as unidades experimentais;

$J_i$  = efeito do jejum;

$E_j$  = efeito da estocagem;

$F_k$  = efeito da fração sanguínea;

$J.E_{ij}$  = efeito de interação entre jejum e estocagem;

$J.F_{ik}$  = efeito de interação entre jejum e fração sanguínea;

$E.F_{jk}$  = efeito de interação entre estocagem e fração sanguínea;

$\varepsilon_{ijk}$  = erro associado a cada observação  $Y_{ijk}$ ;

### 3.3 Resultados

Houve diferença entre as frações sanguíneas (soro ou plasma) nos tempos de 0 e 2 horas de jejum para proteínas totais e albumina, com maior concentração no soro em relação ao plasma. Comportamento semelhante foi observado para globulinas, porém para os tempos de 2 e 12 horas de jejum. Não houve efeito dos tempos de jejum e estocagem sobre as concentrações de proteínas totais, albumina e globulina nas diferentes frações sanguíneas. (Tabela 1).

Tabela 1. Médias das concentrações de proteínas totais, albumina e globulina no soro e plasma sanguíneo de frangos de corte, aos 45 dias de idade, submetidos a diferentes tempos de jejum e períodos de estocagem das amostras

Jejum (horas)	Proteínas Totais g L <sup>-1</sup>		Albumina g L <sup>-1</sup>		Globulina g L <sup>-1</sup>	
	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma
0	34,32±2,54 <sup>a</sup>	32,74±2,70 <sup>b</sup>	14,37±0,70 <sup>a</sup>	13,78±0,74 <sup>b</sup>	19,95±2,11	18,96±2,53
2	36,25±4,07 <sup>a</sup>	33,66±3,19 <sup>b</sup>	15,48±1,10 <sup>a</sup>	14,44±0,95 <sup>b</sup>	20,78±3,45 <sup>a</sup>	19,22±2,46 <sup>b</sup>
4	35,81±3,71	37,42±5,49	15,27±1,28	15,76±1,43	20,54±2,79	21,65±4,93
6	33,91±2,90	33,85±3,46	14,44±0,86	14,48±1,12	19,48±2,46	19,37±1,12
8	35,52±3,27	35,18±3,26	15,38±0,80	15,20±0,64	20,15±3,01	19,99±2,73
10	35,86±3,23	34,84±3,58	15,56±0,95	15,08±1,16	20,30±2,54	19,76±2,64
12	36,55±3,33	35,29±2,65	15,64±1,12	15,61±1,11	20,91±2,52 <sup>a</sup>	19,68±1,99 <sup>b</sup>
<b>Estocagem (dias)</b>						
0	35,67±3,56	34,87±3,70	15,10±0,96	14,97±1,07	20,57±2,92	19,90±2,98
30	35,53±3,27	34,89±3,70	15,01±1,08	14,81±1,04	20,51±2,59	20,08±3,17
60	35,19±3,40	34,37±4,02	15,37±1,20	14,94±1,52	19,82±2,64	19,43±3,01
Média	35,30±3,21	34,34±3,27	15,16±1,09 <sup>a</sup>	14,85±1,14 <sup>b</sup>	20,07±2,45	19,49±2,49
C.V (%)	9,11	9,51	7,20	7,69	12,23	12,76
EPM	3,41	3,81	1,09	1,23	2,72	3,05
<i>P Value</i>						
Jejum	0,9222	0,4177	0,6303	0,0948	0,1143	0,1163
Estocagem	0,6908	0,6633	0,1419	0,7144	0,1964	0,4345
Fração sanguínea		0,0650		0,0109		0,0762
Fração sanguínea * Jejum		0,5947		0,3328		0,1920
Fração sanguínea * Estocagem		0,9719		0,4252		0,9055
Jejum * Estocagem		0,3899		0,1160		0,1022

CV: Coeficiente de variação; EPM: Erro Padrão da média; P: Significância da análise de variância; Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.

Para a concentração de ácido úrico houve diferença entre as frações sanguíneas para o período de 10 horas de jejum, com maior concentração no plasma. Os demais tempos de jejum não apresentaram influência sobre os valores de ácido úrico sérico ou plasmático, quando analisado de forma individual em cada tempo de jejum. Comportamento semelhante pode ser observado para as concentrações de creatinina e para atividade da fosfatase alcalina, diferindo, no entanto, os tempos de jejum entre estas variáveis, com maior concentração no soro (Tabelas 2).

A creatinina apresentou maior concentração no soro em relação ao plasma nos períodos de 0, 2, 6 e 8 horas de jejum. A atividade da fosfatase alcalina foi maior no soro do que no plasma, em todos os períodos de jejum exceto no tempo de 8 horas.

Houve efeito dos tempos de estocagem das amostras (0, 30 e 60 dias), sobre concentrações séricas e plasmáticas de ácido úrico ( $p < 0,0001$ ) e creatinina ( $p = 0,0184$ ;  $0,0010$ ) e sobre atividade da fosfatase alcalina no soro ( $p = 0,0198$ ). Para o ácido úrico observou-se aumento dos valores séricos e plasmáticos a medida que aumenta o tempo de estocagem, já para creatinina e fosfatase alcalina observou-se redução de suas concentrações a medida que aumenta o tempo de estocagem.

A concentração de ácido úrico apresentou interação entre tempo de estocagem e tipo de amostra ( $p = 0,0010$ ). Para creatinina foi observado efeito de interação entre tipo de amostra e tempo de estocagem ( $p = 0,0033$ ), e entre tempo de jejum e tempo de estocagem ( $p = 0,0068$ ). A atividade da fosfatase alcalina apresentou efeito de interação entre tipo de amostra e tempo de jejum ( $p = 0,0010$ ).

Tabela 2. Médias das concentrações de ácido úrico, creatinina e atividade da fosfatase alcalina no soro e plasma sanguíneo de frangos de corte, aos 45 dias de idade, submetidos a diferentes tempos de jejum e períodos de estocagem das amostras

Jejum (horas)	Ácido Úrico mg dL <sup>-1</sup>		Creatinina mg dL <sup>-1</sup>		Fosfatase Alcalina IU L <sup>-1</sup>	
	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma
0	3,94±1,05	4,22±0,92 <sup>A</sup>	0,19±0,02 <sup>a</sup>	0,12±0,03 <sup>Bb</sup>	3529±940 <sup>a</sup>	2412±1147 <sup>Ab</sup>
2	2,97±1,08	3,05±0,61 <sup>B</sup>	0,20±0,04 <sup>a</sup>	0,15±0,03 <sup>Bb</sup>	3108±1085 <sup>a</sup>	2041±1383 <sup>Ab</sup>
4	3,45±1,26	3,86±1,53 <sup>B</sup>	0,18±0,03	0,17±0,03 <sup>B</sup>	3061±890 <sup>a</sup>	1472±975 <sup>Cb</sup>
6	3,85±1,06	3,98±1,00 <sup>A</sup>	0,23±0,03 <sup>a</sup>	0,20±0,04 <sup>Ab</sup>	3189±798 <sup>a</sup>	1749±778 <sup>Bb</sup>
8	3,42±0,95	3,52±0,67 <sup>B</sup>	0,20±0,03 <sup>a</sup>	0,18±0,03 <sup>Bb</sup>	2945±1040	2432±1047 <sup>A</sup>
10	2,92±0,84 <sup>b</sup>	3,55±0,86 <sup>Ba</sup>	0,17±0,05	0,16±0,03 <sup>B</sup>	2698±810 <sup>a</sup>	1833±1108 <sup>Bb</sup>
12	3,69±0,88	3,70±0,91 <sup>B</sup>	0,16±0,04	0,18±0,05 <sup>A</sup>	3201±662 <sup>a</sup>	1219±550 <sup>Cb</sup>
<b>Estocagem (dias)</b>						
0	2,76±0,86 <sup>Cb</sup>	3,40±1,00 <sup>Ba</sup>	0,20±0,03 <sup>Aa</sup>	0,18±0,05 <sup>Ab</sup>	3307±807 <sup>Aa</sup>	1997±1089 <sup>b</sup>
30	3,39±0,82 <sup>B</sup>	3,57±0,91 <sup>B</sup>	0,19±0,04 <sup>Ba</sup>	0,17±0,04 <sup>Ab</sup>	3149±927 <sup>Aa</sup>	1864±1102 <sup>b</sup>
60	4,25±0,98 <sup>A</sup>	4,13±1,02 <sup>A</sup>	0,18±0,05 <sup>Ba</sup>	0,15±0,04 <sup>Bb</sup>	2857±966 <sup>Ba</sup>	1778±1106 <sup>b</sup>
Média	3,47±1,01	3,63±0,93	0,19±0,04 <sup>a</sup>	0,16±0,04 <sup>b</sup>	3104±918 <sup>a</sup>	1880±1097 <sup>b</sup>
C.V (%)	29,09	25,53	19,90	24,66	29,56	58,38
EPM	0,89	0,97	0,04	0,04	903	1099
<i>P Value</i>						
Jejum	0,1673	0,0002	0,1763	0,0061	0,0511	<0,0001
Estocagem	<0,0001	<0,0001	0,0184	0,0010	0,0198	0,4951
Fração sanguínea	0,3075		<0,0001		<0,0001	
Fração sanguínea * Jejum	0,4184		0,1107		0,0010	
Fração sanguínea * Estocagem	0,0010		0,0033		0,5464	
Jejum * Estocagem	0,2650		0,0068		0,4549	

CV: Coeficiente de variação; EPM: Erro Padrão da média; P: Significância da análise de variância; Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



No soro sanguíneo houve efeito cúbico dos tempos de jejum com melhor ajuste das equações de regressão para os valores de proteínas totais ( $p = 0,0555$ ;  $R^2 = 0,48$ ) e albumina ( $p = 0,0240$ ;  $R^2 = 0,47$ ). Para a creatinina ( $p < 0,0001$ ) e a atividade da fosfatase alcalina ( $p = 0,0588$ ) houve efeito quadrático, onde a creatinina apresentou valor máximo de  $0,208 \text{ mg dL}^{-1}$  com 4 horas e 32 minutos de jejum, e a atividade da fosfatase alcalina apresentou valor mínimo de  $2933,31 \text{ IU L}^{-1}$  com 8 horas de jejum, respectivamente (Tabela 3). Para ácido úrico e globulina os dados não se ajustaram aos modelos de regressão estudados, bem como as equações de regressão para proteínas totais e a equação cúbica para a atividade da fosfatase alcalina não foram significativas.

Tabela 3. Equações de regressão para predição de proteínas totais, albumina, creatinina e fosfatase alcalina em amostras de soro sanguíneo de frangos de corte aos 45 dias de idade em função do tempo de jejum

Jejum				
Variável	Equação de regressão	PC	$R^2$	<i>P-Value</i>
Pt. totais	$- 0,10042*PT + 34,85893$		0,19	0,0871
Pt. totais	$0,01007*PT^3 - 0,16721*PT^2 + 0,73747*TP + 34,65643$	5,57	0,48	0,0555
Albumina	$0,07270*ALB + 14,72487$		0,35	<0,0001
Albumina	$0,0037*ALB^3 - 0,06541*ALB^2 + 0,35473*ALB + 14,57037$	5,89	0,47	0,0240
Creatinina	$- 0,00271*CRT + 0,20711$		0,19	<0,0001
Creatinina	$- 0,00092163*CRT^2 + 0,00835*CRT + 0,18867$	4,53	0,55	<0,0001
Fos. alcalina	$- 34,24583*FA + 3309,90833$		0,34	0,0302
Fos. alcalina	$8,55228*FA^2 - 136,87321*FA + 3480,95397$	8,00	0,59	0,0588

PC: Ponto crítico obtido da derivação da equação quadrática e cúbica; *P-Value*: Valor de p da equação de regressão.

No plasma sanguíneo, as concentrações de proteínas totais ( $p = 0,0383$ ), albumina ( $p = 0,0445$ ) e creatinina ( $p < 0,0001$ ) apresentaram efeito quadrático. Para proteínas totais obteve-se valor máximo de  $35,46 \text{ g L}^{-1}$  com 7 horas e 48 minutos, para albumina valor máximo de  $15,36 \text{ g L}^{-1}$  com 10 horas e 48 minutos e para a creatinina valor máximo de  $0,18 \text{ mg dL}^{-1}$  com 7 horas e 46 minutos de jejum (Tabela 4).

A atividade de fosfatase alcalina apresentou tanto efeito linear ( $p = 0,0040$ ;  $R^2 = 0,27$ ) quanto cúbico, sendo este último, com melhor ajuste de regressão ( $p < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,78$ ). Também observou-se efeito cúbico para as variáveis proteínas totais, albumina e creatinina com melhor ajuste para o modelo de regressão (Tabela 4). Os dados de ácido úrico e globulina não

se ajustaram à um modelo de regressão. A equação de regreção cúbica para creatinina não foi significativa.

Tabela 4. Equações de regressão para predição de proteínas totais, albumina, globulina, creatinina e fosfatase alcalina em amostras de plasma sanguíneo de frangos de corte aos 45 dias de idade em função do tempo de jejum

Jejum				
Variável	Equação de regressão	PC	R <sup>2</sup>	<i>p-Value</i>
Pt. totais	$-0,03883*PT^2 + 0,6049*PT + 33,10093$	7,79	0,31	0,0383
Pt. totais	$0,01247*PT^3 - 0,26326*PT^2 + 1,60240*PT + 32,50243$	7,04	0,47	0,0314
Albumina	$0,11058*ALB + 14,24393$		0,46	<0,0001
Albumina	$-0,01146*ALB^2 + 0,24808*ALB + 14,01476$	10,82	0,52	0,0445
Albumina	$0,00607*ALB^3 - 0,12079*ALB^2 + 0,73401*ALB + 13,72321$	6,63	0,69	0,0005
Creatinina	$0,00392*CRT + 0,14021$		0,40	<0,0001
Creatinina	$-0,00111*CRT^2 + 0,01725*CRT + 0,11799$	7,77	0,76	<0,0001
Creatinina	$0,00010185*CRT^3 - 0,00294*CRT^2 + 0,0254*CRT + 0,1131$	9,61	0,83	0,0675
Fos. alcalina	$-54,16964*FA + 2204,78929$		0,27	0,0040
Fos. alcalina	$-6,75093*FA^3 + 119,8781*FA^2 - 574,58062*FA + 2496,0619$	5,92	0,78	<0,0001

PC: Ponto crítico obtido da derivação da equação quadrática e cúbica; *p-Value*: Valor de p da equação de regressão.

### 3.4 Discussão

O estresse oxidativo, causado pela exposição das aves ao calor ou jejum, leva à formação de espécies de oxigênio reativo (radicais livres) (Khan et al., 2012; Majid et al., 2015; Chand et al., 2018), que resulta em desnaturação de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e enzimas. A redução de ingestão de proteína, seja através do jejum ou redução na dieta, pode causar deficiência de aminoácidos essenciais e levar a alterações significativas nas concentrações de proteínas totais no sangue (Laudadio et al., 2012). No entanto, o período de jejum de até 12 horas avaliado neste trabalho, parece não ter influenciado de forma expressiva a concentração de proteínas totais no sangue, visto que o metabolismo das aves tende a buscar pela homeostase.

As concentrações de proteínas totais, albumina e globulinas não apresentaram grandes oscilações em seus valores, tanto no soro como no plasma o que pode ser reflexo do consumo *ad libitum* das aves, anterior aos tempos de jejum avaliados. Os valores para concentração de albumina sérica encontrados neste estudo, são 11,86% inferiores aos reportados por Silva et al. (2007), que avaliaram o perfil bioquímico sanguíneo de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Po outro lado, os resultados para proteínas totais no soro foi 11,40% superior ao encontrado por Chand et al. (2018), que avaliaram o perfil bioquímico sanguíneo em amostras de soro, de diferentes linhagens de frangos de corte em ambiente termo-neutro e alta temperatura, aos 42 dias de idade.

Em condições normais de produção, com nutrição adequada para cada fase de crescimento, não há grandes variações nas concentrações de proteínas totais, albumina e globulina no sangue com jejum de até 12 horas. A utilização de 12 horas de jejum pode ser importante quando deseja-se trabalhar com redução de proteína na dieta ou restrição alimentar, pois o consumo *ad libitum* anterior ao jejum garantirá um aporte de nutrientes de maneira adequada.

Segundo Piotrowska et al (2011) a concentração de proteínas totais no sangue podem sofrer grandes variações nas aves, e que mudanças em suas concentrações são dependentes de fatores intrínsecos ao animal e da função fisiológica das proteínas do sangue.

Rajman et al. (2006) observaram efeito da idade e do jejum com redução das concentrações de proteínas totais e albumina plasmática, sem alteração nas concentrações de ácido úrico e creatinina ao avaliarem dois diferentes programas de restrição alimentar e consumo *ad libitum* em fêmeas de corte da linhagem Ross 308 dos 30 aos 100 dias de idade.

No presente trabalho, esperava-se que com o aumento do tempo de jejum houvesse redução nas concentrações séricas e plasmáticas de proteínas totais e albumina, o que não foi observado. Contudo, ácido úrico e creatinina apresentaram variações em seus resultados no plasma, o que pode ser causado pela variabilidade analítica de cada metabólito. Quando frangos em crescimento tem consumo diminuído de proteína, a síntese de proteínas pelo fígado é reduzida. Em aves jovens pode ser observado o decréscimo significativo de proteínas e albumina plasmáticas (KITA et al., 1996; YAMAN et al., 2000ab).

Possíveis mudanças no catabolismo de proteínas seriam refletidos principalmente nos níveis de ácido úrico. Contudo, os tempos de jejum parecem não ter afetado de maneira expressiva essa via metabólica. Altos níveis de ácido úrico estariam associados ao uso de proteínas estruturais como fonte de energia quando as aves atingem o limite de sua capacidade de jejum (ALONSO-ALVAREZ & FERRER, 2001).

Isso demonstra a necessidade de padronização do tempo de jejum, quando da realização da colheita do sangue, pois, fatores como idade e o estado fisiológico das aves podem interferir nos resultados. Valores mais elevados de ácido úrico em aves, podem refletir metabolismo proteico mais intenso, principalmente em frangos de corte machos (REZENDE et al., 2019). No entanto, o período de jejum de até 12 horas não foi suficiente para promover tais alterações ou distúrbios metabólicos, sobre as concentrações de ácido úrico e proteínas totais.

Silva et al. (2007) mencionaram que diferenças nos valores de compostos bioquímicos do sangue, detectadas em frangos de corte são provavelmente devido às mudanças fisiológicas consideradas normais entre as diferentes fases de crescimento e idade.

Concentrações superiores a  $15 \text{ mg dL}^{-1}$  de ácido úrico no sangue sugerem alterações na função renal que podem ser causadas por nefrotoxinas, obstrução urinária, nefrite e outras nefropatias (Campbell et al., 2004), ou ainda associados à dieta e ao estado de hidratação das aves, não sendo o caso do presente estudo conforme indicam os dados. Valores de ácido úrico em frangos aos 45 dias, são dados como normais entre 2 a  $15 \text{ mg dL}^{-1}$  (BENEZ, 2004).

Alguns compostos bioquímicos do sangue podem sofrer alterações em suas concentrações, no entanto, proteínas totais, albumina e creatinina são compostos estáveis a utilização de anticoagulantes. Cerón et al. (2004) observaram estabilidade na concentração da albumina no sangue de cães quando da utilização de heparina, EDTA, citrato de sódio e fluoreto de sódio, sendo o mesmo observado para creatinina, exceto quando da utilização do fluoreto onde o resultado para creatinina foi 16,81% menor quando comparado com o soro, proteínas totais apresentaram seus resultados reduzidos em 9,90 e 4,79% quando da utilização de citrato e fluoreto em relação ao soro. Comportamento semelhante foi observado por Mohri et al.

(2007a) em amostras de sangue equino, Mohri et al. (2007b) em sangue bovino e Mohri et al. (2009) em amostras de sangue ovino.

Neste trabalho é possível afirmar que proteínas totais, albumina e globulina foram estáveis a utilização de fluoreto de sódio mais EDTA, tanto para os tempos de jejum e tempo de estocagem. Já creatinina e atividade da fosfatase alcalina, tendem a reduzir suas concentrações a medida que se aumenta o tempo de armazenamento das amostras.

A creatinina é um subproduto do metabolismo da fosfocreatinina no músculo esquelético. Seus níveis são diretamente proporcionais à massa muscular e inversamente proporcionais à idade. Alguns dados de literatura indicam aumento na excreção de creatinina em resposta à redução do consumo de ração, entre eles o jejum, ou outros estressores (WORK et al., 1999; RAJMAN et al., 2006).

No presente estudo, o modelo linear de regressão indicou redução da concentração sérica de creatinina. Por outro lado, o modelo linear indicou aumento da concentração plasmática de creatinina a medida que se aumenta o tempo de jejum alimentar, de modo semelhante o modelo quadrático indicou aumento de concentração até 7 horas e 46 minutos de jejum, após esse período tem-se redução nos valores de creatinina plasmática.

Rodríguez et al. (2005) observaram em perdizes de patas vermelhas, redução da creatinina plasmática durante jejum prolongado de 4 dias com queda observada até o quarto dia após realimentação. Os autores sugerem que a queda na concentração de creatinina durante o jejum pode ser causada por mau funcionamento do sistema renal, devido ao estresse do jejum. Porém, como as concentrações de ácido úrico deste trabalho podem ser consideradas normais, não há evidências de que a atividade renal tenha sido comprometida pelo tempo de jejum de até 12 horas.

A creatinina está presente em pequenas concentrações no soro sanguíneo, pelo fato da creatina ser excretada pelos rins antes de ser convertida em creatinina. Sua concentração pode variar de 0,10 a 0,40 mg dL<sup>-1</sup> em aves (KANEKO et al., 2008). Neste trabalho, as concentrações ficaram em aproximadamente 50% do máximo encontrado pelos autores e de Silva et al. (2007) que encontraram 0,46 mg dL<sup>-1</sup> em frangos com 42 dias de idade.

A fosfatase alcalina está estreitamente relacionada com o metabolismo do cálcio e fósforo e nas atividades condrogênicas e osteoblásticas durante o crescimento das aves, principalmente nas fases iniciais. A restrição alimentar pode levar a maior atividade da fosfatase alcalina em frangos, quando comparado com os alimentados *ad libitum* (HOCKING, 2001).

A fosfatase alcalina possui baixa atividade no fígado das aves, o aumento da atividade desta enzima no sangue está relacionado com a atividade osteoblástica relacionado ao

crescimento (HARR et al., 2002). Neste sentido, Rezende et al. (2019) encontraram valores médios de atividade de fosfatase alcalina de  $5868,80 \pm 2988,07$ ;  $2830,80 \pm 786,70$ ;  $2105,00 \pm 775,95$  UI L<sup>-1</sup> em machos Cobb com 04, 12 e 20 semanas de idade, respectivamente.

Segundo os autores acima citados valores significativamente maiores da atividade da fosfatase alcalina em aves com quatro semanas de idade em relação a aves mais velhas, pode ser atribuído ao aumento das isoenzimas ósseas circulantes, devido ao intenso crescimento e desenvolvimento do esqueleto, principalmente nos machos. Por sua vez, Chand et al. (2018) encontraram valores médios para a atividade da fosfatase alcalina de 7,21 IU L<sup>-1</sup> aos 42 dias de idade, que divergem dos encontrado no presente trabalho (média geral 3104,43 IU L<sup>-1</sup>).

Neste estudo, o modelo linear indicou redução na atividade da fosfatase alcalina, tanto no soro como no plasma, a medida que aumentou o tempo de jejum. A redução da atividade da fosfatase alcalina, pode indicar redução da disponibilidade de cálcio e fósforo provenientes da dieta. No plasma, esse efeito pode ter sido causado pela ação quelante do EDTA sobre o zinco e magnésio que são necessários para ativação da fosfatase alcalina durante a marcha laboratorial, o que pode ter influenciado os resultados.

Contudo, não é possível afirmar que o tempo de jejum de até 12 horas, tenha sido suficiente para causar mobilização do cálcio e do fosforo ósseo para a corrente sanguínea. Tais resultados, indicam que o estado fisiológico são fatores de interferência nos resultados de análises bioquímicas do sangue nas aves.

A diferença estatística entre soro e plasma, observada no presente trabalho para os valores da atividade da fosfatase alcalina, pode estar relacionada a mudanças no pH da amostra, este estando fora do ideal para atividade da fosfatase alcalina durante a marcha laboratorial, aliado as propriedades quelantes do EDTA, podem ter influenciado os resultados. A fosfatase alcalina é uma enzima zinco dependente, sendo esta ativada por magnésio que também é quelado pelo EDTA (MOHRI et al., 2007). Neste sentido, sugere-se a utilização do soro para determinação da atividade da fosfatase alcalina, ou a utilização de anticoagulante livre de EDTA, como a heparina.

Nunes et al. (2018), ao analisarem dados de análises sanguíneas de frangos de corte aos 45 dias de idade, reportaram que o ácido úrico, a creatinina e a fosfatase alcalina possuem grande amplitude e desvio padrão, em consequência apresentam elevado coeficiente de variação (42,80%; 32,80%; 32,40%), respectivamente. Já proteínas totais, albumina e globulina apresentaram valores com menor amplitude, menor desvio padrão e menor coeficiente de variação (9,60%; 8,80%; 13,20%), respectivamente.

A grande amplitude e desvio padrão reportados pela literatura, podem ter influenciado o baixo coeficiente de determinação encontrado nas equações de predição, principalmente para atividade da fosfatase alcalina. Observa-se, que os dados de literatura para atividade da fosfatase alcalina, possuem grande amplitude e principalmente elevado desvio padrão (BORSA et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Quanto ao tempo de armazenamento Cuhadar et al. (2013) avaliaram ciclos de descongelamento e congelamento, diferentes tempos de estocagem (0, 30, 60 e 90 dias) de amostras de soro utilizadas em análise clínica humana e constataram aumento dos níveis de ácido úrico (2,2 a 19,60%; 1,80 a 4,7%), para os ciclos de descongelamento e tempos de estocagem, respectivamente.

No presente estudo, este percentual foi de 53,98% nas amostras de soro e 21,47% no plasma para ácido úrico, para creatinina estes percentuais foram de 10% e 16,67%, em relação ao tempo 0 e 60 dias de armazenamento, respectivamente. De maneira semelhante, os autores observaram redução nos valores de creatinina em 10%, considerando o ácido úrico e a creatinina como os metabólitos mais instáveis ao longo do tempo e os mais estáveis foram proteínas totais e albumina.

Taylor & Sethi (2011) também reportaram instabilidade para o ácido úrico quando armazenado sob refrigeração por até 120 horas, com incremento de seus valores em 11%, a instabilidade também foi constatada quando este sofreu ciclos de descongelamento. No entanto, apresentou estabilidade quando armazenado por três meses a -20 °C. Resultados estes em concordância com os encontrados por Henriksen et al. (2014).

Cray et al. (2009) ao avaliarem o efeito de estocagem sob diferentes temperaturas em amostras de soro de ratos, observaram redução na concentração de proteínas totais em 4,1% quando as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) por sete dias, em relação ao tempo zero, quando da utilização de frost-free a -20 °C esta redução foi de 2,4%, com ultra freezer a -70 °C houve aumento de 0,5%, sem diferença estatística, o tempo de estocagem foi de 360 dias para as temperaturas de -20 °C e -70 °C.

Comportamento semelhante foi observado para albumina com redução de 2,7% seguido de aumento de 6,9% e novamente redução de 1,90%. As maiores alterações ocorreram para atividade da fosfatase alcalina quando da utilização de frost-free a -20 °C, havendo redução de 22,90% para fosfatase alcalina, quando comparado ao tempo zero. Quando se comparou as formas de estocagem frost-free e não frost-free, não houve diferença estatística. Os autores questionam a utilização da tecnologia frost-free para armazenamento, pois esta tem ciclos

programados de aquecimento que evitam a formação de gelo o que pode comprometer a estabilidade de alguns analitos.

De modo semelhante Thoresen et al. (1995), observaram redução de 18% na atividade da fosfatase alcalina em amostras de soro de cães armazenadas por 240 dias a -20 °C, sem a utilização de frost-free, quando utilizado -70 °C esta redução foi de apenas 1,6%. Proteínas totais, albumina, cálcio e fósforo apresentaram estabilidade aos 90 e 240 dias de armazenamento sob as diferentes temperaturas utilizadas, creatinina apresentou instabilidade. Existe a possibilidade de que o comportamento dos analitos perante a estocagem tenham diferença entre as espécies animais, além de características das moléculas.

Possíveis mudanças devido a degradação da amostra e variações analíticas dentro das limitações em que o ensaio foi realizado não pode ser diferenciado apenas pela análise estatística. Existe a possibilidade de que os analitos demonstrem perfis de estabilidade diferentes de acordo com sua concentração no sangue (TAYLOR & SETHI, 2011).

Na clínica humana Brinc et al. (2012) relataram que mudanças nas concentrações de alguns analitos entre eles proteínas totais, albumina e creatinina, podem ser reflexo da mudança de lote de reagente utilizado durante a análise ou ainda eventos como recalibração do equipamento, onde essas alterações seriam um reflexo do método analítico e não do tempo de armazenamento especificamente.

### **3.5 Conclusão**

Proteínas totais, albumina e globulina apresentaram estabilidade em suas concentrações, podendo ser utilizado soro e plasma, tempo de jejum de doze horas e estocagem por até 60 dias a - 20 °C.

Para as análises de ácido úrico, podem ser utilizadas ambas as frações soro ou plasma, porém recomenda-se a análise imediata após a colheita da amostra, podendo ser utilizado 12 horas de jejum.

Recomenda-se a utilização do soro para análise de creatinina e atividade da fosfatase alcalina, com armazenamento de 30 dias a - 20 °C. O plasma para análise da atividade da fosfatase alcalina pode ser armazenado por 60 dias a - 20 °C.



### 3.6 Referências

- ALONSO-ALVAREZ, C.; FERRER, M. A biochemical study of fasting, subfeeding, and recovery process in yellow-legged gulls. **Physiological and Biochemical Zoology: Ecological and Evolutionary Approaches**, v.74, n.5, p.703-713, 2001.
- ALONSO-ALVAREZ, C. Age-dependent changes in plasma biochemistry of yellow-legged gulls (*Larus cachinnans*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A: 140: 512-518, 2005.
- BATTERHAM, R.L.; COWLEY, M.A.; SMALL, C.J.; HERZOG, H.; COHEN, M.A.; DAKIN, C.L.; WREN, A.M.; BRYNES, A.E.; LOW, M.J.; GHATEI, M.A.; CONE, R.D.; BLOOM, S. Gut hormone PYY 3-36 physiologically inhibits food intake. **Nature**, 418: 650-654, 2002.
- BENES, S. **Aves: criação, clínica, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados**. Ribeirão Preto SP: 4 ed. Tecmedd, 2004.
- BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P.; SAITO, M.E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4 p.675-677, 2006. (Comunicação)
- BRINC, D.; CHAN, M.K.; VENNER, A.A.; PASIC, M.D.; COLANTONIO, D.; KYRIAKOPOULOU, L.; ADELI, K. Long-term stability of biochemical markers in pediatric serum specimens stored at - 80 °C: A CALIPER Substudy. **Clinical Biochemistry**, 45 (10-11): 816-826, 2012.
- CAMPBELL, T.W. Clinical chemistry of birds. In: THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. p. 479-492
- CERÓN, J.J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; HENNEMANN, C.; TECLES, F. The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. **The Veterinary Journal**, 167 (3): 294-301, 2004.
- CHAND, N.; NAZ, S.; REHMAN, Z.; KHAN, R.U. Blood biochemical profile of four fast-growing broiler strain under high ambiente temperature. **Applied Biological Chemistry**. Published online: <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0358-4>, 2018.
- CRAY, C.; RODRIGUEZ, M.; ZAIS, J.; ALTMAN, N.H. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 48 (2): 202-204, 2009.
- CUHADAR, S.; KOSEOGLU, M.; ATAY, A.; DIRICAN, A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. **Bichemia Medica**, 23 (1): 70-77, 2013.
- DIVYA, P.D.; JAYAVARDHANAN, K.K. Effect of temperature and storage time on hepatobiliary enzyme activities in goat serum. **Veterinary World**, 3 (6): p. 277, 2010.

DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G. Determination of serum albumin. **Standard Methods of Clinical Chemistry**. Academic Press N.Y., 1972.

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.318-337, 2006.

HARR, K.E. Clinical chemistry of companion avian species a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, n.3, p.140-151, 2002.

HENDERSON, A.R.; DONALD, W.M. Enzymes. **Tietz Clinical guide to laboratory test**. 5th ed. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. W.B. Saunders Company, Philadelphia USA. 2001.

HENRIKSEN, L.O.; FABER, N.R.; MOLLER, M.F.; NEXO, E.; HANSEN, A.B. Stability of 35 biochemical and immunological routine tests after 10 hours storage and transport of human whole blood at 21 °C. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, 74 (7): 603-610, 2014.

HOCKING, P.M.; MAXWELL, M.H.; MITCHELL, M.A. Relationships between the degree of food restriction and welfare indices in broiler breeder female. **British Poultry Science**. 37: 263-278, 1996.

HOCKING, P.M.; MAXWELL, M.H.; ROBERTSON, G.W.; MITCHELL, M.A. Welfare assessment of modified rearing programmes for broiler breeders. **British Poultry Science**. 42: 424-432, 2001.

JOHNSON, C.D.; MOLE, D.R.; PESTRIDGE, A. Postprandial alkaline tide: Does it exist? **Digestion**, 56: 100-106, 1995.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6th ed., San Diego: Academic Press, 2008. 928 p.

KHAN, R.U.; LAUDADIO, V.; TUFFARELLI, V. Semen traits and seminal plasma biochemical parameters in White Leghorn layer breeders. **Reproduction in Domestic Animals**. 47: 190-195, 2012.

KITA, K.; MATSUNAMI, S.; OKUMURA, J. Relationship of protein synthesis to mRNA levels in the muscle of chicks under various nutritional conditions. **The Journal of Nutrition**. 126: 1827-1832, 1996.

KORBONITS, M.; BLAINES, D.; ELIA, M.; POWELL-TUCK, J. Metabolic and hormonal changes during the refeeding period of prolonged fasting. **European Journal of Endocrinology**, 157: 157-166, 2007.

LAUDADIO, V.; PASSANTINO, L.; PERILLO, A.; LOPRESTI, G.; PASSANTINO, A.; KHAN, R.U.; TUFFARELLI, V. Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. **Poultry Science** 91 (1): 265-270, 2012.

LIMA-OLIVEIRA, G.; SALVAGNO, G.L.; LIPPI, G.; GELATI, M.; MONTAGNANA, M.; DANESE, E.; PICHETH, G.; GUIDI, G.C. Influence of a regular, standardized meal on clinical chemistry analytes. **Annals of Laboratory Medicine**, 32 (4): 250-256, 2012.

LIPPI, G.; LIMA-OLIVEIRA, G.; SALVAGNO, G.L.; MONTAGNANA, M.; GELATI, M.; PICHETH, G.; DUARTE, A.J.; FRANCHINI, M.; GUIDI, G.C. Influence of a light meal on routine haematological tests. **Blood Transfusion**, 8 (2): 94-99, 2010.

LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Waltham: Academic Press, 2008. p. 839-872.

MAJID, A.; QURESHI, M.S.; KHAN, R.U. In vivo adverse effects of alpha-tocopherol on the semen quality of male duck. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 99 (5): 841-846, 2015.

MOE, M.O.; OKSTAD, W.; BERLAND, S.; FRAMSTAD, T. Effects of storage duration and temperature conditions on biochemical analytes in porcine clotted, uncentrifuged blood samples. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, 7 (1): 1-6, 2018.

MOHRI, M.; ALLAHYARI, L.; SARDARI, K. Effects of common anticoagulants on routine plasma biochemistry of horse and comparison with serum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.7, p.313-316, 2007.

MOHRI, M.; SHAKERI, H.; ZADEH, S.L. Effect of common anticoagulants (heparina, citrate and EDTA) on routine plasma biochemistry of cattle. **Comparative Clinical Pathology**, 16 (3): p.207-209, 2007.

MOHRI, M.; REZAPOOR, H. Effects of heparina, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of sheep: comparison with serum. **Research in Veterinary Science**, 86: p.111-114, 2009.

NUNES, R.V.; BROCH, J.; WACHHOLZ, L.; DE SOUZA, C.; DAMASCENO, J.L.; OXFORD, J.H.; BLOXHAM, D.J.; BILLARD, L.; PESTI, G.M. Choosing sample sizes for vários blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. **Poultry Science**, 97: 3746-3754, 2018.

ODDOZE, C.; LOMBARD, E.; PORTUGAL, H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. **Clinical Biochemistry**, 45, 464-469, 2012.

OLIVEIRA, F.S.; FALBO, M.K.; SANDINI, I.E.; ISHIY, L.E. Efeito do congelamento e do tempo de armazenamento do soro sanguíneo de cordeiros na determinação de parâmetros bioquímicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 717-722, 2011.

PIMENTEL-GOMES, F. (2009). **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Esalq, 2009. 477p.

PIOTROWSKA, A.; BURLIKOWSKA, A.K.; AZYMECZKO, R. Changes in blood chemistry in broiler chickens during the fattening period. **Folia Biologica (Kraków)**, v.59 n.3-4, p.183-187, 2011.

RAJMAN, M.; JURÁNI, M.; LAMOSOVÁ, D.; MÁCAJOVÁ, M.; SEDLACKOVÁ, M.; KOST'ÁL, L.; JEZOVÁ, D.; VÝBOH, P. The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens (*Gallus gallus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 145: 363-371, 2006.

REZENDE, M.S.; SILVA, P.L.; GUIMARÃES, E.C.; LELLIS, C.G.; MUNDIM, A.V. Variações fisiológicas, influencia da idade e sexo no perfil bioquímico sanguíneo de aves da linhagem pesada de frangos de corte na fase de recria. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.5, p.1649-1658, 2019.

RIFAI, N.; HORVATH, A.R.; WITTEWER, C.T. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018.

RODRÍGUEZ, P.; TORTOSA, F.S.; VILLAFUERTE, R. The effects of fasting and refeeding on biochemical parameters in the red-legged partridge (*Alectoris rufa*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 140: 157-164, 2005.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; HANNAS, M.I. et al. **Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. Viçosa – MG, Departamento de Zootecnia – UFV, 2017, 488p.

RUSSELL, K.; ROUSSEL, A. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics Food and Animal Practice**, 23: 403-426, 2007.

SAS Institute INC. SAS University Edition: Installation Guide for Windows. Cary: SAS Institute, 2014. 23p.

SILVA, P.R.L.; FREITAS NETO, O.C.; LARURENTIZ, A.C.; JUNQUEIRA, O.M; FAGLIARI, J.J. Blood serum components and serum protein test of Hybro-PG broilers of different ages. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.9, n.4, p.229-232, 2007.

TAYLOR, E.C.; SETHI, B. Stability of 27 biochemistry analytes in storage at a range of temperatures after centrifugation. **British Journal of Biomedical Science**, 68 (3): 147-157, 2011.

THORESEN, S.I.; TVERDAL, A.; HAVRE, G.; MORBERG, H. Effects of storage time and freezing temperature on clinical chemical parameters from canine serum and heparinized plasma. **Veterinary Clinical Pathology**, 24 (4): 129-135, 1995.

TÓTHOVÁ, C.; SESZTÁKOVÁ, E.; BIELIK, B.; NAGY, O. Changes of total protein and protein fractions in broiler chickens during the fattening period. **Veterinary World**, 12 (4): 598-604, 2019.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, .6 (1): 24-27, 1969.

VIÑUELA, J.; FERRER, M. Regulation of growth in red kites and imperial eagles. **The Wilson Bulletin**, 109 (1): 92-101, 1997.

YAMAN, M.A.; KITA, K.; OKUMURA, J. Different responses of protein synthesis to refeeding in various muscle of fasted chicks. **British Poultry Science**. 41: 224-228, 2000a.

YAMAN, M.A.; KITA, K.; OKUMURA, J. Various macronutrient intakes additively stimulate protein synthesis in liver and muscles of food-deprived chicks. **The Journal of Nutrition**. 130: 70-76, 2000b.

YARI, P.; YAGHOBFAR, A.; AGHDAMSHAHRYAR, H.; EBRAHIM-NEZHAD, Y.; MAIRZAIE-GOUDARZI, S. Productive and serum biological responses of broiler chicks to use of different patterns of diet formulation. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, 4 (3): 459-464, 2014.

WORK, T.M.; MASSEY, J.G.; JOHNSON, L. DOUGILL, S. BANKO, P.C. Survival and physiologic response of common Amakihi and Japanese white-eyes during simulated translocation. **The Condor**, 101: 21-27, 1999.

WU, A.H.B. **Tietz clinical guide to laboratory test**. 4th ed. W.B. Saunders Company, 2006.

WYSS, M.; KDDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, 80 (3): 1107-1213, 2000.

#### **4 INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA, DO JEJUM PRÉ-COLHEITA E DO TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SORO E PLASMA DE FRANGOS DE CORTE**

##### **RESUMO**

O objetivo deste experimento de delineamento inteiramente casualizado com estrutura de tratamento fatorial  $2 \times 7 \times 5 \times 2$  foi avaliar o efeito de 2 intensidades de luz, 7 tempos de jejum e 5 tempos de armazenamento sobre as concentrações de proteínas totais, albumina, globulina, ácido úrico, creatinina, cálcio, fósforo e a atividade da fosfatase alcalina em 2 frações sanguíneas, soro e plasma de frangos de corte. 140 machos da linhagem Cobb 500 foram criados até os 42 dias de idade. Em seguida, as aves foram redistribuídas em 7 boxes (10 aves por box) por intensidade de luz (5 e 20 lux) até os 45 dias de idade. O sangue foi coletado de 1 box de cada ambiente (5 e 20 lux) por meio de punção da veia ulnar usando tubos a vácuo com e sem anticoagulante (fluoreto de sódio 5 mg + EDTA-K<sub>3</sub> 4 mg) em intervalos de 2 horas durante o jejum de 12 horas (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h). As frações de soro e plasma foram coletadas após centrifugação e analisadas após 0, 15, 30, 60 e 120 dias de armazenamento em microtubos a -20 °C. Com exceção da creatinina e cálcio plasmático os demais analitos apresentaram maior concentração quando as aves receberam de 5 lux. As concentrações séricas de albumina apresentaram decréscimo de 0,097 g L<sup>-1</sup> a cada hora de jejum, ao contrário da fosfatase alcalina aumentou de sua atividade em 38,55 IU L<sup>-1</sup>. Ácido úrico teve mínima concentração de 2,20 mg dL<sup>-1</sup> com 04 horas e 51 minutos de jejum. Proteínas totais teve máxima concentração sérica pelo modelo quadrático de regressão de 36,18 g L<sup>-1</sup> com 04 horas e 30 minutos de jejum, globulina com concentração máxima de 31,03 g L<sup>-1</sup> com 06 horas de jejum, creatinina teve máxima concentração de 0,182 mg dL<sup>-1</sup> com 5 horas e 15 minutos de jejum. O modelo linear para cálcio estimou redução de sua concentração sérica em 0,09 mg dL<sup>-1</sup> a cada hora de jejum. Em relação ao tempo de estocagem, a análise de regressão indicou aumento linear dos níveis séricos de ácido úrico, proteínas totais e globulina a medida que aumentou do tempo de estocagem. Creatinina, fósforo e cálcio apresentaram efeito quadrático com máxima concentração aos 42, 119 e mínima concentração aos 82 dias de armazenamento, com 0,184 mg dL<sup>-1</sup>, 6,63 mg dL<sup>-1</sup> e 7,17 mg dL<sup>-1</sup>, respectivamente. No plasma houve efeito quadrático para ácido úrico, cálcio e fósforo com ponto de mínima de 2,08 mg dL<sup>-1</sup>, 1,77 mg dL<sup>-1</sup> e 5,03 mg dL<sup>-1</sup>, com 3 horas e 48 minutos, 5 horas e 45 minutos e 30 minutos de jejum, respectivamente. O modelo linear indicou redução da atividade da fosfatase alcalina em 24,92

IU L<sup>-1</sup> a cada hora de jejum. Quanto ao tempo de estocagem, as concentrações plasmáticas de globulina e fosfatase alcalina apresentaram aumento dos valores em 0,0097 g L<sup>-1</sup> e 2,76 UI L<sup>-1</sup> a cada dia de estocagem, contrariamente creatinina apresentou decréscimo de 0,00018 mg dL<sup>-1</sup>. Ácido úrico e fósforo apresentaram máxima concentração de 2,64 mg dL<sup>-1</sup> e 5,47 mg dL<sup>-1</sup> aos 101 e 62 dias de estocagem, respectivamente. Já cálcio apresentou mínima concentração 1,02 mg dL<sup>-1</sup> aos 50 dias de estocagem, pelo modelo quadrático de regressão. Para análise de proteínas totais ambas as frações podem ser utilizadas. O plasma pode ser armazenado por até 120 dias, para a fração soro recomenda-se estocagem por até 60 dias a - 20 °C. Para globulina sérica os modelos de regressão quadrático e cúbico estimaram 6 e 7 horas de jejum, respectivamente. Podem ser utilizadas ambas as frações soro ou plasma para mensurar ácido úrico e creatinina, porém recomenda-se a análise imediata após a colheita da amostra. As concentrações séricas e plasmáticas de fósforo não foram afetadas pelo tempo de armazenamento, e as amostras podem ser armazenadas por até 120 dias. Não recomenda-se a utilização do anticoagulante ETDA para a dosagem de cálcio e atividade de fosfatase alcalina.

**Palavras chave:** metabolismo sanguíneo, luz, soro, plasma, bioquímica

**INFLUENCE OF LIGHT INTENSITY, PRE-HARVEST FASTING AND STORAGE  
TIME ON BIOCHEMICAL PARAMETERS IN SERUM AND PLASMA OF  
BROILERS CHICKEN**

**ABSTRACT**

The objective of this completely randomized design experiment with a  $2 \times 7 \times 5 \times 2$  factorial treatment structure was to evaluate the effect of 2 light intensities, 7 fasting and 5 storage times on total proteins, albumin, globulin, uric acid, creatinine, calcium and phosphorus concentrations and alkaline phosphatase activity in 2 blood fractions, serum and plasma of broilers. Male Cobb 500 (n= 140) were grown to 42 days of age. Then, the birds were redistributed into 7 replicate pens (10 birds per pen) per light intensity (5 and 20 lux) and grown to 45 days of age. Blood was then collected from 1 of the 7 replicate pens from each environment (5 and 20 lux) via ulnar venipuncture using vacuum tubes with and without anticoagulant (5 mg sodium fluoride + 4 mg EDTA-K<sub>3</sub>) at 2-hour intervals during the 12 hours fasting period (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h). Serum and plasma fractions were collected after centrifugation and analyzed after 0, 15, 30, 60 and 120 days of storage in microtubes at - 20 °C. With the exception of creatinine and plasma calcium, the other analytes showed higher concentration when birds received 5 lux. Serum albumin concentrations decreased by 0.097 g L<sup>-1</sup> each hour of fasting, whereas alkaline phosphatase increased its activity by 38.55 IU L<sup>-1</sup>. Uric acid had a minimum concentration of 2.20 mg dL<sup>-1</sup> with 4 hours and 51 minutes of fasting. Total proteins had maximum serum concentration by the quadratic regression model of 36.18 g L<sup>-1</sup> with 04 hours and 30 minutes of fasting, globulin with maximum concentration of 31.03 g L<sup>-1</sup> with 06 hours of fasting, creatinine had maximum concentration of 0.182 mg dL<sup>-1</sup> with 5 hours and 15 minutes of fasting. The linear model for calcium estimated a reduction in its serum concentration by 0.09 mg dL<sup>-1</sup> each hour of fasting. Regarding the storage time, the regression analysis indicated a linear increase in the serum levels of uric acid, total proteins and globulin as the storage time increased. Creatinine, phosphorus and calcium showed a quadratic effect with maximum concentration at 42, 119 and minimum concentration at 82 days of storage, with 0.184 mg dL<sup>-1</sup>, 6.63 mg dL<sup>-1</sup> and 7.17 mg dL<sup>-1</sup>, respectively. In plasma there was a quadratic effect for uric acid, calcium and phosphorus with a minimum point of 2.08 mg dL<sup>-1</sup>, 1.77 mg dL<sup>-1</sup> and 5.03 mg dL<sup>-1</sup>, at 3 hours and 48 minutes, 5 hours and 45 minutes and 30 minutes of fasting, respectively. The linear model indicated a reduction in alkaline phosphatase activity by 24.92 IU L<sup>-1</sup> each hour of fasting. As for the storage time, plasma concentrations of globulin



and alkaline phosphatase showed an increase of  $0.0097 \text{ g L}^{-1}$  and  $2.76 \text{ IU L}^{-1}$  each day of storage, in contrast, creatinine showed a decrease of  $0.00018 \text{ mg dL}^{-1}$ . Uric acid and phosphorus showed maximum concentrations of  $2.64 \text{ mg dL}^{-1}$  and  $5.47 \text{ mg dL}^{-1}$  at 101 and 62 days of storage, respectively. Calcium showed a minimum concentration of  $1.02 \text{ mg dL}^{-1}$  at 50 days of storage, by the quadratic regression model. For total protein analysis both fractions can be used. Plasma can be stored for up to 120 days, for the serum fraction storage for up to 60 days at  $-20^\circ\text{C}$  is recommended. For serum globulin, the quadratic and cubic regression models estimated 6 and 7 hours of fasting, respectively. Both serum or plasma fractions can be used to measure uric acid and creatinine, but analysis is recommended immediately after sample collection. Serum and plasma phosphorus concentrations were not affected by storage time, and samples can be stored for up to 120 days. It is not recommended to use the anticoagulant ETDA for the measurement of calcium and alkaline phosphatase activity.

**Keywords:** blood metabolism, light, serum, plasma, biochemistry

## 4.1 Introdução

Com o aumento do interesse em entender o perfil metabólico em pesquisa com animais, têm-se a necessidade de padronização de coleta, análise e interpretação destes dados. Neste sentido, a análise bioquímica do sangue é usada para dar suporte em estudos com animais. O tempo de armazenamento pode causar variações nas concentrações dos analitos, e essas variações podem afetar a tomada de decisões ou ainda a conclusão de uma pesquisa. Uma condição ideal seria a adoção de protocolos de armazenamento de amostras que refletem as diferentes condições de preservação da amostra, necessárias para analitos específicos (PENG et al., 2010).

Existe a necessidade de se determinar o tempo de estocagem das amostras de sangue, sem que haja efeito sobre as concentrações dos metabólitos. Dados de literatura com outras espécies como cães (THORESEN et al., 1995; CERÓN et al., 2004; SILVA et al., 2015), cordeiros (OLIVEIRA et al., 2011), caprinos (DIVYA & JAYAVARDHANAN, 2010) e ratos (CRAY et al., 2009; SPINELLI et al., 2012), e sobretudo humanos (CLARK et al., 2003; JACKSON et al., 2008; PEAKMAN & ELLIOTT, 2008; TANNER et al., 2008; ZWART et al., 2009; CUHADAR et al., 2013), demonstraram efeitos distintos, quanto ao tempo de armazenamento das amostras, reforçando a necessidade de estudos envolvendo amostras de sangue de frangos de corte.

O jejum é empregado na maioria das análises bioquímicas do sangue, inclusive na área humana. Porém, há variações metodológicas para a colheita do sangue entre estudos, podendo ou não utilizar jejum (CÓRDOVA-NOBOA et al., 2018), ou ainda variações nos tempos de jejum utilizado, sendo, em geral, de 2 a 12 horas (SADEGHI et al., 2014; BEHBOUDI et al., 2016; ZAKARIA et al., 2017; SWARNA et al., 2018).

A colheita de sangue de animais em jejum é decorrente dos valores de referência serem estabelecidos sob esta condição (FRIEDRICHS et al., 2012). Portanto, aves quando alimentadas podem apresentar alterações nos parâmetros sanguíneos. Para a obtenção de uma amostra estável, cada animal deveria ser avaliado levando em consideração o tempo de jejum que recebeu.

A utilização da restrição alimentar tem demonstrado modificações nos níveis plasmáticos de hormônios triiodotironina ( $T_3$ ) e tiroxina ( $T_4$ ) e do crescimento, que modulam o metabolismo energético e em consequência impactam o ganho de peso (RAJMAN et al., 2006). O efeito do jejum sobre as concentrações séricas e plasmáticas em análises bioquímicas em frangos de corte deve ser investigado.

À medida que se avançam as horas de jejum, em um primeiro momento os animais aumentam a mobilização de gordura, reduzindo a proteólise, situação que gera aumento plasmático de beta-hidroxibutirato e queda dos níveis de ácido úrico (CASTELLINI & REA, 1992; RODRÍGUEZ et al., 2005).

Além dos fatores mencionados, a fração sanguínea a ser utilizada nas análises bioquímicas devem ser consideradas, pois em frangos de corte os dados de literatura são escassos, havendo a necessidade de se investigar a utilização de ambas as frações em análises bioquímicas (SILVA et al., 2015; BURTIS et al., 2012).

O plasma não é apenas a fração líquida do sangue, mas um líquido complexo composto por várias substâncias quimicamente ativas, que fornece o meio de troca entre os vasos sanguíneos e as células. O plasma é composto em sua maior parte por água (92 a 94%), sendo as variações bioquímicas encontradas dependentes da concentração de proteínas, visto que são as substâncias mais abundantes (DUKES, 2017). O plasma pode conter concentrações mais baixas de potássio e atividade da lactato desidrogenase, menores concentrações de fatores de coagulação, fator plaquetário e outros componentes liberados pela ativação plaquetária (LADERSON et al., 1974; HORTIN, 2006).

A intensidade luminosa e o fotoperíodo são extremamente importantes para frangos de corte. A luz é um dos principais fatores de microclima na produção de frangos de corte. Programas de luz têm como principal função influenciar a taxa de crescimento, permitindo que as aves atinjam maturidade fisiológica antes da máxima deposição de massa muscular (WAIDE, 2010; OLANREWAJU et al., 2016).

Programas de iluminação geralmente iniciam com 20 lux sendo reduzidos para 5 lux a partir dos 14 dias e mantidos nesta intensidade ou menos até o final do período de crescimento. No entanto, há uma variedade de programas de iluminação atualmente levando em consideração comprimento de onda da luz, intensidade e fotoperíodo. Embora haja bom entendimento de como o fotoperíodo afeta a produção das aves, o conhecimento de como a intensidade da luz pode afetar a produção, saúde e metabolismo das aves deve ser considerada (OLANREWAJU et al., 2010).

A intensidade luminosa, bem como os programas de luz são amplamente empregados na avicultura, porém muito mais relacionados ao manejo, visando desempenho produtivo. Esta pode atuar intensamente a nível fisiológico e inclusive alterando as concentrações de metabólitos sanguíneos (FIDAN et al., 2017). Neste sentido, são necessários estudos em combinação com a intensidade de luz e como esta pode impactar os índices de variáveis fisiológicas e bioquímicas do sangue de frangos de corte (OLANREWAJU et al., 2016b).

O presente estudo avaliou o efeito de intensidades de luz, intervalo de jejum, tempos de armazenamento a -20 °C, sobre a concentração de proteínas totais, albumina, globulina, ácido úrico, creatinina, cálcio, fósforo e a atividade da fosfatase alcalina no soro e plasma de frangos de corte. Invertigou-se a hipótese de que a intensidade de luz mais baixa aumentariam as concentrações dos parâmetros bioquímicos do sangue, bem como o aumento do intervalo de jejum e os tempos de armazenamento diminuiriam a concentração dos parâmetros bioquímicos do sangue.

## 4.2 Material e Métodos

Este trabalho foi realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, em aviário experimental do Centro de Pesquisa em Avicultura do Núcleo de Estações Experimentais Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente ao *Campus* de Marechal Cândido Rondon-PR.

Os cuidados com as aves foram tomados com o propósito de buscar pelo bem-estar animal e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Unioeste (CEUA) sob protocolo nº 23/20.

Foram utilizados 140 frangos de corte, machos, da linhagem Cobb 500, com peso médio de  $3123 \pm 654$ g e com 45 dias de idade. As aves foram criadas de 1 a 42 dias de idade recebendo água e ração *ad libitum*, e os mesmos cuidados em relação ao manejo, iluminação e temperatura recomendados pelo manual da linhagem. O fotoperíodo utilizado foi de 18 horas de luz e 6 horas de escuro conforme recomendação para a linhagem. As dietas foram formuladas para atender as necessidades nutricionais de cada fase de criação das aves de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2017), divididas em três fases de alimentação (inicial, crescimento e final).

Aos 42 dias de idade as aves foram redistribuídas em dois ambientes dos quais diferiu-se a intensidade de luz, 5 e 20 lux, aferida através de Luxímetro Instrutherm LD-209. Utilizou-se lâmpadas incandescentes de 15 e 40 watts, regulando a sua altura até obter a intensidade desejada ao nível dos olhos das aves. A escolha das intensidades luminosas foi em função de que as mesmas são utilizadas na avicultura comercial.

Cada ambiente foi composto por sete boxes (1,96 m<sup>2</sup>), equipados com bebedouros tipo *nipple* e um comedouro tubular, totalizando 14 boxes, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), contendo dez aves cada com densidade de 5,1 aves m<sup>-2</sup>. Para

fins de colheita de sangue cada ave pertencente ao mesmo box foi considerada como uma unidade experimental. O piso possuía uma camada de 10cm de maravalha de pinus.

Aos 45 dias de idade, as aves foram colocadas em jejum por um período de uma hora, em seguida foram alimentadas por 30 minutos. Este procedimento foi adotado para que todas as aves apresentassem o mesmo quadro alimentar pós-prandial. Após esse período de arraçoamento foi realizado a primeira colheita de sangue denominada de tempo 0. As demais coletas foram realizadas após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de jejum.

Cada box representou um tempo de jejum para fins de colheita de sangue. A colheita de sangue foi realizada em 01 box de cada tempo de jejum, e de cada intensidade luminosa. Para cada intervalo de jejum utilizou-se uma nova ave, cada ave foi utilizada apenas uma vez para a colheita do sangue. O sangue foi colhido via punção braquial da veia ulnar, com as aves em decúbito lateral, utilizando-se tubos específicos de coleta a vácuo (Vacutainer®) com capacidade de 10 mL, adaptadores específicos e agulhas de 25 x 0,8mm (21G 1”) da marca Labor Import. Foram colhidos aproximadamente 8 mL de sangue em cada tubo, sendo a primeira amostra colhida para obtenção do soro em tubo (BD Vacutainer®) seco para soro com ativador de coágulo (sílica em pó) jateado na parede do tubo. A segunda amostra colhida foi destinada para obtenção do plasma em tubo (BD Vacutainer®) com inibidor glicolítico fluoreto de sódio 5 mg e anticoagulante EDTA – K<sub>3</sub> 4mg. Após a colheita as amostras permaneceram 15 minutos em posição horizontal e, em seguida, foram centrifugadas a 2500 rpm (1050g) por 10 minutos. A escolha do fluoreto EDTA – K<sub>3</sub>, deu-se pelo fato de haver poucos dados na literatura quanto a sua utilização em espécies aviárias.

Após a centrifugação e separação do soro e do plasma, as amostras foram identificadas e divididas em cinco alíquotas, as quais foram acondicionadas em microtubos de 2 mL (Eppendorf®) sendo uma alíquota encaminhada imediatamente ao laboratório para realização das análises. As demais alíquotas (quatro microtubos) foram estocadas a -20 °C, por períodos de 15, 30, 60 e 120 dias.

Para realização das leituras as amostras foram descongeladas sob refrigeração (4 °C), permanecendo em geladeira por 24 horas. Antes da realização das análises as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga para retirada de possível formação de fibrina. As análises foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 dias de estocagem, por meio de espectrofotometria utilizando analisador bioquímico automático Flexor EL 200 da marca Elitech®, (Elitechgroup, Netherlands) utilizando reagentes, calibradores (Elical II), e padrões de aferição (Elitrol I) da marca Elitech®. Foram determinadas as concentrações de: proteínas

totais, albumina, globulina, ácido úrico, creatinina, cálcio, fósforo e a atividade da fosfatase alcalina.

As leituras de proteínas totais (Total Protein Plus) foram realizadas pelo método de biureto de ponto final. O princípio do método consiste: as proteínas séricas formam um complexo colorido na presença de sais de cobre em meio alcalino, sendo a leitura realizada a 546 nm (RIFAI et al., 2018). Para albumina as leituras basearam-se no método colorimétrico verde de bromocresol (BCG) onde em pH ácido (4,20) o verde de bromocresol fixa-se seletivamente a albumina, conferindo-lhe uma coloração azul, sendo a leitura realizada a 620 nm (DOUMAS & BIGGS, 1972; WU, 2006). Os valores de globulina foram obtidos pela diferença entre proteínas totais e albumina. As leituras de ácido úrico foram realizadas com base no método Trinder, enzimático colorimétrico de ponto final (TRINDER, 1969), a 540 nm. A determinação dos valores de creatinina (Creatinine Jaffe) baseou-se no método de Jaffe colorimétrico cinético, onde é medida a taxa de formação do complexo colorido formado entre a creatinina e picrato alcalino, leituras realizadas a 500 nm. O efeito de substâncias interferentes é reduzido utilizando-se o procedimento cinético (RIFAI et al., 2018). A atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP - DEA SL) foi mensurada através do método enzimático cinético, baseado nas recomendações da Sociedade Germânica de Química Clínica (DGKC). Na presença de íons magnésio e de dietanolamina como aceptor de fosfato, o *p*-nitrofenilfosfato é decomposto pelas fosfatases alcalinas em fosfato e *p*-nitrofenol, formando um composto amarelo sendo as leituras realizadas a 405 nm (HENDERSON & DONALD, 2001). Os valores de cálcio (Calciun Arsenazo) foram obtidos através do método colorimétrico complexométrico direto (Arsenazo III) de ponto final. Em meio neutro, o cálcio se complexa com o arsenazo III (ácido 2,7(-bi (2-arsenofenilazo) -1,8-diidroxi-naftaleno-3,6-disulfônico), tornando a solução de cor azul, cuja absorvância entre 660 a 700 nm é proporcional à concentração de cálcio total na amostra (WU, 2006). A determinação dos valores de fósforo foi com base no método fosfomolibdato ultravioleta (U.V) de ponto final. Molibdato de amônio e ácido sulfúrico reagem na presença do fósforo contido na amostra formando um complexo fosfomolibdato de amônio medido a 340 nm.

Após as leituras das amostras e obtenção dos dados analíticos, estes foram tabulados para realização das análises estatísticas em esquema fatorial 2 x 7 x 5 x 2 para tipo de amostra (soro ou plasma); tempo de jejum (0; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas); tempo de estocagem (0, 15, 30, 60 e 120 dias) e intensidade luminosa (5 e 20 lux). Os dados foram submetidos a teste de homogeneidade e normalidade, para posterior análise de variância, sendo os testes realizados a 5% de probabilidade. Em caso de significância foi realizado teste F para tipo de amostra (soro

ou plasma) e intensidade luminosa (5 e 20 lux m<sup>2</sup>), análise de regressão para tempo de jejum e tempo de estocagem. Adicionalmente foi aplicado teste de Scott-Kontt para tempo de jejum e tempo de estocagem, com o objetivo de separar os tratamentos em grupos homogêneos evitando-se a sobreposição de médias. Foram apresentadas apenas as interações de interesse para este estudo, sendo fração sanguínea (soro ou plasma) e tempo de jejum, fração sanguínea e tempo de estocagem e fração sanguínea e intensidade luminosa. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o PROC GLM do SAS (SAS, 2014).

Modelo Estatístico:

$$Y_{ijkl} = m + J_i + E_j + F_k + L_l + (J.E)_{ij} + (J.F)_{ik} + (J.L)_{il} + (E.F)_{jk} + (E.L)_{jl} + (F.L)_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Em que:

$Y_{ijkl}$  = valor da variável em estudo referente ao tratamento ijkl;

$m$  = média de todas as unidades experimentais;

$J_i$  = efeito do jejum;

$E_j$  = efeito da estocagem;

$F_k$  = efeito da fração sanguínea;

$L_l$  = efeito da intensidade luminosa;

$J.E_{ij}$  = efeito de interação entre jejum e estocagem;

$J.F_{ik}$  = efeito de interação entre jejum e fração sanguínea;

$J.L_{il}$  = efeito de interação entre jejum e intensidade luminosa;

$E.F_{jk}$  = efeito de interação entre estocagem e fração sanguínea;

$E.L_{jl}$  = efeito de interação entre estocagem e intensidade luminosa;

$F.L_{kl}$  = efeito de interação entre fração sanguínea e intensidade luminosa;

$\varepsilon_{ijkl}$  = erro associado a cada observação  $Y_{ijkl}$ .

### 4.3 Resultados

Não houve efeito dos tempos de jejum tanto no soro como no plasma sobre as concentrações de proteínas totais. A concentração sérica de albumina apresentou estabilidade em seus valores até quatro horas de jejum, a partir de seis horas até 12 horas de jejum as concentrações são similares. As concentrações de globulina no soro foram maiores nos tempos de duas até 8 horas de jejum, e menor concentração nos tempos 0, 10 e 12 horas de jejum (Tabela 5).

As concentrações plasmáticas de albumina e globulina não foram afetadas pelos tempos de jejum. Entretanto, quando analisado de forma individual em cada tempo de jejum, observa-se maior concentração no soro para globulina e maior concentração no plasma para albumina.

Houve efeito do tempo de estocagem sobre as concentrações sérica de proteínas totais e globulina, com maior concentração obtida aos 30 e 120 dias de estocagem. Para albumina, as maiores concentrações foram aos 30 e 60 dias de estocagem, tanto no soro como no plasma. Com relação a intensidade luminosa observa-se maior concentração de proteínas totais, albumina e globulinas quando da utilização de 5 lux (Tabela 5).



Tabela 5. Médias das concentrações de proteínas totais, albumina e globulina no soro e plasma sanguíneo de frangos de corte, aos 45 dias de idade, submetidos a diferentes tempos de jejum, intensidade luminosa e períodos de estocagem das amostras

Jejum (horas)	Proteínas Totais g L <sup>-1</sup>		Albumina g L <sup>-1</sup>		Globulina g L <sup>-1</sup>	
	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma
0	34,90±3,47	34,54±2,75	15,44±1,42 <sup>A</sup>	15,59±1,26	19,55±2,48 <sup>Ba</sup>	18,66±1,85 <sup>b</sup>
2	36,84±2,97	36,23±3,17	15,79±1,29 <sup>Ab</sup>	16,20±1,23 <sup>a</sup>	20,98±2,12 <sup>Aa</sup>	19,94±2,25 <sup>b</sup>
4	37,14±3,39	36,31±3,48	15,52±1,22 <sup>Ab</sup>	16,31±1,29 <sup>a</sup>	21,44±2,54 <sup>Aa</sup>	20,20±2,66 <sup>b</sup>
6	35,91±2,81	35,08±3,02	14,83±0,88 <sup>Bb</sup>	15,84±1,41 <sup>a</sup>	20,99±2,06 <sup>Aa</sup>	19,18±1,90 <sup>b</sup>
8	35,50±3,05 <sup>a</sup>	34,30±2,94 <sup>b</sup>	15,02±1,41 <sup>B</sup>	15,39±1,22	20,91±2,56 <sup>Aa</sup>	19,33±2,21 <sup>b</sup>
10	35,21±3,05	35,23±3,33	14,85±1,21 <sup>Bb</sup>	15,81±1,41 <sup>a</sup>	20,68±2,38 <sup>Ba</sup>	19,91±2,14 <sup>b</sup>
12	34,63±2,75 <sup>b</sup>	36,57±2,87 <sup>a</sup>	14,47±1,08 <sup>Bb</sup>	15,71±1,27 <sup>a</sup>	20,32±2,21 <sup>Bb</sup>	21,22±2,47 <sup>a</sup>
Estocagem (dias)						
0	35,13±2,97 <sup>B</sup>	34,77±2,88	15,12±1,15 <sup>Ab</sup>	15,59±1,18 <sup>Ba</sup>	20,05±2,51 <sup>Ba</sup>	19,17±2,17 <sup>b</sup>
15	35,35±3,44 <sup>B</sup>	35,24±3,08	15,01±1,18 <sup>Bb</sup>	15,71±1,15 <sup>Ba</sup>	20,31±2,50 <sup>Ba</sup>	19,42±2,22 <sup>b</sup>
30	36,59±3,11 <sup>A</sup>	35,87±3,32	15,37±1,22 <sup>Ab</sup>	16,19±1,30 <sup>Aa</sup>	21,08±2,19 <sup>Aa</sup>	19,84±2,43 <sup>b</sup>
60	35,25±2,93 <sup>B</sup>	35,47±3,26	15,14±1,18 <sup>Ab</sup>	15,92±1,19 <sup>Aa</sup>	20,11±2,23 <sup>B</sup>	19,64±2,34
120	36,27±3,22 <sup>A</sup>	35,74±3,37	15,04±1,77 <sup>Bb</sup>	15,78±1,78 <sup>Ba</sup>	21,94±1,98 <sup>Aa</sup>	20,82±2,25 <sup>b</sup>
Intensidade Lum. (lux)						
5	37,03±2,92 <sup>Aa</sup>	36,41±2,99 <sup>Ab</sup>	15,64±1,15 <sup>Ab</sup>	16,27±1,23 <sup>Aa</sup>	21,58±2,28 <sup>Aa</sup>	20,31±2,23 <sup>Ab</sup>
20	34,44±2,90 <sup>B</sup>	34,44±3,10 <sup>B</sup>	14,68±1,25 <sup>Bb</sup>	15,42±1,28 <sup>Ba</sup>	19,83±2,18 <sup>Ba</sup>	19,22±2,33 <sup>Bb</sup>
Média	35,01	34,74	15,14	15,85	20,70 <sup>a</sup>	19,75 <sup>b</sup>
C.V (%)	8,92	9,03	8,56	8,37	11,57	11,87
EPM	2,91	3,04	1,21	1,26	2,23	2,28
<i>P Value</i>						
Jejum	0,1916	0,2947	< 0,0001	0,0563	< 0,0001	0,4139
Estocagem	0,0006	0,5695	0,0281	0,0026	0,0338	0,8644
Intensidade Luminosa	0,0284	0,0125	< 0,0001	< 0,0001	0,0106	0,0206
Fração sanguínea * Jejum		0,1259		0,5618		0,0389
Fração sanguínea * Estocagem		0,3393		0,2631		0,3645
Fração sanguínea * Int. Luminosa		0,9741		0,7317		0,7182

C.V: Coeficiente de variação; EPM: Erro Padrão da média; P: Significância da análise de variância; Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F entre soro e plasma. Letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Letras maiúsculas na coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F para intensidade luminosa

Os tempos de jejum afetaram as concentrações séricas e plasmáticas de ácido úrico e creatinina. As maiores concentrações de ácido úrico foram obtidas nos tempos 0, 8, 10 e 12 horas de jejum e menor concentração entre 2 e 6 horas de jejum, tanto no soro como no plasma (Tabela 6).

A creatinina apresentou maior concentração sérica e plasmática com 6 horas de jejum, com as maiores concentrações sendo obtidas na fração soro quando comparado com o plasma entre os tempos de jejum.

O ácido úrico apresentou aumento de suas concentrações a medida que aumenta o tempo de estocagem, já a creatinina apresentou redução em suas concentrações a medida que aumentou o tempo de estocagem (Tabela 6).

Maior concentração de ácido úrico no soro foi obtida quando da utilização de 5 lux. A concentração de creatinina plasmática foi maior quando da utilização de 20 lux. As concentrações plasmáticas de ácido úrico e as concentrações séricas de creatinina não foram afetadas pela intensidade luminosa.

Tabela 6. Médias das concentrações de ácido úrico e creatinina no soro e plasma sanguíneo de frangos de corte, aos 45 dias de idade, submetidos a diferentes tempos de jejum, intensidade luminosa e períodos de estocagem das amostras

Jejum (horas)	Ácido Úrico mg dL <sup>-1</sup>		Creatinina mg dL <sup>-1</sup>	
	Soro	Plasma	Soro	Plasma
0	2,77±0,69 <sup>Aa</sup>	2,43±0,86 <sup>Ab</sup>	0,17±0,06 <sup>Ba</sup>	0,15±0,07 <sup>Ab</sup>
2	1,99±0,77 <sup>B</sup>	2,08±0,74 <sup>B</sup>	0,17±0,05 <sup>Ba</sup>	0,14±0,06 <sup>Ab</sup>
4	1,81±0,64 <sup>B</sup>	1,83±0,70 <sup>B</sup>	0,16±0,03 <sup>Ba</sup>	0,11±0,03 <sup>Bb</sup>
6	2,28±0,82 <sup>B</sup>	2,11±0,81 <sup>B</sup>	0,19±0,04 <sup>Aa</sup>	0,16±0,04 <sup>Ab</sup>
8	2,76±1,07 <sup>A</sup>	2,59±1,01 <sup>A</sup>	0,16±0,06 <sup>Ba</sup>	0,14±0,06 <sup>Ab</sup>
10	2,93±1,16 <sup>A</sup>	3,13±1,09 <sup>A</sup>	0,16±0,07 <sup>Ba</sup>	0,13±0,06 <sup>Bb</sup>
12	2,53±0,86 <sup>Ab</sup>	3,02±1,03 <sup>Aa</sup>	0,14±0,06 <sup>Ca</sup>	0,10±0,05 <sup>Bb</sup>
Estocagem (dias)				
0	2,08±0,91 <sup>C</sup>	2,05±0,91 <sup>C</sup>	0,16±0,04 <sup>Ba</sup>	0,13±0,03 <sup>Bb</sup>
15	2,26±0,96 <sup>B</sup>	2,32±0,93 <sup>B</sup>	0,20±0,05 <sup>Aa</sup>	0,18±0,06 <sup>Ab</sup>
30	2,38±0,86 <sup>B</sup>	2,38±0,95 <sup>B</sup>	0,17±0,04 <sup>Ba</sup>	0,12±0,04 <sup>Bb</sup>
60	2,52±0,83 <sup>B</sup>	2,52±0,97 <sup>B</sup>	0,18±0,04 <sup>Aa</sup>	0,15±0,05 <sup>Bb</sup>
120	2,97±0,98 <sup>A</sup>	2,95±1,03 <sup>A</sup>	0,12±0,08 <sup>Ca</sup>	0,09±0,06 <sup>Cb</sup>
Intensidade Lum. (lux)				
5	2,54±0,98 <sup>A</sup>	2,39±0,97	0,16±0,06 <sup>a</sup>	0,13±0,05 <sup>Bb</sup>
20	2,34±0,92 <sup>B</sup>	2,47±1,02	0,17±0,06 <sup>a</sup>	0,14±0,06 <sup>Ab</sup>
Média	2,44	2,45	0,17 <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>
C.V (%)	39,18	40,98	33,88	42,75
EPM	0,95	0,99	0,05	0,06
<i>P Value</i>				
Jejum	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Estocagem	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Intensidade Luminosa	0,0132	0,2828	0,1733	0,0295
Fração sanguínea * Jejum	< 0,0001		< 0,0001	
Fração sanguínea * Estocagem	0,9811		0,0015	
Fração sanguínea * Int. Luminosa	< 0,0001		0,6320	

CV: Coeficiente de variação; EPM: Erro Padrão da média; P: Significância da análise de variância; Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F entre soro e plasma. Letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Letras maiúsculas na coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F para intensidade luminosa.

Os tempos de jejum afetaram a atividade sérica e plasmática da fosfatase alcalina e as concentrações de cálcio. Maior atividade da fosfatase alcalina foi obtida no soro com 8 e 12 horas de jejum, no plasma, maior atividade foi obtida com 2 horas de jejum, após esse tempo tem-se redução de sua atividade (Tabela 7).

As maiores concentrações séricas de cálcio foram obtidas com 2 e 4 horas de jejum e, após esse período, observou-se redução de sua concentração. No plasma, as concentrações de cálcio apresentaram uma dinâmica diferente. As concentrações séricas de fósforo foram maiores nos tempos de 4 e 6 horas de jejum e, após este período, as concentrações foram estáveis. As concentrações plasmáticas de fósforo não foram afetadas pelos tempos de jejum.

Houve efeito do tempo de estocagem sobre a atividade sérica da fosfatase alcalina com maior atividade aos 15 e 120 dias. A maior concentração sérica de cálcio foi obtida no tempo 0 de estocagem, após este período a concentração tendeu a reduzir. As concentrações séricas e plasmáticas de fósforo não foram afetadas pelos tempos de estocagem.

A intensidade luminosa afetou a atividade da fosfatase alcalina no plasma, com maior atividade quando utilizado 5 lux. Maior concentração plasmática de cálcio foi obtida com 20 lux. A atividade sérica da fosfatase alcalina, as concentrações séricas de cálcio e as concentrações séricas e plasmáticas de fósforo não foram afetadas pela intensidade luminosa (Tabela 7).

Tabela 7. Médias da atividade da fosfatase alcalina e concentração de cálcio e fósforo no soro e plasma sanguíneo de frangos de corte, aos 45 dias de idade, submetidos a diferentes tempos de jejum, intensidade luminosa e períodos de estocagem das amostras

Jejum (horas)	Fosfatase Alcalina UI L <sup>-1</sup>		Cálcio mg dL <sup>-1</sup>		Fósforo mg dL <sup>-1</sup>	
	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma
0	3497±969 <sup>B</sup>	3394±1064 <sup>B</sup>	8,59±1,64 <sup>Ba</sup>	1,47±0,61 <sup>Ab</sup>	5,66±0,64 <sup>Ba</sup>	5,10±0,51 <sup>b</sup>
2	3705±1052 <sup>B</sup>	4005±1072 <sup>A</sup>	8,78±1,20 <sup>Aa</sup>	1,01±0,42 <sup>Bb</sup>	5,56±0,58 <sup>Ba</sup>	4,89±0,47 <sup>b</sup>
4	3488±1046 <sup>B</sup>	3265±1126 <sup>B</sup>	8,76±1,28 <sup>Aa</sup>	1,03±0,49 <sup>Bb</sup>	5,82±0,60 <sup>Aa</sup>	5,15±0,55 <sup>b</sup>
6	3671±793 <sup>Ba</sup>	3103±922 <sup>Cb</sup>	8,37±1,39 <sup>Ba</sup>	1,01±0,37 <sup>Bb</sup>	6,04±0,57 <sup>Aa</sup>	5,37±0,45 <sup>b</sup>
8	3969±1025 <sup>Aa</sup>	3435±1046 <sup>Bb</sup>	7,59±1,67 <sup>Ca</sup>	0,92±0,54 <sup>Bb</sup>	5,48±0,58 <sup>Ba</sup>	5,17±0,51 <sup>b</sup>
10	3687±992 <sup>Ba</sup>	3036±1226 <sup>Cb</sup>	7,73±1,26 <sup>Ca</sup>	1,74±1,04 <sup>Ab</sup>	5,61±0,59 <sup>Bb</sup>	5,92±0,79 <sup>a</sup>
12	3994±1060 <sup>Aa</sup>	3169±1534 <sup>Cb</sup>	7,79±1,14 <sup>Ca</sup>	1,84±1,02 <sup>Ab</sup>	5,73±0,57 <sup>B</sup>	5,84±0,96
<b>Estocagem (dias)</b>						
0	3595±942 <sup>Ba</sup>	3262±1222 <sup>b</sup>	9,64±1,00 <sup>Aa</sup>	1,21±0,66 <sup>b</sup>	6,15±0,58 <sup>a</sup>	5,14±0,72 <sup>b</sup>
15	3929±969 <sup>Aa</sup>	3388±1103 <sup>b</sup>	8,56±1,63 <sup>Ba</sup>	1,20±0,67 <sup>b</sup>	5,79±0,48 <sup>a</sup>	5,24±0,70 <sup>b</sup>
30	3590±974 <sup>Ba</sup>	3260±1081 <sup>b</sup>	7,96±1,03 <sup>Ba</sup>	1,19±0,78 <sup>b</sup>	5,61±0,56 <sup>a</sup>	5,35±0,66 <sup>b</sup>
60	3564±1120 <sup>B</sup>	3340±1268	7,49±1,00 <sup>Ba</sup>	1,17±0,75 <sup>b</sup>	5,68±0,60 <sup>a</sup>	5,49±0,65 <sup>b</sup>
120	3909±968 <sup>Aa</sup>	3469±1233 <sup>b</sup>	7,49±1,28 <sup>Ba</sup>	1,67±0,88 <sup>b</sup>	5,29±0,52	5,37±0,71
<b>Int. Lum. (lux m<sup>-2</sup>)</b>						
5	3749±1052 <sup>a</sup>	3508±1056 <sup>Ab</sup>	8,28±1,54 <sup>a</sup>	1,07±0,57 <sup>Bb</sup>	5,69±0,62 <sup>a</sup>	5,18±0,56 <sup>b</sup>
20	3684±959 <sup>a</sup>	3179±1278 <sup>Bb</sup>	8,18±1,37 <sup>a</sup>	1,50±0,89 <sup>Ab</sup>	5,71±0,61 <sup>a</sup>	5,46±0,80 <sup>b</sup>
Média	3717	3344	8,23 <sup>a</sup>	1,29 <sup>b</sup>	5,70 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>
C.V. (%)	27,08	35,38	17,69	60,13	10,76	13,18
EPM	1007	1172	1,46	0,74	0,61	0,69
<b>P Value</b>						
Jejum	0,0036	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0360	1,000
Estocagem	0,0127	0,5350	0,0006	0,6991	0,0612	1,000
Int. Lum.	0,4435	0,0002	0,4492	0,0448	0,1334	1,000
Fração sanguínea * Jejum	< 0,0001		< 0,0001		0,2764	
Fração sanguínea * Estocagem	0,4229		0,0309		0,2867	
Fração sanguínea * Int. Luminosa.	0,0309		0,3610		0,2632	

CV: Coeficiente de variação; EPM: Erro Padrão da média; *P Value*: Significância da análise de variância; Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F entre soro e plasma. Letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. Letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F para intensidade luminosa.

Houve efeito linear dos tempos de jejum, sobre a fração sérica da albumina e fosfatase alcalina. Também foi observado, efeito quadrático e cúbico para ácido úrico, proteínas totais, globulina e creatinina e ainda efeito linear e cúbico para cálcio (Tabela 8).

A albumina apresentou decréscimo de sua concentração em  $0,097 \text{ g L}^{-1}$  a cada hora de jejum. De modo contrário, a fosfatase alcalina apresentou aumento de sua atividade em  $38,55 \text{ IU L}^{-1}$ .

Quando observado o efeito quadrático para as concentrações séricas de ácido úrico este apresentou concentração mínima estimada de  $2,20 \text{ mg dL}^{-1}$  com 4 horas e 51 minutos de jejum. Para o efeito cúbico têm-se mínimo de  $1,85 \text{ mg dL}^{-1}$  com 3 horas e 13 minutos, máximo de  $2,83 \text{ mg dL}^{-1}$  com 9 horas e 48 minutos e concentração média de  $2,33 \text{ mg dL}^{-1}$  com 6 horas e 30 minutos de jejum, respectivamente.

Para proteínas totais observou-se máxima concentração sérica de  $36,18 \text{ g L}^{-1}$  com 4 horas e 30 minutos de jejum, estimada pelo modelo quadrático de regressão. Já para o modelo cúbico este estimou máximo de  $36,79 \text{ g L}^{-1}$  com 3 horas e 22 minutos, mínimo de  $34,75 \text{ g L}^{-1}$  com 10 horas e 43 minutos, ponto médio obtido com 7 horas de jejum, valor este de  $35,76 \text{ g L}^{-1}$ .

O modelo quadrático de regressão para globulina estimou máxima concentração de  $21,03 \text{ g L}^{-1}$  com 6 horas e 4 minutos de jejum. Já o modelo cúbico estimou nível máximo de  $21,33 \text{ g L}^{-1}$  com 3 horas e 51 minutos, nível mínimo de  $20,19 \text{ g L}^{-1}$  com 10 horas e 18 minutos e nível médio de  $20,75 \text{ g L}^{-1}$  com 7 horas e 4 minutos de jejum, respectivamente. Para a creatinina observou-se comportamento contrário à globulina tendo sua concentração mínima  $0,17 \text{ mg dL}^{-1}$  com 1 hora e 52 minutos de jejum, concentração máxima ( $0,19 \text{ mg dL}^{-1}$ ) com 7 horas e 57 minutos e nível intermediário  $0,18 \text{ mg dL}^{-1}$  atingido com 4 horas e 54 minutos de jejum, respectivamente.

O modelo linear para a variável cálcio estimou queda em sua concentração sérica de aproximadamente  $0,09 \text{ mg dL}^{-1}$  a cada hora de jejum. O modelo de regressão cúbico estimou máxima concentração sérica de  $8,85 \text{ mg dL}^{-1}$  com 2 horas e 19 minutos, mínimo de  $7,62 \text{ mg dL}^{-1}$  com 10 horas e 4 minutos, e concentração média de  $8,23 \text{ mg dL}^{-1}$  com 6 horas e 11 minutos de jejum, respectivamente. Os dados para a variável fósforo não se ajustaram a nenhum dos modelos de regressão propostos.

Tabela 8. Equações de regressão para predição de ácido úrico, proteínas totais, albumina, globulina, creatinina, fosfatase alcalina e cálcio em amostras de soro sanguíneo de frangos de corte aos 45 dias de idade em função do tempo de jejum

Jejum				
Variável	Equação de regressão	PC	R <sup>2</sup>	p-Value
Ácido úrico	$0,01084*AU^2 - 0,10497*AU + 2,45114$	4,84	0,30	0,0002
Ácido úrico	$- 0,00702*AU^3 + 0,13696*AU^2 - 0,66216*AU + 2,77668$	6,50	0,99	<0,0001
Pt. totais	$- 0,03199*PT^2 + 0,28940*PT + 35,61535$	4,52	0,63	0,0012
Pt. totais	$0,01015*PT^3 - 0,21448*PT^2 + 1,0956*PT + 35,14432$	7,05	0,91	0,0010
Albumina	$- 0,09738*ALB + 15,68917$		0,77	<0,0001
Globulina	$- 0,02799*GLB^2 + 0,33905*GLB + 20,00464$	6,06	0,75	0,0002
Globulina	$0,00869*GLB^3 - 0,18412*GLB^2 + 1,02877*GLB + 19,60167$	7,06	0,94	0,0002
Creatinina	$- 0,00048792*CRT^2 + 0,00513CRT + 0,16783$	5,26	0,57	0,0021
Creatinina	$- 0,00014543*CRT^3 + 0,00213*CRT^2 - 0,00642*CRT + 0,17458$	4,89	0,61	0,0035
Fos. alcalina	$38,54876*FA + 3460,62057$		0,55	0,0006
Cálcio	$- 0,08725*CA + 8,75509$		0,72	<0,0001
Cálcio	$0,00531*CA^3 - 0,09849*CA^2 + 0,3707*CA + 8,44906$	6,18	0,94	<0,0001

PC: Ponto crítico obtido da derivação da equação quadrática e cúbica; p-Value: Valor de p da equação de regressão.

Os períodos de estocagem (0, 15, 30, 60 e 120 dias) apresentaram efeito linear sobre as concentrações séricas de ácido úrico, efeito linear e cúbico sobre proteínas totais e globulina e efeito quadrático sobre as concentrações de creatinina, cálcio e fósforo (Tabela 9).

O modelo linear indicou aumento das concentrações séricas de ácido úrico, proteínas totais e globulina, à medida que o tempo de estocagem das amostras aumentou. Já o modelo cúbico para proteínas totais indicou máximo de  $36,06 \text{ g L}^{-1}$  com aproximadamente 30,5 dias, mínimo de  $34,77 \text{ g L}^{-1}$  aos 85 dias e ponto médio de  $35,41 \text{ g L}^{-1}$  aos 58 dias de estocagem. Para a globulina observou-se concentração máxima ( $20,83 \text{ g L}^{-1}$ ) aos 28 dias, mínima de  $19,79 \text{ g L}^{-1}$  e nível médio de  $20,27 \text{ g L}^{-1}$ , aos 84 e 56 dias de estocagem, respectivamente.

O efeito quadrático obtido para creatinina indicou máxima concentração de  $0,184 \text{ mg dL}^{-1}$  aos 42 dias de armazenamento, sendo que após este período as concentrações séricas de creatinina foram decrescentes. Cálcio e fósforo tiveram comportamento contrário. Cálcio apresentou mínima concentração ( $7,17 \text{ mg dL}^{-1}$ ) atingida aos 82 dias de estocagem e o fósforo atingiu concentração mínima ( $5,40 \text{ mg dL}^{-1}$ ) aos 119 dias, após este período seus valores tornaram-se crescentes.

Os dados da albumina e atividade sérica da fosfatase alcalina para tempo de estocagem não se ajustaram aos modelos de regressão linear, quadrática ou cúbica.

Tabela 9. Equações de regressão para predição de ácido úrico, proteínas totais, globulina, creatinina, cálcio e fósforo em amostras de soro sanguíneo de frangos de corte aos 45 dias de idade em função do tempo de estocagem das amostras

Estocagem				
Variável	Equação de regressão	PC	R <sup>2</sup>	<i>p-Value</i>
Ácido úrico	0,00534*AU + 2,15506		0,99	<0,0001
Pt. totais	0,01101*PT + 35,22616		0,22	0,0014
Pt. totais	0,00001367*PT <sup>3</sup> - 0,00237*PT <sup>2</sup> + 0,1031*PT + 34,734	57,81	0,68	0,0011
Globulina	0,01161*GLB + 20,08578		0,61	<0,0001
Globulina	0,00001189*GLB <sup>3</sup> - 0,00201*GLB <sup>2</sup> + 0,08542*GLB + 19,74873	56,35	0,91	0,0002
Creatinina	- 0,00000665*CRT <sup>2</sup> + 0,00055736*CRT + 0,17233	41,91	0,79	<0,0001
Cálcio	0,00033445*CA <sup>2</sup> - 0,05510*CA + 9,44293	82,37	0,97	<0,0001
Fósforo	0,00004333*FOS <sup>2</sup> - 0,01034*FOS + 6,01190	119,32	0,84	0,0115

PC: Ponto crítico obtido da derivação da equação quadrática e cúbica; *p-Value*: Valor de p da equação de regressão.

Os modelos de regressão quadrático e cúbico demonstraram efeito dos tempos de jejum sobre os níveis plasmáticos de ácido úrico, efeito cúbico para proteínas totais, albumina e creatinina, efeito linear e cúbico para globulina e atividade da fosfatase alcalina e efeito quadrático para cálcio e fósforo (Tabela 10).

Pelo modelo quadrático, ácido úrico apresentou mínima concentração (2,08 mg dL<sup>-1</sup>) atingida com 3 horas e 48 minutos de jejum. O modelo cúbico de regressão, estimou mínima de 1,88 mg dL<sup>-1</sup> com 3 horas e 8 minutos, máxima 2,92 mg dL<sup>-1</sup> com 11 horas e 11 minutos e concentração média de 2,40 mg dL<sup>-1</sup> com 7 horas e 09 minutos de jejum, respectivamente.

Conforme o modelo cúbico de regressão proteínas totais apresentou máxima concentração de 36,22 g L<sup>-1</sup> com 3 horas de jejum, mínima de 34,48 g L<sup>-1</sup> com 8 horas e 45 minutos e concentração média de 35,35 g L<sup>-1</sup> atingido com 5 horas e 52 minutos de jejum, respectivamente. Os valores plasmáticos da albumina apresentaram comportamento semelhante, máximo de 16,28 g L<sup>-1</sup> com 2 horas e 51 minutos, mínimo de 15,45 g L<sup>-1</sup> com 9 horas e 17 minutos e tendo seu ponto médio 15,87 g L<sup>-1</sup> com 6 horas e 4 minutos de jejum, respectivamente. Creatinina apresentou comportamento oposto em relação as proteínas totais e albumina, tendo sua concentração máxima de 0,161 mg dL<sup>-1</sup> com 8 horas e 39 minutos, mínima de 0,128 mg dL<sup>-1</sup> com 2 horas e 37 minutos e nível médio de 0,144 mg dL<sup>-1</sup> com 5 horas e 38 minutos de jejum, respectivamente.



O efeito linear dos tempos de jejum, sobre a atividade da fosfatase alcalina no plasma indicaram redução de sua atividade em 24,92 IU L<sup>-1</sup> a cada hora de jejum. Entretanto, o modelo explica apenas 33% da variabilidade ocorrida com os dados para esta variável, conforme indica seu R<sup>2</sup>=0,33. Já o modelo cúbico indicou atividade máxima de 3702 IU L<sup>-1</sup> com aproximadamente 2 horas de jejum, mínimo de 3119 IU L<sup>-1</sup> com 8 horas e 47 minutos e atividade média 3411 IU L<sup>-1</sup> com 5 horas e 38 minutos de jejum.

Houve efeito quadrático para as concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo. Cálcio apresentou redução de suas concentrações com ponto de mínima de 0,91 mg dL<sup>-1</sup> com 5 horas e 45 minutos de jejum. Após este período suas concentrações tornaram-se crescente. Fósforo apresentou mínima concentração de 5,03 mg dL<sup>-1</sup>. No entanto, acredita-se que metabolicamente 30 minutos de jejum não tenha impacto sobre os níveis plasmáticos de fósforo.

Tabela 10. Equações de regressão para predição de ácido úrico, proteínas totais, albumina, globulina, creatinina, fosfatase alcalina, cálcio e fósforo em amostras de plasma sanguíneo de frangos de corte aos 45 dias de idade em função do tempo de jejum

Jejum					
Variável	Equação de regressão	PC	R <sup>2</sup>	<i>p-Value</i>	
Ácido úrico	0,01502*AU <sup>2</sup> - 0,11445*AU + 2,30164	3,81	0,78	<0,0001	
Ácido úrico	- 0,00401*AU <sup>3</sup> + 0,08603*AU <sup>2</sup> - 0,42081*AU + 2,47348	7,15	0,96	<0,0001	
Pt. totais	0,01809*PT <sup>3</sup> - 0,31789*PT <sup>2</sup> + 1,41041*TP + 34,36136	5,86	0,92	<0,0001	
Albumina	0,00622*ALB <sup>3</sup> - 0,11324*ALB <sup>2</sup> + 0,49448*ALB + 15,64616	6,07	0,71	<0,0001	
Globulina	0,07125*GLB + 19,12838		0,40	0,0023	
Globulina	0,01187*GLB <sup>3</sup> - 0,20449*GLB <sup>2</sup> + 0,91498*GLB + 18,71675	5,74	0,93	<0,0001	
Creatinina	- 0,00029765*CRT <sup>3</sup> + 0,00503*CRT <sup>2</sup> - 0,02012*CRT + 0,15123	5,63	0,64	<0,0001	
Fos. alcalina	- 24,92117*FA + 3587,80220		0,33	0,0387	
Fos. alcalina	3,6163*FA <sup>3</sup> - 58,09088*FA <sup>2</sup> + 183,42613*FA + 3538,50442	5,35	0,42	0,0006	
Cálcio	0,01576*CA <sup>2</sup> - 0,18108*CA + 1,43202	5,75	0,83	<0,0001	
Fósforo	0,00502*P <sup>2</sup> - 0,00487*P + 5,03092	0,49	0,79	0,0065	

PC: Ponto crítico obtido da derivação da equação quadrática e cúbica; *p-Value*: Valor de p da equação de regressão.

Houve efeito do tempo de estocagem sobre as concentrações plasmáticas, sendo efeito linear para ácido úrico, globulina, creatinina e atividade da fosfatase alcalina, efeito quadrático para cálcio e fósforo, efeito linear e cúbico para proteínas totais (Tabela 11).

Pelo modelo linear ácido úrico, globulina e atividade da fosfatase alcalina apresentaram aumento de seus valores em  $0,0045 \text{ mg dL}^{-1}$ ,  $0,0097 \text{ g L}^{-1}$  e  $2,76 \text{ IU L}^{-1}$ , respectivamente, à medida que se aumenta uma unidade nos dias de estocagem das amostras. De modo contrário, creatinina apresenta decréscimo de seus valores em  $0,00018 \text{ mg dL}^{-1}$ .

Cálcio apresentou mínima concentração de  $1,02 \text{ mg dL}^{-1}$  aos 50 dias de estocagem. Já fósforo apresentou máxima concentração de  $5,47 \text{ mg dL}^{-1}$  aos 62 dias de estocagem, pelo modelo quadrático de regressão.

Proteínas totais apresentou aumento de suas concentrações em  $0,0144 \text{ g L}^{-1}$  à medida que se aumentou o tempo de estocagem. Quanto ao modelo cúbico, este estimou máximo de  $35,56 \text{ g L}^{-1}$  aos 38 dias, mínimo de  $35,32 \text{ g L}^{-1}$  aos 78 dias e nível médio de  $35,44 \text{ g L}^{-1}$  com 58 dias de estocagem das amostras.

Tabela 11. Equações de regressão para predição de ácido úrico, proteínas totais, globulina, creatinina, fosfatase alcalina, cálcio e fósforo em amostras de plasma sanguíneo de frangos de corte aos 45 dias de idade em função do tempo de estocagem das amostras.

Variável	Estocagem			
	Equação de regressão	PC	R <sup>2</sup>	p-Value
Ácido úrico	$0,0045*AU + 2,1687$		0,96	<0,0001
Pt. totais	$0,01437*PT + 34,81924$		0,40	<0,0001
Pt. totais	$0,00000723*PT^3 - 0,00126*PT^2 + 0,06421*PT + 34,54292$	55,98	0,91	0,0572
Globulina	$0,00972*GLB + 19,12720$		0,89	<0,0001
Creatinina	$- 0,00017711*CRT + 0,14927$		0,40	0,0014
Fos. alcalina	$2,75686*FA + 3345,40744$		0,60	0,0204
Cálcio	$0,00008025*CA^2 - 0,00799*CA + 1,21783$	49,67	0,98	<0,0001
Fósforo	$- 0,00009113*P^2 + 0,01140*P + 5,11032$	62,64	0,99	<0,0001

PC: Ponto crítico obtido da derivação da equação quadrática e cúbica; p-Value: Valor de p da equação de regressão.

#### 4.4 Discussão

Os metabólitos sanguíneos refletem o estado nutricional de modo imediato das aves. Existem algumas divergências entre autores com relação ao tipo e idade a que as aves são submetidas ao jejum ou restrição alimentar, ou ainda a intensidade e duração desta restrição (RAHIMI et al., 2015).

As concentrações séricas e plasmáticas de proteínas totais, bem com as concentrações plasmáticas de albumina e globulina não foram influenciadas pelo tempo de jejum de até 12 horas. A concentração de proteínas totais reflete o equilíbrio das proteínas circulantes, sendo assim, o tempo prolongado de jejum não influenciou a mobilização de proteínas dos tecidos musculares e sua síntese ou degradação pelo fígado.

Diferenças nos valores de compostos bioquímicos do sangue, encontradas neste trabalho em relação aos reportados na literatura, são provavelmente devidas às mudanças fisiológicas consideradas normais entre as diferentes fases de crescimento em frangos de corte. Proteínas totais e as concentrações plasmáticas de albumina e globulinas não tiveram grandes oscilações em suas concentrações, o que pode ser reflexo do consumo *ad libitum* das aves, anterior aos tempos de jejum avaliados (SILVA et al., 2007).

Principalmente, as proteínas totais e a albumina podem sofrer variações nas aves e mudanças em suas concentrações são dependentes de fatores intrínsecos do animal e da função fisiológica das proteínas do sangue. Possíveis variações, nas concentrações de proteínas totais e albumina no sangue, pode ser efeito direto da alta demanda por aminoácidos que são demandados pelo intenso crescimento das aves atualmente (PIETROWSKA et al., 2011).

Alterações nas concentrações em certos metabólitos sanguíneos podem ser um indicativo do tipo de reserva de energia utilizada durante o jejum. A concentração de ácido úrico no sangue é um indicativo de catabolismo protéico, pois as aves excretam ácido úrico como produto final do metabolismo do nitrogênio (SCANES, 2015). No entanto, quando comparamos os resultados de ácido úrico e proteínas totais não é possível afirmar que houve mobilização de proteína e sua utilização como fonte de energia durante as 12 horas de jejum.

Para uma análise mais aprofundada, seria necessário avaliar as concentrações séricas e plasmáticas de  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -OHB), que é um dos corpos cetônicos produzidos após oxidação de ácidos graxos resultante da hidrólise de triglicerídeos, para verificar se houve mobilização de proteínas ou ácidos graxos como principal fonte de energia durante o jejum (LE MAHO et al., 1981; CHEREL et al., 1988b; BOISMENU et al., 1992). Neste sentido, a análise das concentrações séricas e plasmáticas de triglicerídeos também se faz necessária. No entanto,

em aves os níveis de  $\beta$ -hidroxibutirato estão sujeitas a maior variação do que o acetoacetato, ambos estão relacionados com reações de catabolismo.

Demir et al. (2004) relataram que a albumina sanguínea pode sofrer aumento de 25% em sua concentração, ou ainda sofrer decréscimo de até 50 % dependendo da idade e do tempo de restrição alimentar, anterior a coleta e análise sanguínea. Os dados para albumina em relação ao tempo de jejum, do presente estudo, não tiveram comportamento que corroborem com os encontrados pelos autores.

O período até os 45 dias de idade é caracterizado por amplo suprimento de aminoácidos para o crescimento. O fígado tende a manter a síntese de proteínas séricas para síntese de proteína muscular. Alterações nas concentrações de proteínas totais e albumina, podem estar associadas a mudanças na nutrição, pois a ração final possui menor teor proteico, ou ainda alterações no consumo de alimento ou intensa deposição proteica pode influenciar a concentração de proteínas no sangue (THÓTAVÁ et al., 2019).

As concentrações de proteínas totais do presente estudo, estão condizentes com a literatura, não sendo possível afirmar que a composição nutricional da ração final tenha influenciado nas concentrações séricas e plasmáticas de proteínas totais e albumina.

A explicação biológica para a não redução de proteínas totais e albumina não está totalmente clara, mas pode estar relacionado ao curso do tempo do metabolismo pós-prandial para estes analitos (MORA et al., 2008). Em avaliações na área clínica humana, por exemplo, as concentrações séricas de cálcio não foram influenciadas pelo período pós-prandial quando colhidas amostras de sangue uma, duas e três horas após a ingestão de alimento (THODE et al., 1985).

O jejum pode causar estresse oxidativo, que leva à formação de espécies de oxigênio reativo (radicais livres) (Khan et al., 2012; Majid et al., 2015; Chand et al., 2018), o que resultaria em desnaturação de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e enzimas, devido à redução de ingestão de proteína, seja através do jejum ou redução na dieta o que poderia causar deficiência de aminoácidos essenciais e levar a alterações nas concentrações de proteínas totais no sangue (Laudadio et al., 2012).

Alterações nas concentrações séricas e plasmáticas de proteínas totais, ácido úrico e  $\beta$ -hidroxibutirato, indicariam uma mudança na utilização de proteínas versus lipídios durante o jejum prolongado (BOISMENU et al., 1992). Como o período de jejum de até 12 horas, não influenciou de maneira expressiva as concentrações de proteínas totais e ácido úrico, não é possível afirmar que houve mobilização de proteínas como fonte de energia.

A diminuição na concentração de proteínas totais, provavelmente estaria seguida de uma redução nas concentrações sanguíneas de aminoácidos glicogênicos, como lisina, alanina, serina e glutamina (CUENDET et al., 1975; BRADY et al., 1978; FREMINET & LECLERC 1980, GOODMAN et al., 1980; LE NINAN al., 1988).

Valores de ácido úrico em espécies aviárias são dados como normais de 2 a 15 mg dL<sup>-1</sup>. (Benez et al., 2004). Concentrações superiores a 15 mg dL<sup>-1</sup> no sangue sugerem alterações na função renal (Campbell et al., 2004) ou ainda, associados a dieta e estado de hidratação das aves. No entanto, acredita-se que estes fatores não comprometeram os resultados de ácido úrico deste trabalho, que podem ser considerados normais, não havendo evidências de que a atividade renal tenha sido comprometida pelo tempo de jejum de até 12 horas, pois, a concentração média geral do ácido úrico foi de 2,45 mg dL<sup>-1</sup>.

Segundo Rezende et al. (2019), valores mais elevados de ácido úrico podem refletir metabolismo proteico mais intenso em frangos, principalmente em machos. Isso pode ser devido ao melhoramento genético das aves que atualmente são selecionadas para intensa deposição proteica.

Os resultados do presente estudo para ácido úrico e proteínas totais aos 45 dias de idade foram 60,50% e 39,38% inferiores, tanto no soro como no plasma, aos reportados por Rahimi et al. (2015) que encontraram valor médio de 3,90 mg dL<sup>-1</sup> e 49,80 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Possíveis alterações nas concentrações de ácido úrico podem ser devido a sua função antioxidante. A exposição da amostra a temperatura ambiente até sua centrifugação ou durante a marcha laboratorial pode resultar em degradação (ELLIOTT & PEAKMAN, 2008). Porém, a medida que as amostras eram coletadas e processadas, acredita-se que este tempo entre a coleta e o processamento da amostra não tenham influenciado os resultados dos analitos avaliados.

Quanto ao tempo de estocagem, Peng et al. (2010), ao avaliarem amostras de soro e plasma de ratos, concluíram que o tempo de armazenamento pode aumentar as variações nas concentrações dos analitos. E que essas variações podem afetar as conclusões da pesquisa e a tomada de decisão. O intervalo entre a colheita do sangue e a análise da amostra deve ser uma preocupação metodológica, pois pode influenciar a precisão dos dados em estudos com animais.

Cada analito sanguíneo pode responder de maneira diferente ao tempo e condições de estocagem, bem como fatores relacionados à espécie animal. Cray et al. (2009) observaram estabilidade para proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, cálcio e fósforo em amostras de soro de ratos a -20 °C por 90 dias. Em amostras de sangue de frangos de corte, Nunes et al. (2018) confirmaram essa estabilidade.

No presente trabalho, as concentrações plasmáticas de proteínas totais, globulinas e atividade da fosfatase alcalina e as concentrações séricas e plasmáticas de fósforo apresentaram estabilidade aos tempos de estocagem. Quando aplicado teste de média, quanto aos efeitos de regressão no soro e plasma, uma possível explicação, seja a variabilidade analítica intrínseca a cada analito avaliado.

Thoresen et al. (1995) também afirmaram que a estocagem não interferiu nas concentrações de proteínas totais, albumina, cálcio e fósforo em amostras de soro de cães, apresentando estabilidade por até 240 dias quando mantidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mesmo havendo oscilações estes se mantiveram dentro dos níveis de referência.

Na clínica humana Hostmark et al. (2001) avaliaram o efeito de longo período (até 25 anos) de armazenamento do soro a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e constataram não haver grandes oscilações nas concentrações para albumina. Através de análise de regressão estimaram aumento de  $0,28\text{ g L}^{-1}$  por ano. Uma possível explicação para elevação nas concentrações para longos períodos de armazenamento é o desdobramento de proteínas, expondo aminoácidos aromáticos que reagem (ligam-se) com o verde de bromocresol utilizado na análise de albumina.

Pelas concentrações séricas e plasmáticas da albumina obtidas neste estudo, parece pouco provável que a concentração de albumina na população avaliada tenha sido influenciada pelos tempos de armazenamento. Sugere-se que as propriedades de ligação do verde de bromocresol possam variar entre albumina humana e de frangos de corte.

Uma teoria comum é que o metabolismo do sangue pode levar a alterações na amostra. Neste sentido, o congelamento visa interromper o metabolismo dos eritrócitos e leucócitos (KNOWLES et al., 2006). No entanto, não está totalmente clara como a dinâmica do congelamento e descongelamento da amostra pode afetar a concentração de certos analitos. Para o ácido úrico que apresentou aumento de sua concentração a medida que se aumentou o tempo de estocagem, este efeito pode ter sido causado por mudanças na concentração de água na amostra (LADERSON et al., 1974). Além disso, sugere-se que com o aumento do tempo de estocagem possa ter ocorrido desdobramentos de proteínas ou enzimas influenciando nos resultados.

No presente trabalho, as concentrações plasmáticas de proteínas totais, globulina, fósforo e atividade da fosfatase alcalina foram representativas do tempo zero ao longo do tempo de armazenamento, quando aplicado o teste de Scott Knott. Para as concentrações séricas, cada analito teve um efeito em particular.

Na clínica humana, Clark et al. (2003) avaliando a estocagem de amostras de sangue total em EDTA sob refrigeração ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e temperatura ambiente ( $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), por sete dias antes da

centrifugação, observaram estabilidade para proteínas totais e albumina, em comparação com amostras imediatamente processadas. A redução na concentração destes dois analitos foi de 4%. Menor estabilidade foi apresentada pela creatinina com aumento de 20% em seus valores em relação a amostra refrigerada. Mencionam ainda, que não observaram alterações significativas para os analitos considerados estáveis em amostras de plasma armazenadas a -80 °C durante até cinco anos.

Jensen et al. (2008) recomendaram algumas condições pré-analíticas a fim de garantir melhor qualidade nos resultados, como: manutenção da temperatura entre 20 e 25 °C durante armazenamento e transporte e que este tempo de armazenamento sem centrifugação não seja superior a seis horas. As amostras do presente trabalho foram processadas 15 minutos após a colheita, não sendo possível afirmar que o tempo entre a colheita e centrifugação tenha afetado os resultados.

Leino & Koivula (2009) confirmaram a estabilidade de amostras não centrifugadas por até seis horas em temperatura de 8 a 22 °C, para albumina, creatinina, fosfatase alcalina e cálcio, com excessão do fósforo, condizentes com os resultados encontrados por Peakman & Elliott (2008) e Zwart et al. (2009).

Em trabalho semelhante, Tanner et al. (2008) avaliaram três diferentes tempos (04, 12 e 24 horas) e temperaturas de armazenamento (15 25 e 35 °C) antes do processamento das amostras. Os autores observaram que a creatinina, o cálcio e o fósforo foram os analitos que apresentaram menor estabilidade a esta etapa pré-analítica quando comparados ao tempo zero.

Diante do exposto, a etapa pré-analítica pode exercer algum impacto sobre os resultados o que pode levar a possíveis erros de interpretação e confiabilidade. Portanto, a padronização dos processos é fundamental para a confiabilidade dos resultados. Esses cuidados foram tomados para que os possíveis efeitos da etapa pré-analítica fossem minimizados ao máximo.

Oliveira et al. (2011) observaram diferença significativa para proteínas totais em amostras de soro ovino armazenado a -20 °C por até 28 dias. Os valores mostraram-se aumentados quando comparadas ao soro fresco (tempo 0). De modo semelhante, Comis et al. (2006) em amostras de soro equino, também observaram aumento nas concentrações de proteínas totais após 30 dias de armazenamento e diminuição dos valores após 60 e 90 dias de armazenamento a -20 °C.

As concentrações de cálcio encontradas na fração plasma, sofreram interferência do anticoagulante utilizado. O EDTA é um ácido contendo quatro grupos de ácido e dois grupos de amina contendo um par de elétrons que quelam o cálcio e demais metais divalente. O cálcio é necessário para que ocorra a ativação de ampla gama de enzimas necessárias à cascata de

coagulação e sua remoção evita a coagulação (BANFI et al. 2007). Isso explica as diferenças nas concentrações entre a fração soro e plasma. Neste sentido, não recomenda-se a utilização do EDTA para mensurar a concentração de cálcio plasmático.

Uma possível explicação para maior concentração de certos analitos no soro em relação ao plasma, pode ser atribuída à ação que anticoagulantes de baixo peso molecular, como o fluoreto de sódio, podem exercer sobre a amostra. O efeito osmótico de anticoagulantes de baixo peso molecular tende a remover uma quantidade de água do interior dos eritrócitos transferindo-a para o plasma, o que ocasionaria uma diluição das concentrações plasmáticas de alguns metabólitos (ALPER et al., 1974). Segundo Grande et al. (1964), essa remoção de água dos eritrócitos, pode fazer com que ocorra maior diluição dos constituintes plasmáticos, resultando em menor concentração dos analitos nessa fração sanguínea. Cabe destacar ainda, que pode ocorrer redistribuição osmótica entre as células sanguíneas e o plasma, podendo interferir nos resultados dos analitos (GRANDE et al., 1964).

A utilização do anticoagulante fluoreto de sódio pode interferir analiticamente na espectrofotometria, pois este pode provocar a formação de fibrina nas amostras durante a coleta (FERNANDEZ et al., 2013; AL-KHARUSI et al., 2014; BONETTI et al., 2016). Deve-se após a separação do plasma, ser observado a formação de fibrina, e se possível, realizar uma nova coleta ou realizar a centrifugação da amostra com maior força de gravidade.

O manejo e intensidade de luz é um importante fator na produção de frangos. Os programas de luz comumente utilizados iniciam com 20 lux, reduzindo para 5 lux ou menos. Olanrewaju et al. (2010) não observaram efeito de diferentes intensidades de luz (0,5; 3,0 e 20 lux) sobre parâmetros hematológicos e concentração de proteínas totais, havendo aumento nas concentrações de triglicerídeos e HDL, analitos da via glicolítica em frangos de corte dos 21 aos 56 dias de idade.

De modo contrário, no presente estudo, houve efeito da intensidade luminosa sobre as concentrações dos metabólitos avaliados. Maiores concentrações dos analitos foram observados para a intensidade de 5 lux, o que pode ser devido ao menor estímulo e atividade física das aves em relação a intensidade de 20 lux. Aves expostas a 20 lux dispenderiam maior quantidade de energia para atividades físicas e não para o crescimento (OLANREWAJU et al. 2008; OLANREWAJU et al. 2010). Isso pode ser observado nas concentrações de creatinina deste trabalho, que é um indicador da atividade muscular, sendo que seus valores foram maiores na intensidade de 20 lux.

As concentrações de proteínas totais, albumina e globulina foram maiores a 5 lux, o que pode justificar o melhor crescimento das aves sobre essa intensidade luminosa, pois tem-se um



aumento de proteínas circulantes, e como a albumina é uma proteína transportadora, há maior aporte de nutrientes para o crescimento muscular. Isso justifica a utilização da intensidade de 5 lux na avicultura industrial.

Olanrewaju et al. (2012) avaliaram diferentes intensidades de luz (0,2; 2,5; 5; 10; e 25 lux), em frangos de 28 a 56 dias de idade, sobre parâmetros hematológicos e observaram que somente para a intensidade de 0,2 lux houve aumento do pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e redução na pressão de CO<sub>2</sub>, hemoglobina e hematócrito. Tais resultados estão relacionados a menor movimentação das aves e maior taxa respiratória. Sugere-se que o pH do sangue possa atuar na regulação da respiração e que também possa ter influência no controle químico da respiração, pois o sistema respiratório participa do equilíbrio ácido-base sanguíneo.

Olanrewaju et al. (2013) não observaram efeito da intensidade luminosa sobre as concentrações séricas de proteínas totais e cálcio, sendo mais importante o fotoperíodo, porém este não foi um fator avaliado neste estudo.

Acredita-se que maiores concentrações de proteínas totais estejam relacionadas com a maior concentração do hormônio triiodotironina (T3), encontrado por Olanrewaju et al. (2013) em fotoperíodo longo e regular ou intermitente, tais resultados podem estar associados a maior deposição proteica ou pode estar relacionado a maior ingestão de alimento durante o período de luz.

No presente trabalho, o fotoperíodo utilizado (16L:8E), foi igual para ambas as intensidades, e estas tiveram efeito sobre os metabólitos avaliados. Como as aves foram expostas as diferentes intensidades por apenas três dias antes da colheita de sangue, questiona-se se este tempo foi suficiente para causar alterações a nível metabólico nas aves.

Olanrewaju et al. (2014) ao avaliarem intensidades de luz semelhantes as deste trabalho (0,2; 2,5; 5; 10; e 25 lux m<sup>-2</sup>), encontraram diferença sobre os níveis de cálcio, em duas linhagens de frangos de corte (Ross 308 e Ross 708). Os pesquisadores avaliaram também os níveis de triiodotironina (T3), tiroxina (T4), corticosterona e parâmetros hematológicos, não havendo diferença estatística. As diferentes intensidades de luz a que as aves foram expostas não causaram estresse, capaz de causar alterações nas concentrações de corticosterona.

Os resultados deste trabalho para creatinina e cálcio plasmático, tiveram maior concentração quando da utilização de 20 lux, sendo 6 e 40,18% em relação a 5 lux, respectivamente. As concentrações séricas de proteínas totais, albumina, globulina e ácido úrico foram 7; 6,14; 8,11 e 7,87% menores a 20 lux, em relação a 5 lux. Já as concentrações plasmáticas de proteínas totais, albumina, globulina e atividade da fosfatase alcalina foram menores a 20 lux, sendo 5,41; 5,22; 5,37 e 9,38%, respectivamente.

A redução ou aumento na concentração de parâmetros bioquímicos são dependentes de diversos fatores dentre eles fisiológicos e metabólicos. As variações nas concentrações de alguns analitos avaliados neste trabalho, podem estar relacionadas com a variabilidade analítica, pois, mesmo avendo diferença estatística, não é possível afirmar que esta diferença seja clinicamente significativa e que tenha comprometido os resultados em termos biológicos e fisiológicos.

#### **4.5 Conclusão**

Para proteínas totais ambas as frações podem ser utilizadas. O plasma pode ser armazenado por até 120 dias, para a fração soro recomenda-se estocagem por até 60 dias a - 20 °C.

Para globulina sérica os modelos de regressão quadrático e cúbico estimaram 6 e 7 horas de jejum, respectivamente.

Podem ser utilizadas ambas as frações soro ou plasma para mensurar ácido úrico e creatinina, porém recomenda-se a análise imediata após a colheita da amostra.

As concentrações séricas e plasmáticas de fósforo não foram afetadas pelo tempo de armazenamento, e as amostras podem ser armazenadas por até 120 dias.

Com excessão da creatinina e cálcio plasmático as demais variáveis apresentaram maior concentração quando da utilização de 5 lux, tanto no soro como no plasma.

Não recomenda-se a utilização do anticoagulante ETDA para a dosagem de cálcio e atividade de fosfatase alcalina.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há necessidade de se ampliar os estudos com frangos de corte utilizando-se de outros anticoagulantes a fim de avaliar a estabilidade dos parâmetros bioquímicos sanguíneos nas diferentes frações soro e plasma. Pode ser avaliado ainda um tempo maior de jejum por até 24 horas e como este interfere nas concentrações dos parâmetros bioquímicos do sangue em frangos de corte. Sugere-se ainda mensurar as concentrações de  $\beta$ -hidroxibutirato e acetoacetato, com o intuito de verificar se há ocorrência de mobilização de proteínas ou lipídios como fonte de energia.

Sugere-se para uma pesquisa futura a exposição das aves as diferentes intensidades de luz de 01 até 45 dias e avaliar o consumo de alimento sob diferentes intensidades de luz e se este terá impacto sobre as concentrações séricas e plasmáticas dos metabólitos avaliados. Tais sugestões justificam-se, pois, são escassos os dados de literatura sobre os efeitos da intensidade luminosa sobre parâmetros bioquímicos do sangue em frangos de corte.

## 6. REFERÊNCIAS

- AL-KHARUSI, A.; AL-LAWATI, N.; AL-KINDI, M.; MULA-ABED, W. A. Are tubes containing sodium fluoride still needed for the measurement of blood glucose in hospital laboratory practice?. **Oman Medical Journal**, 29 (6): 404-409, 2014.
- ALONSO-ALVAREZ. C.; FERRER, M. A biochemical study of fasting, subfeeding, and recovery process in yellow-legged gulls. **Physiological and Biochemical Zoology: Ecological and Evolutionary Approaches**, 74 (5): 703-713, 2001.
- ALPER, C. Specimen collection and preservation. In: HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. W. **Clinical Chemistry, Principles and Techniques**. 11 ed. New York: Harper and Row Publishers, p. 373-388, 1974.
- BANFI, G.; SALVAGNO, G.L.; LIPPI, G.; The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 45 (5): 565-576, 2007.
- BEHBOUDI, H.; ESMAEILPOUR, O.; MIRMAHMOUDI, R.; MAZHARI, M. The influence of drinking water containing lemon juice and thyme supplemented diet on performance and some blood parameters of broilers under heat stress. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, 6 (1): 169-174, 2016.
- BENES, S. **Aves: criação, clínica, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados**. Ribeirão Preto SP: 4 ed. Tecmedd, 2004.
- BOISMENU, C.; GAUTHIER, G.; LAROCHELLE, J.; Physiology of prolonged fasting in greater snow geese (*Chen caerulescens atlantica*). **The Auk**, 109 (3): 511-521, 1992.
- BONETTI, G.; CANCELLI, V.; COCCOLI, G.; PICCINELLI, G.; BRUGNONI, D.; CAIMI, L.; CARTA, M. Which sample tube should be used for routine glucose determination?. **Primary Care Diabetes**, 10 (3): 227-232, 2016.
- BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P.; SAITO, M.E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4 p.675-677, 2006. (Comunicação)
- BRADY, L.J.; ARMSTRONG, M.K.; MUIRURI, K.L.; RONSOS, D.R.; BERGEN, W.G.; LEVEILLE, G.A. Influence of prolonged fasting in the dog on glucose turnover and blood metabolites. **The Journal of Nutrition**, 107 (6): 1053-1061, 1977.
- BRINC, D.; CHAN, M.K.; VENNER, A.A.; PASIC, M.D.; COLANTONIO, D.; KYRIAKOPOLOU, L.; ADELI, K. Long-term stability of biochemical markers in pediatric serum specimens stored at - 80 °C: A CALIPER Substudy. **Clinical Biochemistry**, 45 (10-11): 816-826, 2012.
- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. BRUNS, D.E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book**. Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 2012. 1088p.

CAMPBELL, T.W. Clinical chemistry of birds. In: THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. p. 479-492

CASTELLINI, M.A.; REA, L.D.; The biochemistry of natural fasting at its limits. **Experimentia**, 48: 575-582, 1992.

CERÓN, J.J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; HENNEMANN, C.; TECLES, F. The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. **The Veterinary Journal**, 167 (3): 294-301, 2004.

CHAND, N.; NAZ, S.; REHMAN, Z.; KHAN, R.U. Blood biochemical profile of four fast-growing broiler strains under high ambiente temperature. **Applied Biological Chemistry**. Published online: <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0358-4>, 2018.

CHEREL, Y.; ROBIN, J.P.; LE MAHO, Y. Physiology and biochemistry of long term fasting in birds. **Canadian Journal of Zoology**, 66: 159-166, 1988.

CLARK, S.; YOUNGMAN, L.D.; PALMER, A.; PARISH, S.; PETOL, R.; COLLINS, R. Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies. **International Journal of Epidemiology**, 32 (1): 125-130, 2003.

COMIS, M.B. Influencia do tempo e temperatura sobre a estabilidade do soro e plsmasanguíneo de equinos Mangalarga Marchador. 2006. **Tese** (Tese Pós-graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

CÓRDOVA-NOBOA, H.A.; OVIEDO-RONDÓN, E.O.; SARSOOR, A.H.; BARNES, J.; SAPCOTA, D.; LÓPEZ, D.; GROSS, L.; RADEMACHER-HEILSHORN, M.; BRAUN, U. Effect of guanidinoacetic acid supplementation on live performance, meat quality, pectoral myopathies and blood parameters of male broilers fed corn-based diets with or without poultry by-products. **Poultry Science**, 97 (7): 2494-2505, 2018.

CRAY, C.; RODRIGUEZ, M.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N.H. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 48 (2): 202-204, 2009.

CUENDET, G.S.; LOTEN, E.G.; CAMERON, D.P.; RENOLD, A.E.; MARLIS, E.B. Hormone-substrate responses to total fasting in lean and obese mice. **American Journal of Physiology**, 228 (1): 276-283, 1975.

CUHADAR, S.; KOSEOGLU, M.; ATAY, A.; DIRICAN, A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. **Bichemia Medica**, 23 (1): 70-77, 2013.

DEMIR, E.; SARICA, S.; SEKEROGLU, A.; OZCAN, M.A.; SEKER, Y. Effects of early and late feed restriction or feed withdrawal on growth performance, ascite and blood constituents of broiler chickens. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science**, 54 (3): 152-158, 2004.

DIVYA, P.D.; JAYAVARDHANAN, K.K. Effect of temperature and storage time on hepatobiliary enzyme activities in goat serum. **Veterinary World**, 3 (6): p. 277-279, 2010

DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G. Determination of serum albumin. **Standard Methods of Clinical Chemistry**. Academic Press N.Y., 1972.

DUKES. **Fisiologia dos animais domésticos**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1594p.

ELLIOTT, P.; PEAKMAN, T. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. **International Journal of Epidemiology**, 37 (2): 234-244, 2008.

FERNANDEZ, L.; JEE, P.; KLEIN, M. J.; FISCHER, P.; PERKINS, S. L.; BROOKS, S. P. A comparison of glucose concentration in paired specimens collected in serum separator and fluoride/potassium oxalate blood collection tubes under survey 'field' conditions. **Clinical Biochemistry**, 46 (4-5): 285-288, 2013.

FIDAN, E.D.; NAZLIGUL, A.; TURKYILMAZ, M.K.; AYPAK, S.U.; KILIMCI, F.S.; KARAARLAN, S.; KAYA, M. Effect of photoperiod length and light intensity on some welfare criteria, carcass, and meat quality characteristics in broilers. **Brazilian Journal of Animal Science**, 46 (3): 202-210, 2017.

FRIMINET, A.; LECLERC, L. Effect of fasting on glucose lactate and alanine turnover in rats and guinea pigs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 65B: 363-367, 1980.

FRIEDRICHS, K.R.; HARR, K.E.; FREEMAN, K.P.; SZLADOVITS, B.; WALTON, R.M.; BARNHART, K.F.; BLANCO-CHAVEZ, J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, 41 (4): 441-453, 2012.

GOODMAN, M.N.; LARSEN, P.R.; KAPLAN, M.M.; AOKI, T.T.; YOUNG, V.R.; RUDERMAN, N.B. Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. **American Journal of Physiology**, 239 (Endocrinology and Metabolism 2) E277-E286, 1988.

GRANDE, F.; AMATUZIO, D.S.; WADA, S., Cholesterol measurement in serum and in plasma. **Clinical Chemistry**, 10: 619-626, 1964.

HARR, K.E. Clinical chemistry of companion avian species a review. **Veterinary Clinical Pathology**, 31 (3): 140-151, 2002.

HENDERSON, A.R.; DONALD, W.M. Enzymes. **Tietz Clinical guide to laboratory test**. 5th ed. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. W.B. Saunders Company, Philadelphia USA. 2001.

HENRIKSEN, L.O.; FABER, N.R.; MOLLER, M.F.; NEXO, E.; HANSEN, A.B. Stability of 35 biochemical and immunological routine tests after 10 hours storage and transport of human whole blood at 21 °C. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, 74 (7): 603-610, 2014.

HOCKING, P.M.; MAXWELL, M.H.; MITCHELL, M.A. Relationships between the degree of food restriction and welfare indices in broiler breeder female. **British Poultry Science**. 37: 263-278, 1996.

HOCKING, P.M.; MAXWELL, M.H.; ROBERTSON, G.W.; MITCHELL, M.A. Welfare assessment of modified rearing programmes for broiler breeders. **British Poultry Science**. 42: 424-432, 2001.

HOSTMARK, A.T.; GLATTRE, E.; JELLUM, E. Effect of long-term storage on the concentration of albumin and free fatty acids in human sera. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. 61 (6): 443-448, 2001.

HORTIN, G.L. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. **Clinical Chemistry**, 52 (7): 1223-1237, 2006.

JACKSON, C.; BEST, N.; ELLIOTT, P. UK Biobank Pilot Study: Stability of haematological and clinical chemistry analytes. **International Journal of Epidemiology**, 37 (1): i16-i22, 2008.

JENSEN, E.A.; STAHL, M.; BRANDSLUND, I.; GRINSTED, P. Stability of heparin blood samples during transport based on defined pre-analytical quality goals. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 46 (2): 225-234, 2008.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6th ed., San Diego: Academic Press, 2008. 928 p.

KHAN, R.U.; LAUDADIO, V.; TUFFARELLI, V. Semen traits and seminal plasma biochemical parameters in White Leghorn layer breeders. **Reproduction in Domestic Animals**. 47: 190-195, 2012.

KITA, K.; MATSUNAMI, S.; OKUMURA, J. Relationship of protein synthesis to mRNA levels in the muscle of chicks under various nutritional conditions. **The Journal of Nutrition**. 126: 1827-1832, 1996.

LADERSON, J.H.; LIU-MEI, B.T.; MICHAEL, J.M.; KESSLER, G.; HEINZ JOIST, J. Serum versus heparinized plasma for Eighteen common chemistry test: Is serum the appropriate specimen? **American Journal of Clinical Pathology**, 62 (4): 545-552, 1974.

LAUDADIO, V.; PASSANTINO, L.; PERILLO, A.; LOPRESTI, G.; PASSANTINO, A.; KHAN, R.U.; TUFFARELLI, V. Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. **Poultry Science** 91 (1): 265-270, 2012.

LEINO, A.; KOIVULA, M.K. Stability of chemical and immunochemical analytes in uncentrifuged plasma samples. **Annals of Clinical Biochemistry**, 46 (2): 159-161, 2009.

LE NINAN, F.; CHEREL, Y.; ROBIN, J.P.; LELOUP, J.; LE MAHO, Y. Early changes in plasma hormones and metabolites during fasting in King Penguin chicks. **Journal of Comparative Physiology B**, 158: 395-401, 1988.

LE MAHO, Y.; VU VAN KHA, H.; KOUBI, H.; DEWASMES, G.; GIRARD, J.; FERRÉ, P.; CAGNARD, M. Body composition energy expenditure, and plasma metabolites in long term fasting geese. **American Journal of Physiology**, 241 (Endocrinology and Metabolism): E324-E354, 1981.

LEWIS M.R.; CALLAS, P.W.; JENNY, N.S.; TRACY, R.P. Longitudinal stability of coagulation, fibrinolysis, and inflammation factors in stored plasma sample. **Thrombosis and Haemostasis**, 86: 1495-1500, 2001.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Waltham: Academic Press, 2008. p. 839-872.

MAJID, A.; QURESHI, M.S.; KHAN, R.U.; In vivo adverse effects of alpha-tocopherol on the semen quality of male duck. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 99 (5): 841-846, 2015.

MOHRI, M.; ALLAHYARI, L.; SARDARI, K. Effects of common anticoagulants on routine plasma biochemistry of horse and comparison with serum. **Journal of Equine Veterinary Science**, 27 (7): 313-316, 2007.

MOHRI, M.; SHAKERI, H.; ZADEH, S.L. Effect of common anticoagulants (heparina, citrate and EDTA) on routine plasma biochemistry of cattle. **Comparative Clinical Pathology**, 16 (3): 207-209, 2007.

MOHRI, M.; REZAPOOR, H.; Effects of heparina, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of sheep: comparison with serum. **Research in Veterinary Science**, 86: p.111-114, 2009.

NUNES, R.V.; BROCH, J.; WACHHOLZ, L.; DE SOUZA, C.; DAMASCENO, J.L.; OXFORD, J.H.; BLOXHAM, D.J.; BILLARD, L.; PESTI, G.M. Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. **Poultry Science**, 97: 3746-3754, 2018.

OLANREWaju, H.A.; THAXTON, J.P.; DOZIER, W.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Interactive effects of ammonia and light intensity on hematochemical variables in broiler chickens. **Poultry Science**, 87: 1407-1414, 2008.

OLANREWaju, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effect of ambiente temperature and light intensity on physiological reactions heavy broiler chickens. **Poultry Science**, 89: 2668-2677, 2010.

OLANREWaju, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effect of varying light intensity on blood physiological reactions of broiler chickens grown to heavy weights. **International Journal of Poultry Science**, 11 (2): 81-87, 2012.

OLANREWaju, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Interactive effects of photoperiod and light intensity on blood physiological and biochemical reactions of broilers grown to heavy weights. **Poultry Science**, 92: 1029-1039, 2013.



OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effects of genetic strain and light intensity on blood physiological variables of broilers grown to heavy weights. **Poultry Science**, 93: 970-978, 2014.

OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effects of color temperatures (Kelvin) of LED bulbs on blood physiological variables of broilers grown to heavy weights. **Poultry Science**, 94: 1721-1728, 2015.

OLANREWAJU, H.A.; COLLIER, S.D.; PURSWELL, J.L.; BRANTON, S.L. Effects of light sources and intensity on broilers grown to heavy weights: hematophysiological and biochemical assessment. **International Journal of Poultry Science**, 15 (10): 384-393, 2016a.

OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Interactive effects of ambiente temperature and lighth sources at high relative humidity on growth performance and blood physiological variables in broilers grown to 42 day of age. **International Journal of Poultry Science**, 15 (10): 394-400, 2016b.

OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, S.D.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effects of light ingress through ventilation fan apertures on selected blood variables of male broilers. **Intenational Journal of Poultry Science**, 16 (8): 288-295, 2017.

OLIVEIRA, F.S.; FALBO, M.K.; SANDINI, I.E.; ISHIY, L.E. Efeito do congelamento e do tempo de armazenamento do soro sanguíneo de cordeiros na determinação de parâmetros bioquímicos. **Semina: Ciências Agrárias**, 32 (2): 717-722, 2011.

PEAKMAM, T.; ELLIOTT, P. The UK Biobank sample handling and storage validation studies. **International Journal of Epidemiology**, 37 (1): i2-i6, 2008.

PENG, T.; HSU, B.; YANG, F.; CHAO, Y.C.; HARN, H.; LEE, R. Stability of blood biochemistry levels in animal model research: Effects of storage condition and time. **Biological Research for Nursing**, 11 (4): 395-400, 2010.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental** Piracicaba: Esalq, 2009. 477p.

PIOTROWSKA, A.; BURLIKOWSKA, A.K; AZYMECZKO, R. Changes in blod chemistry in broiler chickens during the fattening period. **Folia Biologica (Kraków)**, 59 (3-4): 183-187, 2011.

RAHIMI, SOLMAZ.; SEIDAVI, A.; SAHRAEI, M.; BLANCO, F.P.; SCHIAVONE, A.; MARIN, A.L.M. Effects of feed restriction and diet nutrient density during re-alimentation on growth performance, carcass traits, organ weighth, blood parameters and the immune response of broilers. **Italian Journal of Animal Science**, 14 (3): 583-590, 2015.

RAJMAN, M.; JURÁNI, M.; LAMOSOVÁ, D.; MÁCAJOVÁ, M.; SEDLACKOVÁ, M.; KOST'ÁL, L.; JEZOVÁ, D.; VÝBOH, P. The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens (*Gallus gallus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 145: 363-371, 2006.

REZENDE, M.S.; SILVA, P.L.; GUIMARÃES, E.C.; LELLIS, C.G.; MUNDIM, A.V. Variações fisiológicas, influencia da idade e sexo no perfil bioquímico sanguíneo de aves da

linhagem pesada de frangos de corte na fase de recria. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.5, p.1649-1658, 2019.

RIFAI, N.; HORVATH, A.R.; WITTEWER, C.T. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018.

RODRÍGUEZ, P.; TORTOSA, F.S.; VILLAFUERTE, R. The effects of fasting and refeeding on biochemical parameters in the red-legged partridge (*Alectoris rufa*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 140: 157-164, 2005.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; HANNAS, M.I. et al. **Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. Viçosa – MG, Departamento de Zootecnia – UFV, 2017, 488p.

SADEGHI, A.A.; MOHAMADI-SAEI, M.; AHMADVAND, H. The efficacy of dietary savory essential oil on reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 20 (4): 481-486, 2014.

SAS Institute INC. SAS University Edition: Installation Guide for Windows. Cary: SAS Institute, 2014. 23p.

SCANES, C.G. **Sturkie's Avian Physiology**. 6 ed. Elsevier. Department of Biological Sciences, University of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA, 2015.

SILVA, P.R.L.; FREITAS NETO, O.C.; LARURENTIZ, A.C.; JUNQUEIRA, O.M; FAGLIARI, J.J. Blood serum components and serum protein test of Hybro-PG broilers of different ages. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 9 (4): 229-232, 2007.

SILVA, B.R.; MAREZE, M.; FALBO, M.K.; SANDINI, I.E.; GROFF, P.M. Bioquímico plasmático de cães: efeitos dos diferentes anticoagulantes em comparação ao soro. **Colloquium Agrariae**, 11 (1): 33-41, 2015.

SPINELLI, M.O.; CRUZ, R.J.; GODOY, C.M.D.S.C.; MOTTA, M.C. Efeito da temperatura e tempo no armazenamento de metabolitos no plasma de ratos Wistar recém desmamados. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, 1 (4): 317-321, 2012.

SWARNA, C.L.; RAO, S.V.; SRINIVAS, G.; REDDY, V.R.; Effect of unsaturated to saturated fatty acids ratio of supplemental fat in the diet with or without L-Carnitine on performance of broiler chicken. **Indian Journal of Animal Nutrition**, 35 (1): 90-96, 2018.

TANNER, M.; KENT, N.; SMITH, B.; FLETCHER, S.; LEWER, M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. **Annals of Clinical Biochemistry**, 45 (4): 375-379, 2008.

TAYLOR, E.C.; SETHI, B. Stability of 27 biochemistry analytes in storage at a range of temperatures after centrifugation. **British Journal of Biomedical Science**, 68 (3): 147-157, 2011.

THORESEN, S.I.; TVERDAL, A.; HAVRE, G.; MORBERG, H. Effects of storage time and freezing temperature on clinical chemical parameters from canine serum and heparinized plasma. **Veterinary Clinical Pathology**, 24 (4): 129-135, 1995.

TÓTHOVÁ, C.; SESZTÁKOVÁ, E.; BIELIK, B.; NAGY, O. Changes of total protein and protein fractions in broiler chickens during the fattening period. **Veterinary World**, 12 (4): 598-604, 2019.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, 6 (1): 24-27, 1969.

WAIDE, P. **Phase out of incandescent lamps: Implications for international supply and demand for regulatory compliant lamps**. Abril. Paris, France: Internal Energy Agency. Retrived: [http://www.iea.org/publications/free\\_new\\_Desc.asp?PUBS-ID2256](http://www.iea.org/publications/free_new_Desc.asp?PUBS-ID2256).

WORK, T.M.; MASSEY, J.G.; JOHNSON, L. DOUGILL, S. BANKO, P.C. Survival and physiologic response of common Amakihi and Japanese white-eyes during simulated translocation. **The Condor**, 101: 21-27, 1999.

WU, A.H.B. **Tietz Clinical Guide to Laboratory Test**. 4th ed. W.B. Saunders Company, 2006.

YAMAN, M.A.; KITA, K.; OKUMURA, J. Different responses of protein synthesis to refeeding in various muscle of fasted chicks. **British Poultry Science**. 41: 224-228, 2000a.

YAMAN, M.A.; KITA, K.; OKUMURA, J. Various macronutrient intakes additively stimulate protein synthesis in liver and muscles of food-deprived chicks. **The Journal of Nutrition**. 130: 70-76, 2000b.

ZAKARIA, H.A.; JALAL, M.; AL-TITI, H.H.; SOUAD, A. Effect of sources and level of dietary Zinco on the performance, carcass traits and blood parameters of broilers. **Bazilian Journal of Poultry Science**, 19 (3): 519-526, 2017.

ZWART, S.R.; WOLF, M.; ROGERS, A.; RODGERS, S.; GILLMAN, P.L.; HITCHCOX, K.; ERICSON, K.L.; SMITH, S.M. Stability of analytes related to clinical chemistry and bone metabolism in blood specimens after delayed processing. **Clinical Biochemistry**, 42 (9): 907-910, 2009.