

AVALIAÇÃO DE SORO SANGUÍNEO DE OVELHAS TRATADAS COM
COMPOSTOS BIOATIVOS USANDO ESPECTROMETRIA DE RAIOS X

Carla Lemos da Silva Mota

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Rio de Janeiro

Março de 2012

AVALIAÇÃO DE SORO SANGUÍNEO DE OVELHAS TRATADAS COM
COMPOSTOS BIOATIVOS USANDO ESPECTROMETRIA DE RAIOS X

Carla Lemos da Silva Mota

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUO ALBERTO LUIZ COIMBRA
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA
NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc

Prof. Silvana Moreira, D.Sc

Prof. Simone Coutinho Cardoso, D.Sc

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D.Sc

Prof. Regina Cely Rodrigues Barroso, D.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2012

Mota, Carla Lemos da Silva

Avaliação de Soro Sanguíneo de Ovelhas Tratadas com
Compostos Bioativos Usando Espectrometria de Raios X / Carla
Lemos da Silva Mota – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

X, 67p.: il.; 29,7 cm.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Tese (Doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Nuclear, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 51-67

1. Compostos funcionais. 2. TXRF. I. Braz, Delson *et al.*
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de
Engenharia Nuclear. III. Título

*“e o enchi do espírito de Deus, no
tocante à sabedoria, ao entendimento, à
ciência e a todo ofício.”
(Êxodo 31:3)*

*Ao meu marido Hercules Junior e à
minha filha Thalita, bênçãos de Deus na
minha vida, por todo apoio de sempre.*

*Aos meus pais, Isaias e Valdéa, por toda
a minha educação, formação e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por todas as bênçãos e por Seus benefícios em minha vida.

À professora Regina Cely, pela sua orientação e principalmente pela amizade e carinho durante todo esse trabalho.

Ao professor Delson Braz, por me orientar e me proporcionar esse momento único da minha vida.

À professora Simone Cardoso, por todo apoio e incentivo de sempre.

A todos os integrantes do Laboratório de Física Médica da UERJ.

A toda a minha família, que me ajudou de alguma maneira a realizar esse trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela realização das medidas.

E ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.).

AVALIAÇÃO DE SORO SANGUÍNEO DE OVELHAS TRATADAS COM COMPOSTOS BIOATIVOS USANDO ESPECTROMETRIA DE RAIOS X

Carla Lemos da Silva Mota

Março/2012

Orientadores: Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Programa: Engenharia Nuclear

Com o objetivo específico de avaliar possíveis reações de defesa das ovelhas quando submetidas a estresse, grupos de ovinos foram divididos em seis grupos: controle, os que receberam injeção de ACTH e mais quatro grupos que além de receberem injeção de ACTH foram tratados com extratos de planta (*Polinacea*, *Echinacea angustifolia*, *Andrographis paniculata* ou córtex de *Larix decidua*). A resposta biológica ao estresse e a atividade potencial de neutralização dos compostos funcionais foram investigados a nível de circulação sanguínea através do monitoramento de marcadores bioquímicos (utilizando a análise bioquímica) e da concentração de potássio, cálcio, cobre e zinco no sangue (utilizando a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total utilizando radiação síncrotron). A concentração média de Ca mostra uma tendência de queda para todos os compostos bioativos em relação ao grupo de controle e de ACTH. Não houve diferença significativa no nível de Cu após administração de ACTH. O tratamento com extrato *Echinacea angustifolia* resultou em um suave aumento dos níveis séricos de Cu. Isto pode ter implicações importantes para entender o efeito da adição de *Echinacea Angustifolia* nos alimentos, uma vez que Cu e suas proteínas de ligação têm claramente um papel nos mecanismos de imuno-modulação e inflamação. Uma elevada variação inter-individual nos níveis de Zn foi encontrada por SR-TXRF em todos os grupos de animais analisados, o que está de acordo com as análises bioquímicas convencionais.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.).

STUDY OF SERUM FROM SHEEP TREATED WITH BIOACTIVE COMPOUNDS
USING X-RAY SPECTROMETRY

Carla Lemos da Silva Mota

March/2012

Advisors: Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Department: Nuclear Engineering

In order to evaluate possible defensive reactions of the sheep when submitted to stress, groups of ewes were divided in six groups: control, the group that received injection of adrenocorticotrophic hormone, and four groups that received adrenocorticotrophic hormone and were treated with bioactive compounds (Polinacea, Echinacea angustifolia, Andrographis paniculata and Larix decidua). The potential advantages of using some functional food in sheep with the particular aim of increasing the natural defenses of animals to inflammatory and stress conditions were analyzed in this work with biochemical analysis and Total Reflection X-Ray Fluorescence using Synchrotron Radiation. The average concentration of Ca showed a trend to decrease for all bioactive compounds in comparison to ACTH and control group. No significative difference in Cu level was found after ACTH administration. Treatment with Echinacea Angustifolia extract resulted in a slight increase of Cu serum levels. This could have important implications to understand the effect of EA addition in food, since Cu and its binding proteins have a clear role in immuno-modulation mechanisms and inflammation. High inter-individual variation in Zn levels was found by SR-TXRF in all analyzed animal groups, in accord with conventional biochemical analysis.

ÍNDICE

Mota, Carla Lemos da Silva.....	iii
Carla Lemos da Silva Mota.....	viii
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II.....	5
II. Fundamentos Teóricos.....	5
II.1 – Estresse.....	5
II.2 – Componentes bioativos.....	6
II.3 – Extratos de plantas.....	7
II.3.1 – Echinacea Angustifolia (EA).....	8
II.3.2 – Polinacea TM (PO).....	11
II.3.3 – Andrographis Paniculata (PA).....	12
II.3.4 – Larix Decidua.....	13
II.4. Espectroscopia por fluorescência de raios X.....	14
II.4.1. Refração e reflexão dos raios X.....	17
II.4.2. Fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF).....	19
II.4.3. Análise quantitativa	20
II.4.5. Limite mínimo de detecção (LMD).....	23
II.5. Radiação Síncrotron.....	24
CAPÍTULO III.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
III.1 – Protocolo experimental.....	26
III.2 – Preparação das amostras para análise por TXRF.....	30
III.3 – Preparo dos padrões.....	30
III.5 – Instrumentação.....	31
CAPÍTULO IV.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
IV.1. Análise do soro por SR-TXRF.....	33
IV.1.1. Sensibilidade Relativa.....	34
IV.1.2. Limite de detecção (LMD).....	34
IV.1.3. Materiais certificados.....	35
IV.2. Comparação entre as técnicas.....	35
IV.2.1. Comparação entre as amostras CTR X ACTH.....	35
IV.2.1.1. Análise do soro.....	35
IV.2.1.2. Cortisol, potássio e cálcio.....	36
IV.2.1.3. CuCp e cobre.....	39
IV.2.1.4. Zn.....	40
IV.2.2. Comparação entre as amostras ACTH X Extratos.....	42
IV.2.2.1. Análise do soro.....	42
IV.2.2.2. Cortisol, potássio e cálcio.....	42
IV.2.2.2. CuCp e cobre.....	45
IV.2.2.3. Zinco.....	47
CAPÍTULO V.....	49
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- - Echinacea Augustifolia (Fonte: http://exploringhealth.files.wordpress.com/2008/07/echinacea-purpurea.jpg).....	9
Figura 2 – Andrographis Paniculata (Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c0/Andrographis_paniculata_001.JPG).....	12
Figura 3 – Larix Decidua (Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cc/Larix_decidua_Winter.jpg).	14
Figura 4 – Representação da refração e reflexão de um feixe de radiação monocromático, incidindo em um material em um ângulo ϕ (MAXIMILIANO, 2002).....	18
Figura 5 – Geometria de excitação-deteccção da EDXRF e TXRF, com linhas contínuas representando os raios X incidentes e espalhados, e os tracejados os raios X característicos (MAXIMILIANO, 2002).....	20
Figura 6 – Tempo amostral dos soros coletados.....	28
Figura 7 – Vista geral da estação experimental DO9B-XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.....	32
Figura 8 – Esquema da montagem do arranjo experimental.....	32
Figura 9 – Espectro característico típico obtido para as amostras de soro de ovelha.....	33
Figura 10 – Curva de calibração para série K.....	34
Figura 11 – Limite de detecccção para as amostras de soro de ovelha.....	35
Figura 12 – Concentrações médias de K para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.....	37
Figura 13 – Concentrações médias de Ca para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.....	38
Figura 14 – Concentrações médias de Cu para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.....	40
Figura 15 – Concentrações médias de Zn para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.....	41
Figura 16 – Concentração média de K para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.....	43
Figura 17 – Concentração média de Ca para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.....	44
Figura 18 – Concentração média de Cu para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.....	46
Figura 19 – Concentração média de Zn para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.....	47

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A interação entre homens e animais sempre esteve presente na história da humanidade e as investigações na área da saúde utilizando animais de laboratório são realizadas há mais de dois mil anos. Contudo, a preocupação e o cuidado com o bem-estar desses animais só surgiram no final do século 17, com as primeiras regulamentações da pesquisa com animais. As avaliações do bem-estar do animal devem considerar as condições de alojamento, manejo, enriquecimento e socialização (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008).

Dentre as espécies consideradas animais de laboratório estão os ovinos, que por sua docilidade, tamanho e fácil manejo, vêm ganhando espaço na pesquisa biomédica e agropecuária. Quatro áreas de pesquisa com ovelhas se desenvolveram no século 20: estudos de zootecnia, incluindo nutrição, reprodução, produção, genética, doenças e propriedades da lã; a ovelha como modelo animal para procedimentos cirúrgicos e processos fisiológicos; estudos de biologia básica, como modelo metabólico para as áreas de nutrição, hematologia, imunologia e endocrinologia; estudos de cirurgia e fisiologia fetal (FRASER, 1995).

Muitos destes estudos requerem que a ovelha seja separada do seu rebanho e mantida em isolamento social. Os ovinos são animais gregários (HARGREAVES & HITSON, 1997; CABOS, 2001; NOWAK *et al.*, 2008) e respondem ao isolamento com uma série de alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas (PRICE & THOS, 1980; NIEZGODA *et al.*, 1987; PARROTT *et al.*, 1988; VAN-ADRICHEM & VOGT, 1993; COCKRAM *et al.*, 1994; BOUISSOU *et al.*, 1996; CARBAJAL & ORIHUELA, 2001; DOYLE *et al.*, 2010). Por isso, alternativas para minimizar esse estresse são estudadas.

Recentemente, uma difusão gradual dos sistemas de produção intensivo e semi-intensivo está ocorrendo, especialmente em ovinos, devido à preocupação crescente dos consumidores com as condições de vida desses animais e devido à emissão de uma série de regras e leis sobre a segurança dos produtos de origem animal e sobre o bem-estar deles (SEVI *et al.*, 2009).

A interação animal versus ambiente deve ser considerada quando se busca maior eficiência na exploração pecuária, pois as diferentes respostas do animal às peculiaridades de cada região são determinantes no sucesso da atividade produtiva. Assim, a correta identificação dos fatores que influem na vida produtiva do animal, como, por exemplo, o estresse ambiental, permite ajustes nas práticas de manejo dos sistemas de produção, possibilitando dar-lhes sustentabilidade e viabilidade econômica (NEIVA *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, a utilização de compostos naturais bioativos em medicina alternativa tem sido amplamente discutida. Estudos realizados em animais de laboratório mostraram que grande número de produtos naturais derivados de plantas tem efeitos benéficos para a saúde, tais como antiinflamatórios, imunomodulatória, antioxidante, antimicrobiana e anticancerígenas (MONDELLO *et al.*, 2003, HUGHES, 1999 e MORAZZONI *et al.*, 2005). Legumes e frutas contêm várias moléculas funcionais (como pectinas, polifenóis, flavonóides, taninos, terpenos, etc) cujas funções têm sido fartamente investigadas (HOTTA *et al.*, 2002).

Em sistemas de produção animal, o interesse por estas plantas tem crescido, sobretudo depois das limitações impostas ao uso de drogas sintéticas que não são permitidas na produção orgânica e estão sob vigilância das produções convencionais dentro da Comunidade Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2000). Certos animais experimentam uma grande variedade de desafios que podem levar a condições de estresse metabólico, ambientais ou imunológicos (BUCKHAM *et al.*, 2007, SORRELLS *et al.*, 2007). Além disso, o estresse pode resultar em um aumento da incidência de doenças ou perda de bem-estar dos animais (PINEIRO *et al.*, 2007, LYKKESFELDT, 2007) e uma consequente diminuição da segurança e qualidade dos produtos.

A fim de monitorar os efeitos do estresse sobre a saúde dos animais durante o cativeiro, estudos recentes investigaram análises sanguíneas com marcadores bioquímicos conhecidos. Além disso, muitos elementos químicos do sangue podem ser usados para verificar as condições fisiológicas; pois variações em suas concentrações podem refletir, por exemplo, em alterações ácido-base, na funcionalidade renal, ou até mesmo em respostas às infecções. Variações elementares mínimas no sangue, inclusive

de valores fisiológicos normais, podem ser úteis na compreensão de respostas individuais as condições de estresse ou respostas a tratamentos com medicamentos.

A correta identificação dos fatores que influem na vida produtiva do animal, como, por exemplo, o estresse, permite ajustes nas práticas de manejo dos sistemas de produção, possibilitando dar-lhes sustentabilidade e viabilidade econômica. Dessa forma, o conhecimento das variáveis climáticas, sua interação com os animais e as respostas comportamentais, fisiológicas e produtivas são preponderantes na adequação do sistema de produção aos objetivos da atividade (NEIVA *et al.*, 2004).

Minerais tais como o cobre e o zinco estão envolvidos na resposta imune. Deficiências e / ou desequilíbrios destes elementos podem alterar a atividade de certas enzimas e a função de órgãos específicos prejudicando assim vias metabólicas específicas, bem como a função imunológica geral.

O estresse e a sua relação com a ocorrência de doenças vêm sendo estudados. Ele é a resposta não específica do corpo a qualquer exigência feita sobre ele (SELYE, 1973). Estressores relacionados à produção animal incluem uma variedade de circunstâncias, tais como infecção, fatores ambientais, parto, lactação, desmame, transporte e manuseio. O estresse induzido pelo parto, pela lactação, pelo desmame e pelo transporte tem mostrado uma diminuição da capacidade do animal em responder imunologicamente aos antígenos utilizados. Além disso, a pesquisa tem revelado que o estresse pode alterar o metabolismo dos minerais. NOCKELS *et al.* (1993) relataram que a retenção de cobre e zinco foi diminuída em novilhos que receberam a injeção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico que estimula a secreção de cortisol no organismo e provoca um certo estresse nesses animais), em conjunto com restrição alimentar e água. Estes estudos, em conjunto com vários outros, indicam que o estresse sob a forma de privação de alimentos para animais e (ou) de água pode aumentar a depleção de cobre e de zinco do animal.

Estudos (STEFANON *et al.*, 2009, FARINACCI *et al.*, 2009) vêm sendo realizados utilizando amostras de soro de ovelhas que receberam injeção de ACTH e que foram tratadas com alguns extratos bioativos (FARINACCI *et al.*, 2008) através de análises bioquímicas. No entanto, a análise por fluorescência de raios X por reflexão total utilizando radiação Síncrotron (SR-TXRF) possui vantagens em relação à análise bioquímica como: utiliza pouca quantidade de amostra (da ordem de microlitros), a

preparação das amostras é rápida (acrescenta-se apenas um padrão interno), o tempo de aquisição dos espectros de cada amostra é rápido (100 s para cada amostra) e essa aquisição é multielementar (em uma única medida é possível obter informações sobre todos os elementos presentes na amostra).

Por essas razões, neste trabalho propusemos ao grupo de pesquisa da Universidade de Udine (que realizam análises bioquímicas de amostras de soro de ovelhas) a utilização da SR-TXRF, com o objetivo específico de avaliar possíveis reações de defesa desses animais quando submetidos a estresse. Para este propósito, grupos de ovinos foram divididos em 6 grupos: controle (CTR), os que receberam injeção de ACTH e mais 4 grupos que além de receberem injeção de ACTH foram tratados com extratos de planta (*Polinacea* (PO), *Echinacea angustifolia* (EA), *Andrographis paniculata* (AP) ou córtex de *Larix decidua* (LD)). A resposta biológica ao estresse e a atividade potencial de neutralização dos compostos funcionais foram investigados a nível de circulação sanguínea através do monitoramento de marcadores bioquímicos e da concentração de alguns elementos químicos no sangue.

CAPÍTULO II

II. Fundamentos Teóricos

II.1 – Estresse

Estresse é um fenômeno complexo que tem sido investigado sob diferentes perspectivas. Devido à complexidade e variabilidade dos trabalhos neste campo, é improvável que se estabeleça uma teoria simples e uniforme que seja aceita unanimemente pelos cientistas (FRIEND, 1991). Este autor classifica os agentes estressores como provenientes de origem individual (endógeno) ou ambiental (exógeno). Ao mesmo tempo, as respostas ao estresse podem ainda ser divididas em dois tipos: agudas e crônicas. Porém, dificilmente é possível separar o estresse agudo do estresse crônico, por não existir um limiar pré- estabelecido para os níveis plasmáticos de hormônios adrenais.

Durante o estresse de curta duração, os glucocorticóides melhoram a aptidão física pela mobilização de energia (RAYNAERT *et al.*, 1976) podendo alterar o comportamento (KORTE *et al.*, 1992). Entretanto, o estresse de longa duração (crônico), precedido de prolongados períodos de altas concentrações de cortisol, pode diminuir a aptidão individual pela imunossupressão e atrofia dos tecidos (MUNCK *et al.*, 1984).

Há indicações de que algumas estereotipias podem estar relacionadas ao estresse (McBRIDE & CUDDLEFORD, 2001). Segundo GRANDIN (1997), os animais que já foram submetidos a condições estressantes por um manejo rude serão animais mais estressados no futuro quando comparados àqueles manejados de maneira cautelosa. HUTSON (1993) sugere que o estresse em ovinos durante o manejo pode ser reduzido se os animais forem condicionados gradualmente à rotina da fazenda, pois mudanças de rotina são estressores importantes para os animais.

A descoberta de mecanismos metabólicos, imunológicos e neuroendócrinos auxiliou na descrição do estresse sob aspectos fisiológicos (BALM *et al.*, 1999). Seu mecanismo neuroendócrino envolve a ativação do Sistema Nervoso Central e aumento das concentrações de vários hormônios circulantes, adrenocorticotrófico (ACTH),

glucocorticóides (cortisol), catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e prolactina (MATTERI *et al.*, 2000).

Diferentes estudos demonstram que o estresse promove aumento na síntese e liberação dos hormônios ACTH e cortisol (CORT) causando alterações metabólicas, imunológicas e comportamentais nos ruminantes (MOBERG, 1987, BROOM, 1991, NEGRÃO *et al.*, 2003, NEGRÃO *et al.*, 2006, MOBERG, 1987, MAYER & LEFCOURT, 1987, MACUHOVA *et al.*, 2002, STEFANON *et al.*, 2002, TIAN *et al.*, 2005, BOUTINAUD *et al.*, 2004).

II.2 – Componentes bioativos

O uso histórico de fitoterápicos para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas, foi suplantado com o surgimento de determinadas drogas sintéticas e agentes antimicrobianos. No entanto, o uso de remédios vegetais, conhecidos por possuírem antioxidante natural, imunomoduladores e outras atividades, tem aumentado na última década em medicina humana e animal, como uma abordagem natural para o tratamento de doenças (SIMÕES *et al.*, 2003, BRESOLIN & CHECHINEL FILHO, 2003).

Sistemas de agricultura intensiva defendem fortemente o uso de medicamentos, mas há uma crescente preocupação do público quanto à sua utilização, principalmente devido ao aparecimento da resistência às drogas (ROCHFORTET *et al.*, 2008), o risco associado ao desenvolvimento da resistência de antibióticos em patógenos humanos (BARTON, 2000) e contaminação na cadeia alimentar.

Os antibióticos sintéticos também têm sido utilizados como promotores de crescimento, mas, desde janeiro de 2006, a Comunidade Europeia proibiu a sua utilização na alimentação animal (1831/2003 CE).

Indústrias de processamento de frutas, vegetais e ervas produzem grandes quantidades de resíduos orgânicos e subprodutos. Hoje, a tecnologia para a reutilização e tratamento desses resíduos é reduzida, devido ao pequeno conhecimento sobre produtos vegetais primários e secundários, ainda contida nesses resíduos. Além da compostagem (conjunto de técnicas aplicadas para controlar a decomposição de materiais orgânicos), estes produtos também podem ser úteis como matérias-primas

para a produção de alimentos e suplementos alimentar, com a melhora da saúde e propriedades terapêuticas para animais e seres humanos.

As plantas têm sido reconhecidas como fornecedoras de uma fonte potencial de compostos químicos (mais comumente conhecidos como produtos fitoquímicos). O uso medicinal de plantas tem se focado na saúde humana e normalmente sua atividade tem sido estudada em humanos e em animais modelos de laboratório. Entretanto, as plantas também foram e ainda são aplicadas em práticas veterinárias e na administração da saúde animal (ROCHFORD *et al.*, 2008).

II.3 – Extratos de plantas

Erva é uma planta ou parte da planta utilizada devido ao seu aroma, sabor e propriedades terapêuticas. Medicamentos a base de ervas são suplementos dietéticos que são tomados para melhorar a saúde. Muitas ervas têm sido usadas para benefícios na saúde. O verdadeiro desafio não consiste em comprovar se as ervas têm benefícios para a saúde, mas na definição de quais são esses benefícios e desenvolver métodos de expô-los por meios científicos (TAPSELL *et al.*, 2006).

Amplos estudos têm sido realizados para explorar o seu potencial para o tratamento ou prevenção de doenças. O metabolismo de uma droga pode ser alterada por uma outra droga ou um radiofármaco e essas interações podem muitas vezes ser clinicamente significativas.

Medicamentos fitoterápicos, como a Erva de São João (*Hypericum perforatum*) e a equinácea (*Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea* e *Echinacea pallida*), deram origem a graves resultados clínicos quando co-administrados com medicamentos de prescrição (OBACH, 2000; IZZO & ERNST, 2001; DELGODA e WESTLAKE, 2004; STRANDELL *et al.*, 2004). Essas adversidades têm estimulado estudos clínicos e *in vitro* em uma série de outros remédios a base de ervas, com sua relevância clínica ainda a ser estabelecida.

Embora a presença de inúmeros ingredientes ativos em medicamentos fitoterápicos complique a experimentação, a observação da relação dos extratos de plantas com a dieta de ovinos requer estudos sistemáticos. A partir daí, interações

baseadas no metabolismo podem ser previstas e reações adversas mais facilmente evitadas.

O recente retorno para a "medicina natural" na Itália tem enfatizado a importância de reunir informações sobre plantas medicinais tradicionalmente usadas para tratar os animais. Como em outros ramos da botânica popular, a referência para recursos animais são muitas vezes somente comentários laterais (MATHIAS-MUNDY & McCORKLE, 1989). Referências específicas fora da Itália incluem MATHIAS-MUNDY & McCORKLE (1989), McCORKLE & MATHIAS-MUNDY (1992), GOUD & PULLAIAH (1996), LANS & BROWN (1998a, b), PIERONI (1999a), LANS *et al.* (2000), LOPEZ & AGUILAR (2001) e VILLAREAL QUINTANILLA (2001).

Na Itália, muitas plantas foram utilizadas para tratar gados, ovelhas, aves, cavalos e porcos, e essas tradições têm sobrevivido em algumas áreas. Muitos desses remédios foram citados por GUARRERA (1994), VIEGI *et al.* (1999), VIEGI & PIERONI (2000a, b) e PIERONI *et al.* (2002a, b).

II.3.1 – Echinacea Angustifolia (EA)

Originária da América do Norte, sobretudo no vale do grande rio Mississippi, de onde é oriunda, a *Echinacea angustifolia* (EA) é cultivada como planta medicinal no Centro da Europa. Possui o caule oco e as folhas alongadas, estreitas e cobertas de pelos (Figura 1).

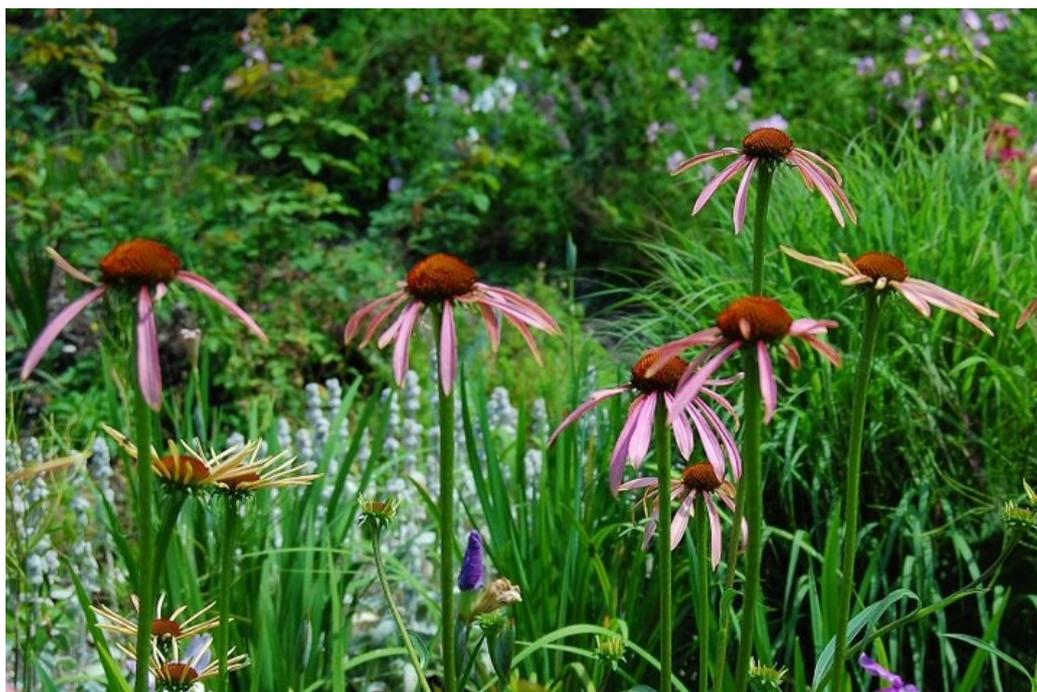


Figura 1- - Echinacea Augustifolia
(Fonte:<http://exploringhealth.files.wordpress.com/2008/07/echinacea-purpurea.jpg>).

Os índios dos estados de Nebraska e Missouri (E.U.A.) usavam a raiz da Echinacea para curar as feridas infectadas e as mordeduras de serpentes. No final do século XIX, um investigador médico, descobriu as propriedades desta planta convivendo entre os índios. A partir de então, a Echinacea tem sido objeto de estudos científicos, que têm revelado numerosas virtudes desta planta, bem como seu mecanismo de ação. Hoje esta planta faz parte de diversos produtos farmacêuticos e é uma das plantas que mais vem sendo estudada. A composição da raiz de Echinacea é muito complexa. Têm-se identificado numerosas substâncias ativas, tais como três óleos essenciais, glicosídeos, resinas, insulinas e vitamina C.

As principais propriedades da Echinacea são:

- Imunoestimulante: Aumenta os mecanismos de defesa, por uma estimulação geral não específica, tanto da imunidade humoral (maior produção de anticorpos), como da imunidade celular (fagocitose: destruição dos microorganismos pelos leucócitos). Produz um aumento do número de leucócitos (glóbulos brancos) no sangue (SUN et al, 1999, MELCHART *et al.*, 1995 e REHMAN *et al.*, 1999).

- Antiinflamatória: Impede a progressão das infecções, por inibição da enzima hialuronidase, produzida por muitas espécies de bactérias; favorece a formação do tecido de granulação, responsável pela cura das feridas; estimula a reprodução dos fibroblastos, células fundamentais do tecido conjuntivo responsáveis pela regeneração dos tecidos e pela formação das cicatrizes.

-Antitóxica: Estimula os processos de desintoxicação no fígado e nos rins, mediante os quais se neutralizam as substâncias tóxicas ou estranhas que circulam pelo sangue.

-Antibiótica e antivirótica: Ação que se tem demonstrado experimentalmente *in vitro*.

-Anticancerosa, por destruição de células malignas (efeito até agora só comprovado *in vitro*).

Principais aplicações clínicas da Echinacea são:

- Doenças infecciosas em geral: O melhor antibiótico fracassará se as defesas do organismo não colaborarem na luta contra a infecção. A Echinacea tem uma ação mais lenta, e talvez menos eficiente que a dos antibióticos; ainda que, em muitos casos, com melhores resultados a médio e longo prazo. O seu efeito é curativo e preventivo. Além disso, é isento dos efeitos secundários dos antibióticos.

-Combate às doenças infecciosas infantis; a gripe; a sinusite, amigdalite e infecções respiratórias agudas e crônicas, especialmente quando se produzem com frequência (efeito preventivo); na febre tifóide; nas septicemias (infecção do sangue) de qualquer causa (ginecológica, urinária, biliar, etc.)

-Lesões da pele: pela sua ação anti-infecciosa, cicatrizante e regeneradora dos tecidos, aplica-se nos abscessos, feridas ou queimaduras infectadas, foliculite, acne sobre infectada, úlceras da pele incluindo as varicosas, psoríase, dermatoses e eczemas. Nestes casos aplica-se tanto externa como internamente.

-Picadas de insetos e mordeduras de serpentes: Pela sua ação desintoxicante, neutraliza (parcialmente) o veneno e evita o seu alastramento (interna e externamente).

-Infecções da próstata: Tem um efeito descongestionante sobre a glândula prostática e, sobretudo, evita as frequentes infecções urinárias pelo esvaziamento incompleto da bexiga.

-Tumores malignos: Ainda que até agora a sua ação contra os tumores só se tenha demonstrado experimentalmente *in vitro*, há razões suficientes para se pensar que possa ter uma ação benéfica no caso de tumores cancerosos. À espera de novas investigações, a echinacea só deve ser usada como complemento de outros tratamentos contra os tumores.

A utilização da Echinacea está diretamente relacionada com a função imunomoduladora. Três espécies de Echinacea são usadas na medicina: a Echinacea Angustifolia (EA), E. Pallida e E. Purpurea, cujas atividades são devido à combinação de ácido clorídrico, alquilamidas e polissacarídeos (FARINACCI *et al.*, 2009).

STEINMULLER *et al.* (1993) e ROESLER *et al.* (1991) demonstraram uma melhora no sistema imunológico tanto em modelos animais quanto em ensaios clínicos.

II.3.2 – Polinacea™ (PO)

A tradição do uso de espécies de Echinacea vem dos americanos nativos porque as tribos indígenas tinham o hábito de tratar doenças a partir de extratos desta planta. Os principais distúrbios para os quais foram utilizados esses extratos foram: dor de dente, estomatite, amidalite, septicemia, picadas de cobra, resfriados e inflamação geral (HOBBS, 1989, FLANNERY, 1999 e FOSTER, 1991).

A PO é uma nova substância, extraída da Echinacea angustifolia, que atua no sistema imune. Através da ação direta sobre as células T, ela aumenta as funções imunológicas quando comparadas com os produtos a base de Echinacea já vendidos na Europa (MORAZZONI *et al.*, 2005).

Além do efeito de aumentar a imunidade, os extratos a base de Echinacea também tem um papel importante na redução dos processos inflamatórios. O composto fenólico, ou seja, *echinacoside* é responsável por este efeito (RININGER *et al.*, 2000). Considerando as múltiplas atividades que se referem a Echinacea, os efeitos biológicos não podem ser atribuídos a um único componente: o extrato padrão (obtido a partir das raízes da E. angustifolia) desenvolvido e patenteado pela Indena tem uma padronização tripla que faz dele diferente de todos os outros derivados Echinacea.

II.3.3 – *Andrographis Paniculata* (PA)

A *Andrographis paniculata* (PA) (Figura 2) é tradicionalmente usada há séculos na Ásia e na Europa como um folclórico remédio para diversas doenças, como suplemento a base de ervas para melhorar a saúde e é hoje incorporada uma série de medicamentos fitoterápicos.



Figura 2 – *Andrographis Paniculata*
(Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c0/Andrographis_paniculata_001.JPG).

Esta erva é encontrada na medicina tradicional chinesa e tem uma importante propriedade de livrar o corpo do calor, como nas febres e para eliminar as toxinas do corpo (DENG, 1978). Nos países escandinavos, é comumente usada para prevenir e tratar o resfriado comum (CÁCERES et al., 1997). A PA está entre os 10 melhores fitoterápicos que a Administração de Comidas e Drogas (Food and Drug Administration - FDA) tailandesa tem promovido como uma alternativa terapêutica de medicamentos para febre e inflamação.

JARUKAMJORN (2008) estudou os efeitos da PA sobre as enzimas do citocromo P450 e recomendou precauções quanto ao uso de medicamentos a base de PA, já que eles podem ser associados a alguns tipos de riscos.

Extensas pesquisas têm revelado que o extrato dessa planta possui muitos bioativos úteis, tais como anti-inflamatórios (SHEN *et al.*, 2002), antivirais (CALABRESE *et al.*, 2000), antineoplásicos (KUMAR *et al.*, 2004), e imunoestimulador (PURI *et al.*, 1993; IRURETAGOYENA *et al.*, 2005).

II.3.4 – Larix Decidua

O lariço europeu (*Larix Decidua*) (Figura 3) tem aproximadamente 35m de altura e sua árvore é nativa principalmente de regiões elevadas dos Alpes, dos Sudetos e das Montanhas Carpathian (MARTINEZ, 1998). A madeira do lariço é resistente, impermeável e durável, mas também flexível em tiras finas. O cerne (designação dada à parte do xilema do tronco que já não participa ativamente na condução de água, assumindo uma função essencialmente de suporte mecânico da estrutura da planta.) resiste ao tempo e por isso é usada geralmente em construções.

Devido ao seu elevado teor de resina, a sua utilização para produção de móveis é limitada. A serragem do lariço é um subproduto da produção da madeira do lariço. Atualmente, a serragem do lariço é usada principalmente para produzir combustíveis. Sua madeira é conhecida por conter compostos fenólicos como as lignanas e flavonóides (MARTINEZ, 1998). Estes compostos têm demonstrado efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (KOLHIR *et al.*, 1996; PIETARINEN *et al.*, 2006).

O lariço arabinogalactana, um polissacarídeo solúvel em água que é predominantemente extraído da madeira de *Larix occidentalis*, é aprovado pelo FDA dos EUA como fonte de fibra alimentar e também tem efeitos terapêuticos como imunoestimulante e usado na terapia do câncer (MONOGRAPH, 2000).



Figura 3 – Larix Decidua (Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cc/Larix_decidua_Winter.jpg).

II.4. Espectroscopia por fluorescência de raios X

A análise por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida de comprimentos de ondas ou nas energias e nas intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra (BOUMANS & KLOCKENKÄMPER, 1989, IAEA, 1970).

Quando a amostra é irradiada por um feixe de fótons (energia E_0), onde E_0 excede à energia crítica de excitação de um determinado átomo, os elétrons do interior dos níveis mais internos deste átomo são ejetados deixando o átomo num estado excitado ou ionizado. O átomo no estado excitado é instável e ocorre quase que instantaneamente um processo de transição eletrônica para preencher essas vacâncias

deixadas pelos elétrons ejetados. A transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, esta energia é emitida na forma de fóton de raios X característicos que emitem linhas espectrais cujas intensidades estão relacionadas com concentração dos elementos na amostra. A energia dos raios X característicos emitidas pelos elementos pode ser calculada pela equação 2.1. Para excitação da amostra normalmente empregam-se tubos de raios X, ou raios X ou gama que são emitidos por fontes radioativas e o mais recente radiação Síncrotron.

$$E = 13,65(Z - b)^2 \left(\frac{1}{n_f^2} - \frac{1}{n_i^2} \right) \quad (2.1)$$

Onde:

E = energia dos raios X (eV);

n_i, n_f = número quântico principal do nível inicial e final do salto quântico;

Z = número atômico do elemento emissor dos raios X;

b = constante de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4 para as camadas K e L, respectivamente.

Os raios X emitidos por um elemento são denominados K_α e K_β , devido às transições $L \rightarrow K$ e $M \rightarrow K$, respectivamente, e os raios X devido à transição $M \rightarrow L$ são denominados L_α e L_β .

A energia de ligação eletrônica pode ser calculada de modo aproximado, aplicando-se a teoria atômica de Bohr para o átomo de hidrogênio e átomos de hidrogênoides, e posteriormente, fazendo-se algumas considerações sobre a experiência de Moseley.

A fração da radiação incidente que leva à emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada pela probabilidade de excitação, que é o produto de três outras probabilidades (LACHANCE & CLAISSE, 1994):

$$P_{E_i} = P_{nível} \cdot P_{linha} \cdot P_{fluorescência} \quad (2.2)$$

Onde:

$P_{nível}$ é a probabilidade que a radiação incidente retire elétrons de um dado nível quântico. Pode ser o nível K, L, M, N, O, ..., etc.;

P_{linha} é a probabilidade que uma determinada energia seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado do nível K podemos ter as seguintes transições do nível L: K-L2 e K-L3;

$P_{\text{fluorescência}}$ é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés de elétron Auger, a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

A probabilidade de a radiação incidente retirar elétrons de um determinado nível está fortemente ligada com a fração da radiação que é absorvida no mesmo nível (LACHANCE & CLAISSE, 1994).

O rendimento de fluorescência ω é definido como a probabilidade para que o fóton produzido seja liberado do átomo sem ser reabsorvido. Assim, ω pode ser representado como:

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (2.3)$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (2.4)$$

Onde:

n_s é o número de fótons produzidos como fluorescência de raios X;

n_p é o número de fótons que são produzidos devido às vacâncias nos níveis e subníveis atômicos;

n_A é o número de fótons que são reabsorvidos dentro do átomo.

O rendimento de fluorescência para a linha K é dado pelo número de fótons n_K emitidos como fluorescência de raios X, para todas as linhas K, dividido pelo número de fótons criados N_K devido às transições entre os estados quânticos. Assim, tem-se:

$$\omega_K = \frac{n_{K-L3} + n_{K-L2} + \dots}{N_K} = \sum \frac{n_K}{N_K} \quad (2.5)$$

É possível obter o rendimento de fluorescência ω_L para as linhas L tendo três diferentes valores: ω_{L1} , ω_{L2} , ω_{L3} .

A fluorescência de raios X divide-se basicamente em duas variantes analíticas distintas: a baseada na dispersão de energia por comprimento de onda (WD-XRF) e a dispersão por energia (ED-XRF). A WD-XRF se desenvolveu em meados da década de 60, enquanto que a ED-XRF dez anos após, com o surgimento de detectores semicondutores de silício e germânio.

A ED-XRF possui duas variantes, além da convencional:

- Fluorescência de raios X por reflexão total, possuindo vantagens como quantidades diminutas de amostras (cerca de 5 µl) e menores valores de limite de detecção em relação a ED-XRF convencional;
- Microfluorescência de raios X (µ-XRF), sendo a única a fornecer informações sobre a distribuição elementar na amostra.

II.4.1. Refração e reflexão dos raios X

Quando um feixe de radiação monoenergético passa de um meio (ar ou vácuo) e atinge uma superfície plana de um dado material, podem ocorrer dois fenômenos físicos: a refração, adentrando pelo material, ou a reflexão, sendo refletido pela sua superfície com um ângulo de emergência igual ao de incidência. A ocorrência de um ou outro processo dependerá da energia da radiação incidente, da densidade eletrônica do material e do ângulo de incidência da radiação.

Desse modo, há um ângulo crítico (ϕ_{crit}) (equação 2.6), no qual a radiação não é refratada e tampouco refletida, permanecendo no plano de interface (AIGINGER & WOBRAUSCHEK, 1974, KLOCKENKÂMPER, et. al., 1992).

$$\phi_{crit} = \frac{e \cdot h}{E} \sqrt{\frac{n_e}{2 \cdot \pi \cdot m}} \quad (2.6)$$

Onde:

ϕ_{crit} = ângulo crítico, em radianos;

e = carga elétrica do elétron = $1,6 \cdot 10^{-19}$ Coulombs;

h = constante de Planck = 6,625. J.s;

E = energia da radiação (Joule);

n_e = densidade eletrônica do material (elétrons. m^{-3});

m = massa do elétron = $9,11 \cdot 10^{-28}$ gramas;

A densidade eletrônica do material n_e é dada pela equação 2.7:

$$n_e = \frac{N_0 \cdot \rho \cdot Z}{A} \quad (2.7)$$

Onde:

N_0 = número de Avogadro = $6,023 \cdot 10^{23}$ átomos;

ρ = densidade do material (kg. m^{-3});

Z = número de elétrons em um átomo ou molécula do material;

A = átomo-grama ou molécula-grama do material (kg.mol^{-1}).

Substituindo-se os valores constantes, e utilizando a energia da radiação em unidades de keV ($1 \text{ keV} = 1,6 \cdot 10^{-16} \text{ J}$), pode-se calcular o ângulo crítico ϕ_{crit} em minutos pela equação 2.8:

$$\phi_{\text{crit}} = \frac{99,1}{E} \sqrt{\frac{\rho \cdot Z}{A}} \quad (2.8)$$

Portanto, se uma alíquota na faixa de microlitros de uma solução bastante diluída (soro de ovelha, por exemplo), for pipetada sobre um suporte de quartzo e depois seca, de modo a formar uma mancha (“spot”) de 5 mm de diâmetro e uma espessura da ordem de nanômetros, e se sobre ela incidir um feixe de raios-X Mo- K_{α} de 17,44 keV, em um ângulo de incidência de 5,5 mm, o feixe incidente será totalmente refletido, não adentrando no suporte e não sofrerá espalhamento pelos efeitos Rayleigh ou Compton.

Assim, dependendo dos valores dos ângulos de incidência ϕ e do ângulo crítico ϕ_{crit} para um dado material e para a mesma energia da radiação, tem-se as seguintes condições (Figura 4):

- se $\phi > \phi_{\text{crit}}$, ocorrerá a refração da radiação incidente,
- se $\phi = \phi_{\text{crit}}$, ocorrerá a propagação da radiação incidente na direção da interface,
- se $\phi < \phi_{\text{crit}}$, ocorrerá a reflexão da radiação incidente.

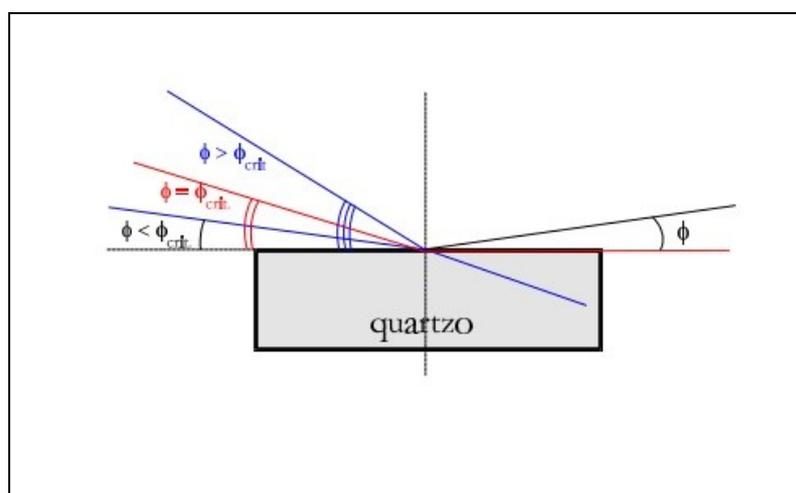


Figura 4 – Representação da refração e reflexão de um feixe de radiação monocromático, incidindo em um material em um ângulo ϕ (MAXIMILIANO, 2002).

II.4.2. Fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)

YONEDA (1963) publicou em 1963 o primeiro trabalho mostrando o fenômeno da reflexão total dos raios X, e em 1971 YONEDA & HORIUCHI utilizaram como método analítico, classificando-o de microanálise. Nesta sub variante, uma diminuta quantidade da amostra é colocada sobre um suporte de quartzo e depois excitada, fazendo-se incidir a radiação incidente na condição de ângulo crítico. Com isto, a amostra pode ser tratada como filme fino para fins de análise quantitativa. Assim a diferença fundamental entre a EDXRF e TXRF é na geometria de excitação-deteção, conforme mostrado na Figura 4.

As vantagens do uso da TXRF em relação à EDXRF (Figura 5) são:

- Podem ser utilizadas amostras líquidas (da ordem de microlitros) e sólidas (da ordem de miligramas),
- Não ocorrem os efeitos de absorção e reforço e, portanto, não há necessidade de correção do efeito matriz (SIMAMBUCO, 1993; SIMAMBUCO & NASCIMENTO FILHO, 1994; ZUCCHI, 1994; CARNEIRO, 1995; CARNEIRO & NASCIMENTO FILHO, 1996),
- Menor distância entre amostra e detector (resultando maior eficiência de detecção dos raios X),
- Diminuição do continuum sob os picos, resultando maior sensibilidade analítica (WOBRAUSCHEK, 1998).

Porém há uma grande desvantagem, não se podendo trabalhar com amostras espessas, como é o caso das amostras geológicas e arqueológicas.

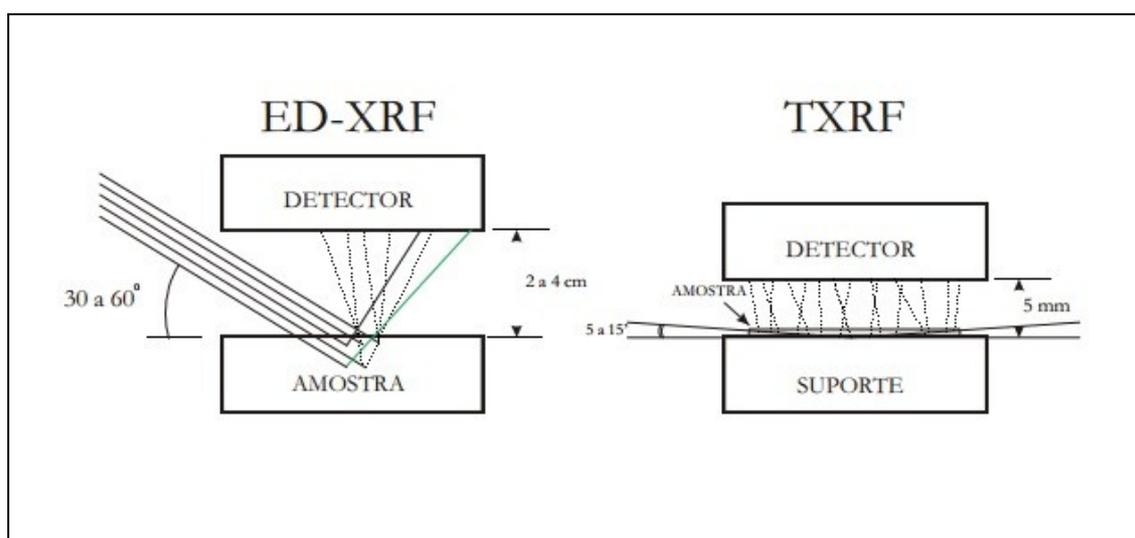


Figura 5 – Geometria de excitação-deteção da EDXRF e TXRF, com linhas contínuas representando os raios X incidentes e espalhados, e os tracejados os raios X característicos (MAXIMILIANO, 2002).

Para análise de elementos traços em soros de ovinos, utilizou-se a TXRF com excitação de radiação Síncrotron com um feixe policromático de energia máxima de 20 keV para excitação e detector de Ge (Hp) com tempo de medida de 100 s.

II.4.3. Análise quantitativa

Na técnica de TXRF uma alíquota de 5 a 50 μL da amostra líquida *in natura* ou digerida é colocada no centro de um suporte de perspex. O filme fino obtido, com massa entre 10 $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, cobrindo um círculo com aproximadamente 5 mm de diâmetro, está pronto para ser analisado.

Quando a amostra apresentar elementos voláteis como Hg e As, estes devem ser convertidos em formas químicas mais estáveis pela adição de uma pequena quantidade de solução quelante, por exemplo, ditiocarbamato de pirrolidina de amônia (APDC), colocada na superfície do suporte da amostra antes da evaporação do solvente (GIRARDI *et. al.*, 1967).

Devido à diminuta espessura da amostra e alta energia dos raios X normalmente utilizados na excitação, não há ocorrência do efeito de absorção e reforço na TXRF, e, conseqüentemente, não é necessária a correção para o efeito matriz.

Utilizar a técnica do filme fino permite um tratamento matemático simples para a análise quantitativa, quando é adicionado um padrão interno. Os elementos a serem utilizados como padrões internos devem ocorrer em concentrações baixíssimas nas amostras para que não altere a concentração deste elemento na amostra.

A função do padrão interno é eliminar o efeito de geometria porque o filme fino formado sobre o suporte não possui geometria regular. Desta forma, a contagem obtida na irradiação da amostra depende da posição em que esta for colocada no suporte. Com a adição do padrão interno, o resultado obtido será sempre em relação a este padrão, não importando a posição da amostra (LADISICH *et al.*, 1994; KLOCKENKÄMPER e VON BOHLEN, 1996). Normalmente tem-se utilizado os elementos Ge, Ga, Co e Y como padrão interno.

A equação básica para análise quantitativa é a relação entre a intensidade fluorescente da linha característica K e a concentração de um elemento de interesse, pode ser obtida conforme a equação 2.9

$$I_i = S_i \cdot C_i \quad (2.9)$$

onde:

I_i – intensidade líquida de raios X da linha característica K ou L do elemento i de interesse (cps = contagens por segundo);

S_i – sensibilidade elementar do sistema (cps.mL/ μ g);

C_i – concentração na solução pipetada no suporte (μ g/ml).

Utilizando a equação 2.10, podemos fazer a razão entre a intensidade do elemento i e o padrão interno Ga utilizado neste trabalho:

$$\frac{I_i}{I_{Ga}} = \frac{S_i \cdot C_i}{S_{Ga} \cdot C_{Ga}} \quad (2.10)$$

$$\frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot C_{Ga} = \frac{S_i}{S_{Ga}} \cdot C_i \quad (2.11)$$

Fazendo:

$$R_i = \frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot C_{Ga} \quad (2.12)$$

e

$$S_{Ri} = \frac{S_i}{S_{Ga}} \quad (2.13)$$

Então

$$R_i = S_{Ri} \cdot C_i \quad (2.14)$$

Construindo-se um gráfico de R_i x C_i , o coeficiente angular (S_i) da reta representará a sensibilidade relativa do elemento i . Com isto, pode-se calcular a concentração do elemento de interesse, utilizando a equação 2.15, apresentada a seguir:

$$C_i = \frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot \frac{C_{Ga}}{S_{Ri}} \quad (2.15)$$

onde:

I_{Ga} – intensidade do padrão interno na amostra (cps);

I_i – intensidade do elemento i na amostra (cps);

S_{Ga} – sensibilidade do detector para o padrão interno (cps.mL/ μ g);

S_i – sensibilidade do detector para o elemento i (cps.mL/ μ g);

C_{Ga} – concentração do padrão interno na amostra (μ g/ml);

C_i – concentração do elemento i de interesse (μ g/ml);

S_{Ri} – sensibilidade relativa para o elemento i ;

R_i – contagem relativa.

Vale a pena ressaltar que existe uma alta correlação matemática entre a sensibilidade elementar e o número atômico dos elementos. Assim, com base nas sensibilidades elementares dos elementos contidos na solução padrão multielementar, pode-se estimar a sensibilidade para um elemento detectado na amostra, a seguir definir uma sensibilidade para um elemento detectado na amostra não contido na solução padrão e conseqüentemente estimar a sua concentração na amostra de interesse. De maneira análoga, as mesmas equações podem ser utilizadas para a linha K_β e outras, como L e M, onde logicamente as sensibilidades elementares terão outros valores.

A técnica de TXRF tem sido aplicada na análise de diferentes substâncias como água, sangue, ar, tecido vegetal e animal entre outros, podendo ser aplicado em

materiais sólidos como solos, sedimentos, filtros de ar, material particulado etc., devendo, a amostra ser antecedida de digestão química e diluição apropriada segundo KOOPMANW *et al.* (1991).

A utilização da TXRF para análise de elementos traços não só compete com outros métodos analíticos, como também oferece novas possibilidades de solucionar problemas analíticos intrínsecos (PRANGE, 1989). Foi observado por KLOCKENKÄMPER *et al.* (1992), que a vantagem de utilização desta técnica é em relação à geometria de excitação e detecção, o tipo de preparo da amostra e a análise quantitativa, quando bem ajustado pode ser utilizado para a análise de elementos traços em trabalhos de rotina de laboratório.

II.4.5. Limite mínimo de detecção (LMD)

De modo geral, os limites de detecção para a análise em fluorescência de raios X por reflexão total são bem menores que para outras técnicas de fluorescência, devido a três fatores: (1) baixa intensidade do *continuum*; (2) o fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, é muito mais efetivo do que na XRF e (3) a distância entre a amostra (filme fino) e o detector de Ge é muito menor que na ED-XRF aumentando, portanto a eficiência de detecção dos raios X característicos.

Várias são as maneiras de se obter menores limites de detecção na análise por fluorescência de raios X. Uma das formas de melhorar o LMD é obviamente aumentar o tempo de contagem e a sensibilidade e reduzir a intensidade do background (radiação de fundo). A redução da intensidade de radiação de fundo pode ser obtida através da aplicação de fenômenos físicos como a reflexão total ou a polarização linear da radiação de excitação ou uma combinação das duas.

Para o cálculo do LMD, utilizando-se TXRF induzida por radiação Síncrotron, foi ajustada a área abaixo do pico de cada elemento de interesse no espectro dos raios X característicos, obtendo-se as intensidades do background.

O LMD é obtido a partir da equação 2.16 (LADISICH *et al.*, 1994), sendo ele extrapolado em um tempo de medida de 100 s:

$$LMD = 3 \cdot \sqrt{\frac{I_i(BG)}{t}} \frac{C_{Ga}}{I_{Ga} S_{Ri}} \quad (2.16)$$

onde:

$I_i(BG)$ – a intensidade do *background* por unidade de tempo (cps);

I_{Ga} – a intensidade da radiação fluorescente relativa ao padrão interno (cps) gálio (Ga);

C_{Ga} – a concentração do padrão interno ;

S_{Ri} – a sensibilidade relativa (adimensional) para o elemento i;

t – o tempo de medida(s).

Normalmente, o LMD é determinado para alguns elementos e depois por extrapolação (curva do limite de detecção) determina-se o limite de detecção para os elementos de interesse. O limite de detecção em TXRF é da ordem de $ng \cdot g^{-1}$.

II.5. Radiação Síncrotron

Sempre que uma carga elétrica é acelerada, da mesma forma que elétrons oscilando numa antena, ela emite radiação eletromagnética. Uma partícula que é acelerada de forma harmônica gera um campo elétrico senoidal em função do tempo, e este oscila de acordo com a frequência do seu movimento. Se a velocidade da partícula for relativística no movimento circular em que o espectro de emissão de radiação torna-se quase- contínuo, ocorrem alterações mais profundas. Esta radiação é conhecida como luz síncrotron (CASTILHO, 2006).

O processo de produção de luz síncrotron é iniciado por um canhão de elétrons de um acelerador linear. Os aceleradores lineares são aceleradores de partículas carregadas como elétrons, prótons ou íons pesados. As partículas carregadas são aceleradas por um campo elétrico, entram em tubo de corrente onde são protegidas do campo elétrico e o atravessam com velocidade constante com velocidade constante até a próxima abertura. Neste ponto, as partículas são novamente aceleradas e a cada abertura recebem mais e mais energia.

Em seguida, o feixe de elétrons é injetado em um anel de armazenamento, onde há três dispositivos básicos: dipolos magnéticos, formados por ímãs dipolares que produzem um campo magnético homogêneo no sentido vertical (eles são responsáveis pela deflexão do feixe e conseqüentemente pela produção de luz síncrotron); os

quadripolos ou sextupolos (estão situados nos trechos retos do anel e servem para focalizar os elétrons e reduzir as aberrações cromáticas) e a cavidade de rádio frequência (está situada em um ou mais trechos retos e é responsável por acelerar os elétrons injetados a baixa energia até o final e por fornecer aos elétrons, em cada passagem pelo interior da mesma, a energia perdida em cada volta devido a radiação produzida nas partes curvas de suas trajetórias para aumentar o tempo de vida do feixe (MARGARITONDO, 1995).

Uma vasta revisão sobre a produção da radiação síncrotron pode ser encontrada na tese de doutorado de NOGUEIRA (2011).

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 – Protocolo experimental

Soros sanguíneos de ovinos foram obtidos de ovelhas saudáveis, não grávidas e não lactantes da Sardenha, alimentadas com uma dieta concentrada (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1985) por um período de adaptação de 24 dias. O primeiro dia foi considerado o tempo amostral T0. A saúde dos animais foi avaliada por exame clínico antes e durante todo o período experimental. Todos os procedimentos foram realizados em respeito à legislação italiana sobre cuidados com animais (DL n.116, 27/1/ 1992). Os ingredientes e a composição química da dieta basal estão apresentados respectivamente nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Ingredientes, teor (%) de matéria seca (MS).

Ingredientes (%)	
Milho	15,00
Soja, 44%	10,00
Feno	50,00
Farelo de trigo	3,80
Polpa de beterraba desidratada	12,00
Cevada	4,00
Melado	2,80
Suplemento de vitaminas e minerais	2,40
Total	100,00

Tabela 2. Composição química (% de MS) da dieta basal.

Composição química	
MS (%)	88,80
Proteína bruta (%MS)	14,90
Extrato de éter (%MS)	2,80
Fibra bruta (%MS)	22,40
Material cinzento (%MS)	12,00
Fibra Detergente Neutro (NDF) (%MS)	37,40
Fibra Detergente Ácido (ADF) (%MS)	26,00
Amido (%MS)	14,30
Cálcio (%MS)	0,70
Fósforo (%MS)	0,45
Potássio (%MS)	0,90
Sódio (%MS)	0,24
Ferro (mg/kg MS)	109,00
Cobre (mg/kg MS)	12,00
Zinco (mg/kg MS)	107,00
NEL* (Mcal/kg MS)	1,32

* NEL = Energia líquida de lactação.

Trinta e seis animais foram divididos em seis grupos experimentais. No dia 24 (T1), um grupo de ovelhas (CTR) continuou a receber a dieta basal, enquanto que o

grupo ACTH recebeu a dieta basal mais a injeção de ACTH. O protocolo experimental foi aprovado pelas leis e regulamentos locais.

A indução da secreção de cortisol nos animais foi estimulada pela injeção intramuscular de 0,5 mg / indivíduo de ACTH agonista (Synacthen, Novartis, Varese, Itália - Tetracosactrin acetato) duas vezes ao dia durante três dias consecutivos.

Quatro grupos (EA, PO, AP e LD) de ovelhas receberam o acréscimo de extratos diferentes na dieta basal a partir do 24º dia e receberam injeção de ACTH. Na falta de indicações específicas para dosagem de EA, PA, PO e LD em ovinos, a quantidade diária comparável com a permitida para humanos foi administrada, como sugerido pelos fabricantes.

Consumos diários foram de cerca de 40 mg / indivíduo de *Andrographis* para a AP, 121 mg / indivíduo de *Echinacea* e *Polinacea* para a EA e PO, respectivamente, e 50 g / indivíduo de serragem Larch para LD.

O sangue foi coletado no tempo de amostragem T0 (primeiro dia de todas as ovelhas), essas ovelhas receberam uma dieta basal por 24 dias e no 24º dia o grupo ACTH e os grupos dos extratos receberam a injeção de ACTH. Logo após a primeira injeção de ACTH, foi retirado novamente o soro dessas ovelhas (considerado o tempo T1), 3h após a primeira injeção de ACTH foi considerado o tempo T2 e 51h após o início do tratamento com ACTH, ou seja, 3h após a última injeção de ACTH, foi considerado o tempo T3, conforme a Figura 6 abaixo. As principais características de todos os suplementos utilizados neste trabalho estão listadas na Tabela 3.

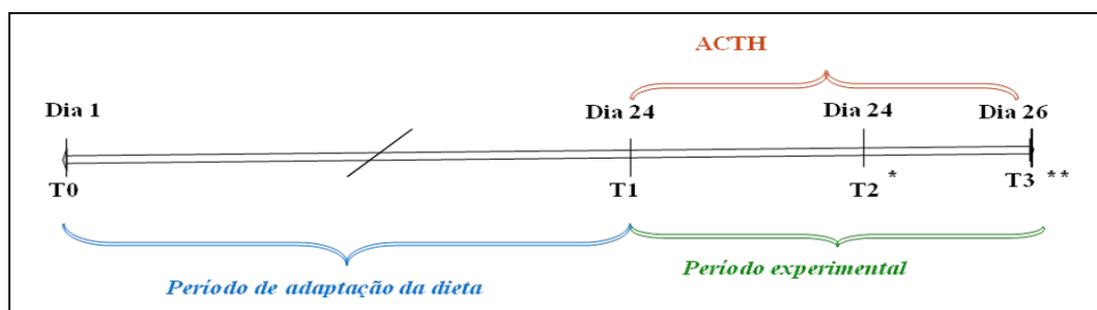


Figura 6 – Tempo amostral dos soros coletados.

Tabela 3. Características da *Polinacea*TM, *Echinacea angustifolia*, extrato de *Andrographis paniculata* and *Larix decidua*.

Componente	Parte da planta	Atividade esperada
PO ^a	Raízes da <i>Echinacea angustifolia</i>	Estimula a fagocitose, produção de citocinas, produção de linfócitos B, antiinflamatória
EA ^a	Flores da <i>Echinacea angustifolia</i>	Estimula a fagocitose, produção de citocinas, produção de linfócitos B, antiinflamatória
AP ^a	Folhas	Antiinflamatória, antioxidante, pro-apoptótica
LD ^b	Serragem da madeira de lariço	Antiinflamatória, imunoestimulante

^a Indena S.p.a., Settala, Milano, Italy

^b Jannach Lärchenholz GmbH., Thalheim, Styria

Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular no período da manhã, antes da administração de refeição, em tubos sem anticoagulantes e as amostras foram centrifugadas (1500 g/10 min) dentro da primeira hora da colheita, e o soro armazenado a -20 ° C até sua análise.

Na análise bioquímica, foram obtidas as concentrações de vários parâmetros tais como cortisol, glicose, colesterol, hemoglobina, ceruloplasmina (CuCp), cobre, zinco, dentre outros. Como este trabalho propõe uma nova forma de análise (SR-TXRF) para amostras de soro de ovelhas e esta é uma técnica multielementar, decidimos comparar apenas os valores médios de concentração de cortisol, CuCp e Zn da análise bioquímica com as concentrações de K, Ca, Cu e Zn da análise por SR-TXRF.

É válido ressaltar que a CuCp foi escolhida para análise, pois ela é uma glicoproteína produzida pelo fígado, responsável pelo transporte de 80 a 95% do cobre plasmático. O cortisol foi analisado porque as ovelhas receberam injeção de ACTH e este hormônio aumenta a secreção de cortisol no organismo. A análise da concentração de potássio e de cálcio é importante já que a injeção de ACTH pode afetar diretamente as concentrações desses elementos no organismo.

A maioria dos produtos químicos utilizados para as análises bioquímicas foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milão, Itália). O cortisol plasmático foi determinado com um kit comercial para dosagem de ensaio radioimunológico (Sorin SpA, Vercelli, Itália), utilizando o método modificado por BERTONI et al (2002). A glicose foi determinada

utilizando kits adquiridos do Laboratório de Instrumentação (IL Test). A CuCp foi analisada utilizando método descrito por BERTONI et al (1998), adaptando-os para as condições ILAB600. Zinco foi determinado através de kits comerciais (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemanha).

III.2 – Preparação das amostras para análise por TXRF

Os frascos plásticos utilizados para coletas das amostras foram submetidos à lavagem para remoção dos agentes contaminantes. A lavagem foi realizada com solução aquosa de 10% HNO₃ onde os frascos permaneceram submersos por 24 horas.

Os frascos foram então lavados com água destilada e, secos a temperatura ambiente. As amostras coletadas foram acidificadas no local e conservadas em geladeira até a preparação. O volume de 200 µL foi coletado da amostra de soro de ovelha.

Todas as amostras foram submetidas à digestão química utilizando o ácido nítrico de forma a evitar interferências de matriz orgânica (CAVALHO *et al.*, 2001 e MARCÓ & HERNÁNDEZ-CARBALLO, 2004). Água deionizada e de-mineralizada (Milli-Q) foi usada para lavagem e diluição.

Neste trabalho, Ga (1001 µg mL⁻¹) foi utilizado como padrão interno com concentração de 9,09 µg mL⁻¹. Misturou-se 200 µL de amostra com 20 µL de Ga e dessa solução final retirou-se uma pequena quantidade (5 µL) que foi pipetada no porta amostras (Persplex®) para uma posterior evaporação, sob uma lâmpada infravermelha.

III.3 – Preparo dos padrões

Para realizar a calibração do sistema de detecção, e posteriormente calcular a sensibilidade relativa, foram preparadas cinco soluções padrão (Tabela 4) contendo os elementos Al, Si, K, Ca, Ti, Cr, Fe, Ni, Zn, Ga, Se, Sr e Mo. O gálio (Ga) foi utilizado como padrão interno.

Tabela 4 – Concentração (µg.L⁻¹) dos elementos (Al, Si, K, Ca, Ti, Cr, Fe, Ni, Zn, Ga, Se, Sr e Mo) nas soluções padrões para a série K.

Z	Elemento	1K	2K	3K	4K	5K
---	----------	----	----	----	----	----

13	Al	106,20	200,61	225,68	277,76	300,91
14	Si	107,49	203,03	228,41	281,12	304,55
19	K	5,39	10,17	15,26	21,13	25,43
20	Ca	5,40	10,20	15,30	21,19	25,51
22	Ti	5,32	10,05	15,08	20,87	25,13
24	Cr	5,32	10,05	15,08	20,87	25,13
26	Fe	5,34	10,08	15,12	20,94	25,20
28	Ni	5,35	10,10	15,15	20,98	25,25
30	Zn	5,32	10,05	15,08	20,87	25,13
34	Se	5,24	9,90	14,85	20,56	24,75
38	Sr	5,37	10,15	15,23	21,08	25,38
42	Mo	5,35	10,10	15,15	20,98	25,25
31	Ga	9,32	9,32	9,32	9,32	9,32

A quantificação das medidas foi avaliada através da utilização de materiais certificados padrão S2263 (soro de ovelha) e H4522 (soro humano) adquiridos da Sigma-Aldrich.

III.5 – Instrumentação

As medidas foram realizadas na linha de Fluorescência de raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo (Figura 7). Todas as medidas foram feitas sobre condições normais de pressão e temperatura com uma geometria de excitação padrão (Figura 8). As amostras foram excitadas com feixe branco com energia máxima de 20 keV. Os fótons fluorescentes foram detectados pelo detector de Ge (com resolução de 165 eV a 5,9 keV), com uma janela de berílio de 125 μm de espessura, 30 mm^2 de área ativa, acoplado a um amplificador e a um analisador multicanal.

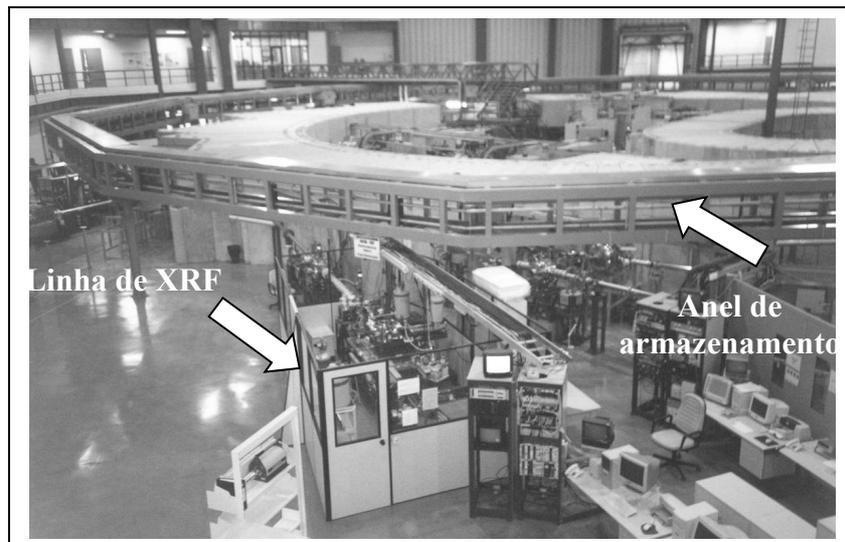


Figura 7 – Vista geral da estação experimental DO9B-XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

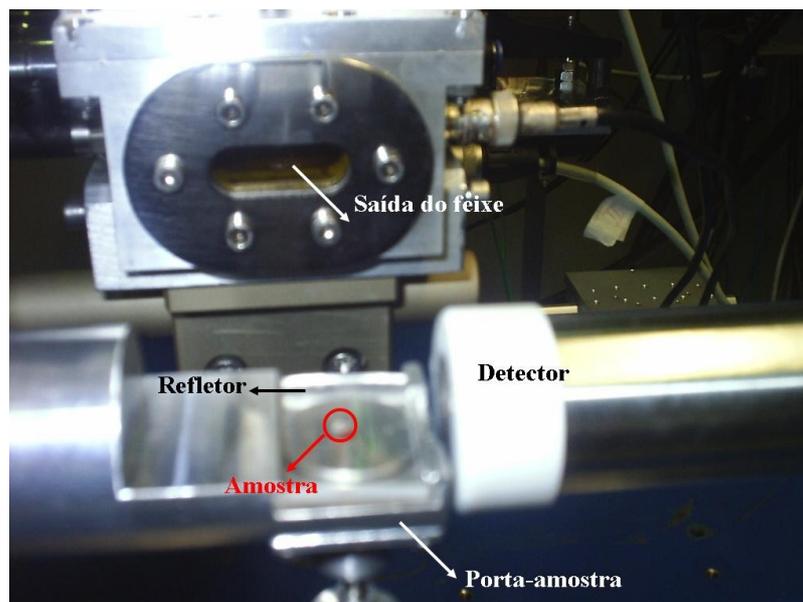


Figura 8 – Esquema da montagem do arranjo experimental

O tempo de medida das amostras e dos padrões foi igual a 100s e os espectros de raios X característicos obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de raios X (AXIL) (IAEA, 1978), distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), obtendo as intensidades dos raios X para cada elemento.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. Análise do soro por SR-TXRF

Para analisar todas as amostras de soro por TXRF, as amostras utilizadas foram preparadas de forma convencional (MOREIRA *et al.*, 2006) e usou-se feixe branco (faixa de energia de 4 a 23 KeV).

Os fundamentos da análise quantitativa por TXRF estão descritos no capítulo 2. A concentração elementar, de acordo com a equação 2.15, é obtida a partir da medida da intensidade da radiação fluorescente emitida por um elemento *i* em função da sensibilidade do sistema. Essas intensidades foram obtidas a partir da análise dos espectros de raios X característicos usando o *software* AXIL (IAEA, 1978).

A Figura 9 ilustra o espectro característico das amostras de soro de ovelha.

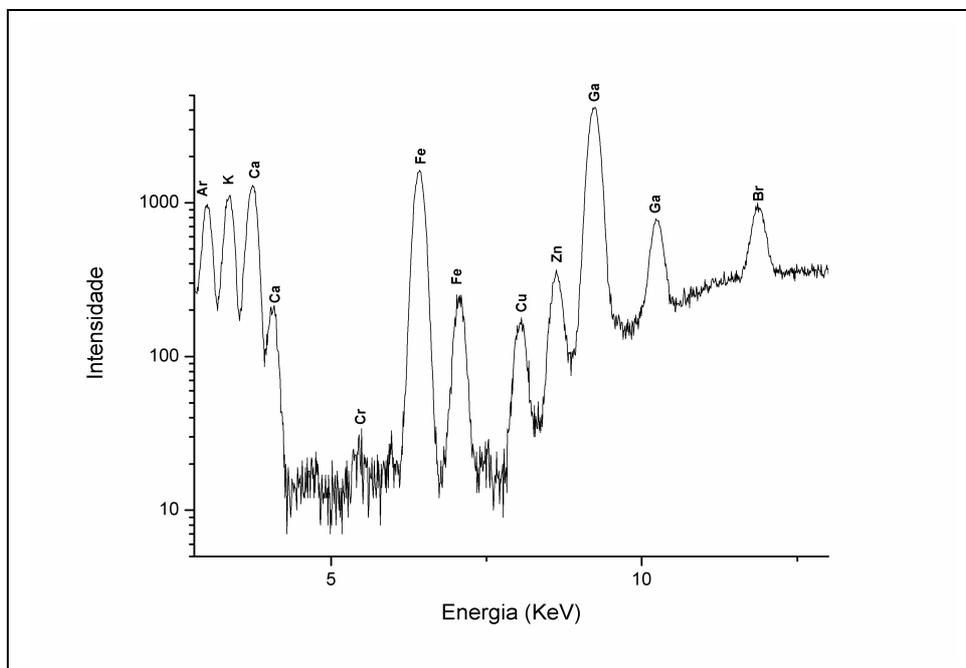


Figura 9 – Espectro característico típico obtido para as amostras de soro de ovelha.

IV.1.1. Sensibilidade Relativa

Para calcular a sensibilidade relativa, foram utilizadas 5 soluções padrão (Tabela 5) contendo elementos conhecidos e em diferentes concentrações. A todas elas foi acrescido o elemento Gálio (Ga), utilizado como padrão interno.

Utilizando-se a equação 2.13, pode-se obter a razão entre a intensidade do elemento (i) e do padrão interno (Ga). O coeficiente angular (S_i) da reta, no gráfico R_i versus C_i , representa a sensibilidade relativa do elemento i. O resultado da sensibilidade relativa para a série K está mostrado na Figura 10.

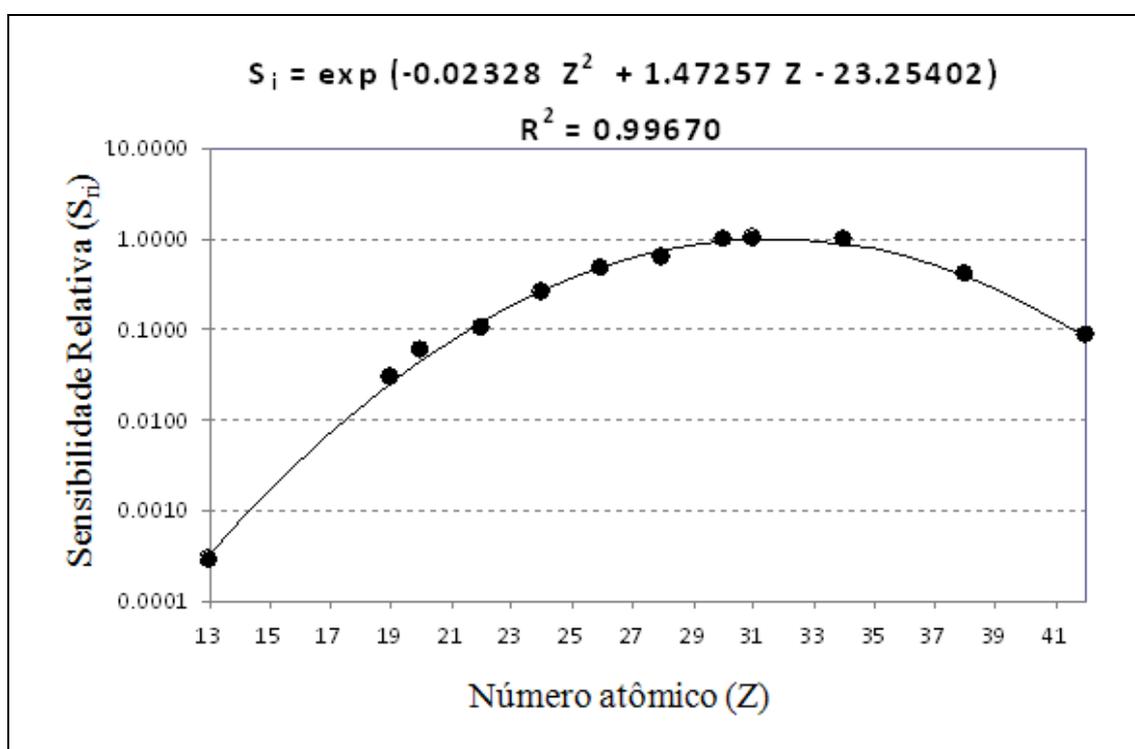


Figura 10 – Curva de calibração para série K.

IV.1.2. Limite de detecção (LMD)

Os valores obtidos para os limites de detecção para as amostras de soro de ovelha por SR-TXRF são apresentados na Figura 11, para um tempo de contagem de 100 s.

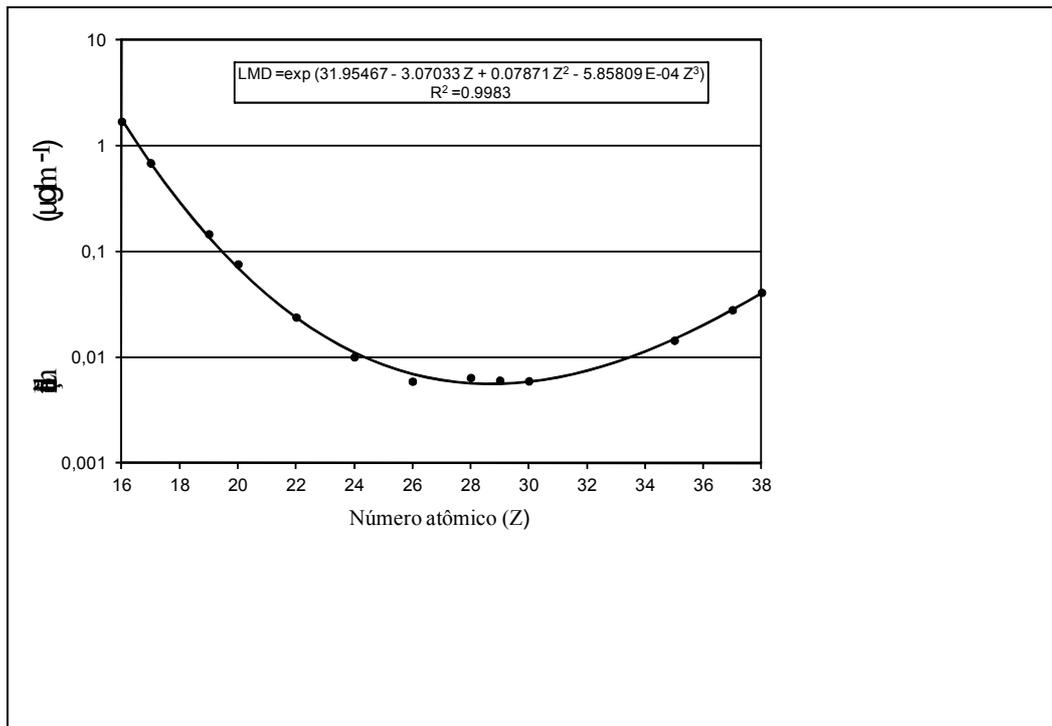


Figura 11 – Limite de detecção para as amostras de soro de ovelha.

IV.1.3. Materiais certificados

Para verificar o ajuste da curva de calibração para série K foi analisado um padrão de soro de ovelha e um de soro humano. O elemento Fe foi o único elemento utilizado para comparar os valores experimentais com os valores certificados e apresentaram desvios padrões inferiores a 5% e erros relativos inferiores a 10%, confirmando um bom ajuste para a curva de calibração.

IV.2. Comparação entre as técnicas

Como estudos (NOCKELS *et al.*, 1993) têm revelado que o estresse pode alterar o metabolismo dos minerais, decidimos dividir análise dos resultados em duas etapas: comparação entre o grupo CTR e o grupo ACTH e entre ACTH e grupos dos extratos.

IV.2.1. Comparação entre as amostras CTR X ACTH

IV.2.1.1. Análise do soro

Foram feitas análises bioquímica e por TXRF das amostras de soro.

IV.2.1.2. Cortisol, potássio e cálcio

Na ausência de estresse, a concentração plasmática do cortisol em animais saudáveis varia dentro de certos limites, embora a secreção não ocorra ao longo do dia, e sim em pulsos (MEIJ & MOL, 2008). Essa concentração reconhecidamente sofre considerável variação, sendo afetada pela raça, idade, experiência, estado fisiológico (ciclo estral, prenhez, etc) e sexo (DWYER & LAWRENCE, 2008; MEIJ & MOL, 2008). A média do cortisol ovino é $61,80 \pm 9,93$ nmol/L (KANEJO *et al.*, 1997).

Tabela 5. Resultados da análise bioquímica de cortisol.

Grupo	Cortisol (nmol/L)		
	T1	T2	T3
ACTH	83,17±19,78	271,83±76,48	421,00±84,27
CTR	33,97±22,16	43,43±16,32	46,43±23,49

As concentrações plasmáticas de cortisol no grupo controle (CTR) (Tabela 5) não sofreram modificações significativas ($P > 0,05$) durante o período experimental e estavam dentro da faixa fisiológica. No entanto, os níveis de cortisol aumentaram significativamente ($P = 0,000$) após o tratamento com ACTH.

O potássio é o cátion de mais alta concentração dentro das células porque é transportado constantemente para interior das mesmas pela "bomba de sódio" enquanto que a sua difusão para fora é lenta. Este elemento participa da manutenção do equilíbrio osmótico celular, ajudando a eliminar a água em excesso do corpo, regulando o pH do sangue. A concentração média deste micro elemento para o grupo controle (244 ± 22 µg/mL) encontrada neste trabalho está de acordo com LONG *et al.* (1965).

O ACTH é um hormônio que estimula a glândula adrenal e tende a reduzir os níveis séricos de K.

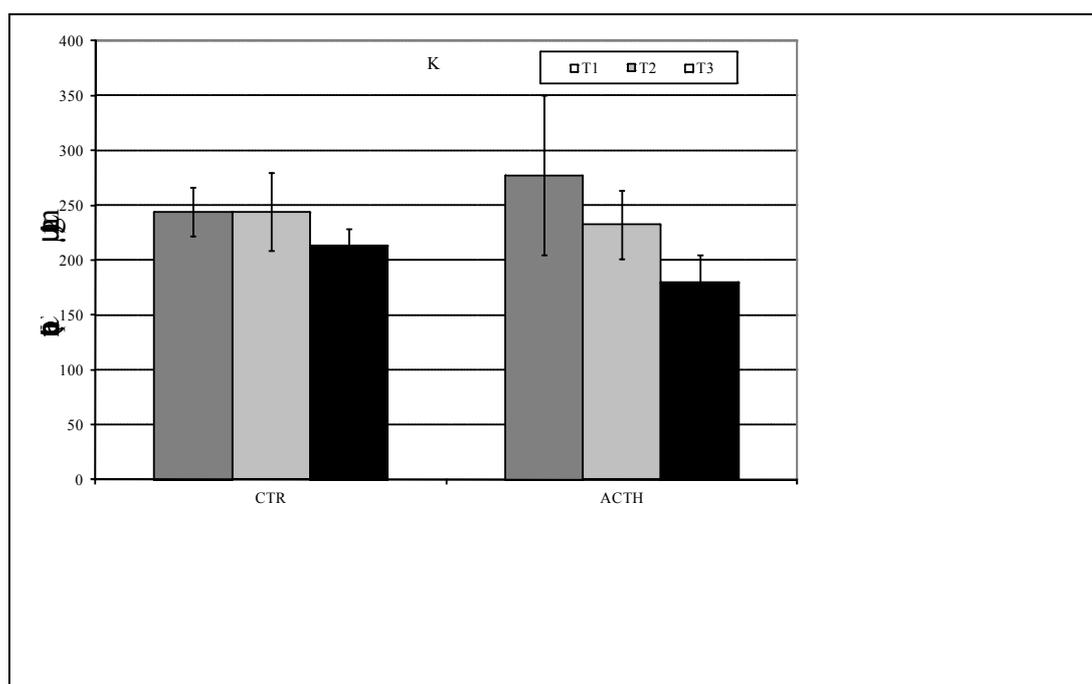


Figura 12 – Concentrações médias de K para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.

Nos grupos de animais tratados com ACTH, houve uma tendência à diminuição no T3, quando em comparado com T1 e T2. Os altos valores médios de K encontrados no T1 para o grupo ACTH provavelmente refletem uma presença de hemólise e pode ser considerado um artefato (muito freqüente nas análises de sangue desse elemento), principalmente quando valores normais encontrados nos mesmos animais após 3 horas (T2) são considerados. Os dados indicam que a monitoração deste elemento pode ser útil durante o tratamento com ACTH.

O cálcio é o mineral mais abundante do corpo humano e os seus níveis no sangue, que refletem o metabolismo de cálcio e fósforo inorgânico, são mantidos numa faixa de variação fisiológica. O ACTH, em certas condições, afeta a excreção renal de fosfato e como efeito colateral pode influenciar os níveis de Ca.

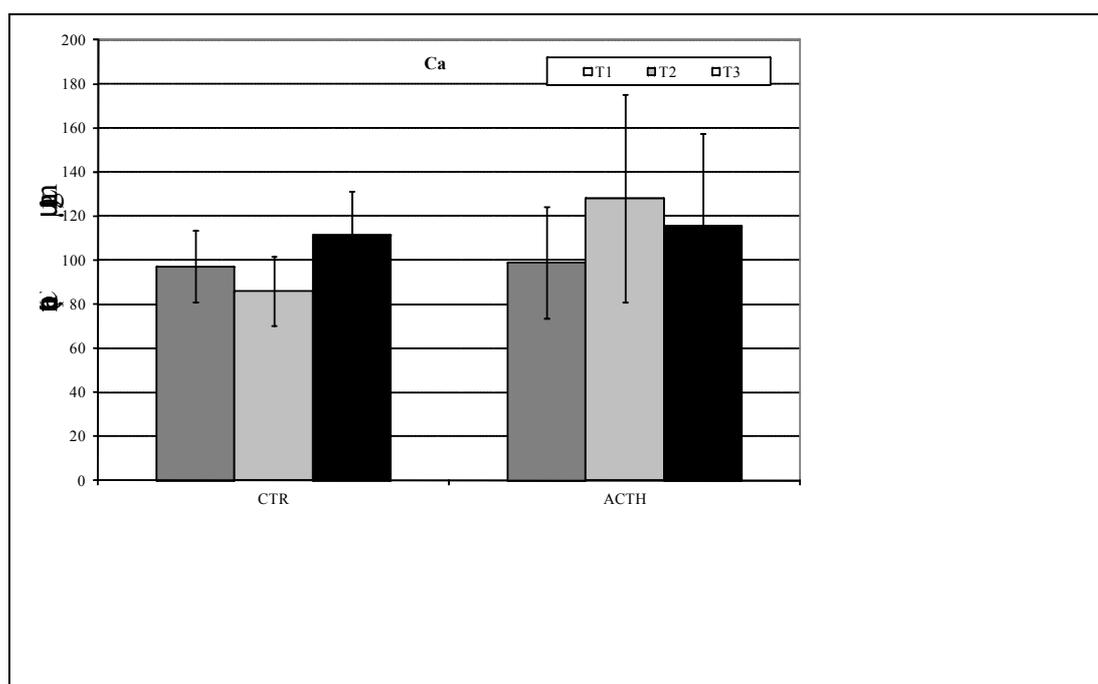


Figura 13 – Concentrações médias de Ca para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.

Neste trabalho, nenhuma variação significativa de Ca relacionada à injeção de ACTH foi evidenciada, o que está de acordo com a ausência de desconforto sofrido pelos animais.

Os valores médios de Ca para o grupo CTR estavam na faixa de 86 ± 22 a 111 ± 20 µg/mL, que é semelhante ao valor plasmático (116 µg/mL) relatado por BECKER & SMITH (1950) e está dentro da faixa estabelecida por DUKES (1955) de 90 a 120 µg/ml.

NORRIS & CHAMBERLIN (1929) e STEWART & HOLMAN (1944) sugerem valores normais (106 µg/mL para carneiros e 107 µg/mL para ovelhas).

IV.2.1.3. CuCp e cobre

O cobre é um micro elemento que é clinicamente monitorado através de exames de sangue laboratoriais específicos como, por exemplo, a dosagem de cobre. Análises convencionais consistem principalmente na medida da CuCp.

Este elemento é essencial à vida e as ovelhas têm uma necessidade de dietas à base de Cu. Ele participa dos processos físico-químicos que ocorrem no corpo. Ele é necessário no metabolismo do ferro, na formação de células vermelhas e na produção de pigmentos da pele e do cabelo, ou seja, melanina. O Cu é essencial para a formação de mielina, uma substância que sustenta e protege o sistema nervoso central, e para a produção de lã e está envolvido na resposta imune do animal devido a doenças (UNDERWOOD & SUTTLE, 2001).

Tabela 6. Resultados da análise bioquímica de CuCp.

Grupo	CuCp ($\mu\text{g/mL}$)		
	T1	T2	T3
ACTH	0,18 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02	0,21 \pm 0,05
CTR	0,17 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01

As concentrações de CuCp não variaram significativamente, quer com o tempo de amostragem ou com o grupo (Tabela 6), mas uma tendência clara é evidente a partir dos dados relatados na tabela. Devido a uma variabilidade inter-individual das ovelhas, variações estatisticamente significativas não foram observadas por meio da análise bioquímica. No entanto, é válido ressaltar que uma vez encontradas alterações, em um intervalo não patológico, o aumento CuCp pode refletir em um mecanismo de ação desconhecida e precisa ser investigado.

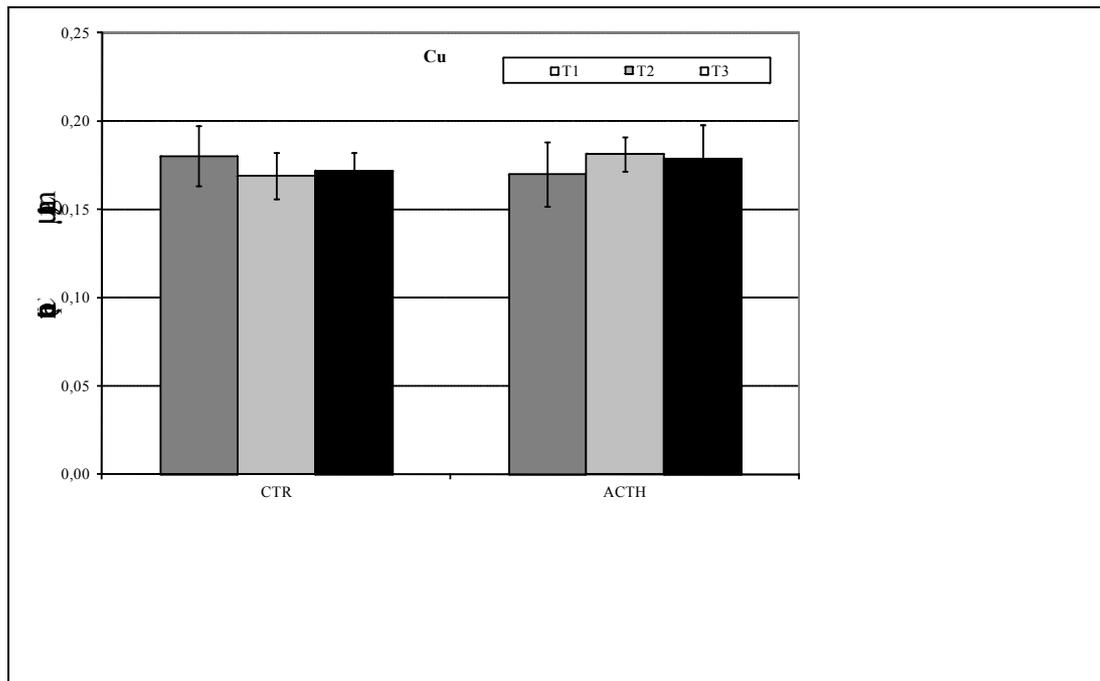


Figura 14 – Concentrações médias de Cu para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.

Através da análise de SR-TXRF, o valor médio encontrado para o grupo CTR foi de $0,17 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$, que está dentro da faixa de valor plasmático de Cu ($0,17 + 0,02 \mu\text{g/mL}$.) encontrado na análise bioquímica. Nenhuma diferença significativa nos níveis de Cu foi encontrada após a administração de ACTH.

IV.2.1.4. Zn

O zinco é essencial para a função de numerosas enzimas. Em particular, tem se mostrado fundamental em processos bioquímicos envolvidos no metabolismo do ácido nucléico e da divisão celular (CHESTERS, 1974). Por esta razão, o Zn tem sido reconhecido como um importante nutriente para a espermatogênese e para a fertilidade masculina em animais de fazenda. Recentemente, no entanto, o papel de zinco na resposta imune tem recebido certa atenção.

Pesquisas recentes demonstram que a deficiência deste mineral em bovinos prejudica o seu crescimento e diminui a resposta imunológica. Dados significantes sobre ovelhas (DROKE & SPEARS, 1993) e ratos (BEACH *et al.*, 1981) sustentam essa suposição.

Tabela 7. Resultados da análise bioquímica de Zn.

Grupo	CuCp ($\mu\text{g/mL}$)		
	T1	T2	T3
ACTH	0,80 \pm 0,08	0,83 \pm 0,11	0,55 \pm 0,10
CTR	0,81 \pm 0,09	0,75 \pm 0,14	0,75 \pm 0,09

As concentrações de Zn diminuíram significativamente ($P = 0,000$) entre o tempo de amostragem do grupo ACTH, sendo provavelmente influenciado pelo tratamento com ACTH (ARTHINGTON *et al.*, 2003; CEBRA *et al.*, 2003 e SGORLON *et al.*, 2007).

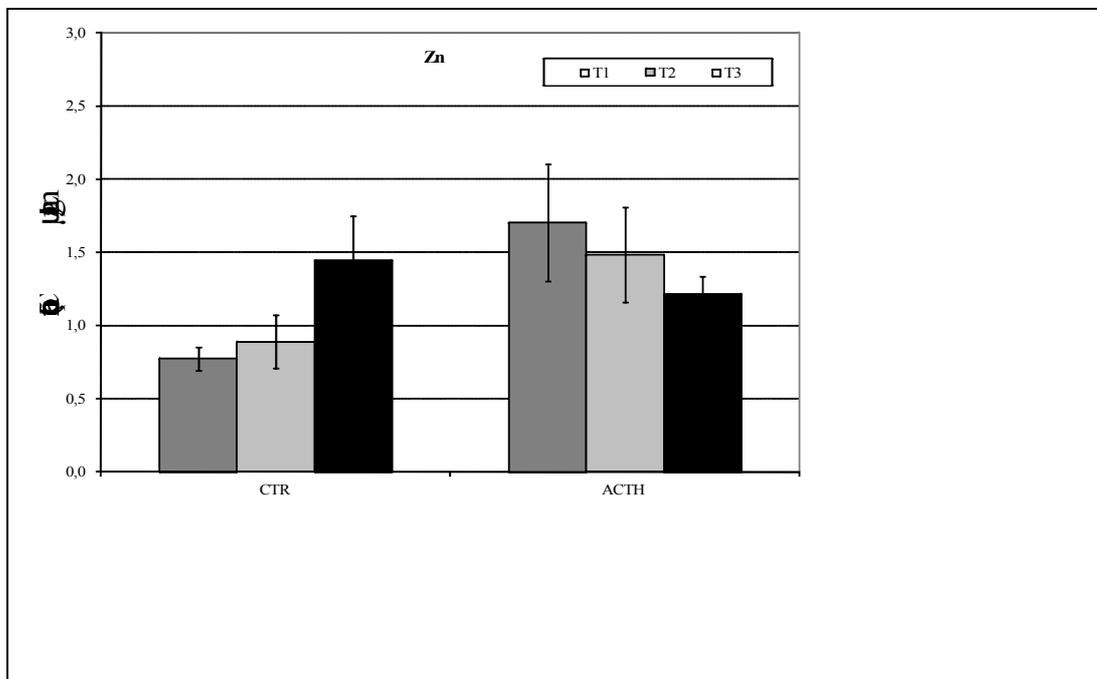


Figura 15 – Concentrações médias de Zn para todos os grupos em relação ao tempo de amostragem.

Neste trabalho, a análise bioquímica mostra uma diminuição da concentração de Zn principalmente no tempo T3, provavelmente como uma consequência da injeção de ACTH. Isto está de acordo com trabalhos anteriores (NOCKELS *et al.*, 1993) e de acordo com a análise por TXRF.

Foi feito o teste de correlação linear de Pearson, os resultados mostram forte correlação negativa, ao comparar a técnica da análise bioquímica com a de TXRF, ao

avaliar as variáveis cortisol e K ($r = 0,9826$ e $p < 0,05$). A medida que aumenta uma das variáveis, a outra decresce de valor, não havendo, entretanto, relação de dependência entre as variáveis. As demais correlações não são estatisticamente significativas.

IV.2.2. Comparação entre as amostras ACTH X Extratos

Estudos clínicos e epidemiológicos têm evidenciado que uma dieta equilibrada e um estado nutricional adequado contribuem para a homeostasia do sistema imune, regulando a defesa do hospedeiro e diminuindo o risco no desenvolvimento de doenças crônicas e agudas (CHANDRA, 1997, BEISEL, 1992, CHANDRA, 2002). Apesar dos nutrientes desempenharem papel regulador imprescindível no organismo, existe ainda outra classe de substâncias presentes nos alimentos que quando ingeridos regularmente promovem efeitos benéficos à saúde. Estas substâncias são denominadas “compostos bioativos”, os quais são constituintes extra-nutricionais que ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos, variando amplamente em suas estruturas químicas e funções. Inclui os compostos fenólicos e sua subcategoria, os flavonóides, que estão presentes em todas as plantas e têm sido amplamente estudados em frutas, hortaliças, cereais, legumes, nozes, óleo de oliva, chás e vinho (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

Os alimentos que contêm compostos bioativos podem eventualmente ser considerados alimentos funcionais, pois quando consumidos como parte da dieta usual contribuem não somente com os nutrientes tradicionais, mas também conferem efeitos adicionais que protegem contra as doenças comuns.

IV.2.2.1. Análise do soro

IV.2.2.2. Cortisol, potássio e cálcio

Tabela 8. Resultados da análise bioquímica de cortisol.

Grupo	Cortisol (nmol/L)		
	T1	T2	T3
ACTH	83,17±19,78	271,83±76,48	421,00±84,27
PO	55,30±20,64	270,40±19,36	508,40±126,86
EA	40,78±40,14	264,67±61,27	464,50±86,37
AP	42,60±34,57	270,50±69,51	411,50±76,27
LD	43,82±53,81	301,17±52,88	461,17±69,66

Os níveis de cortisol aumentaram significativamente ($P = 0,000$) após o tratamento com ACTH para todos os grupos analisados.

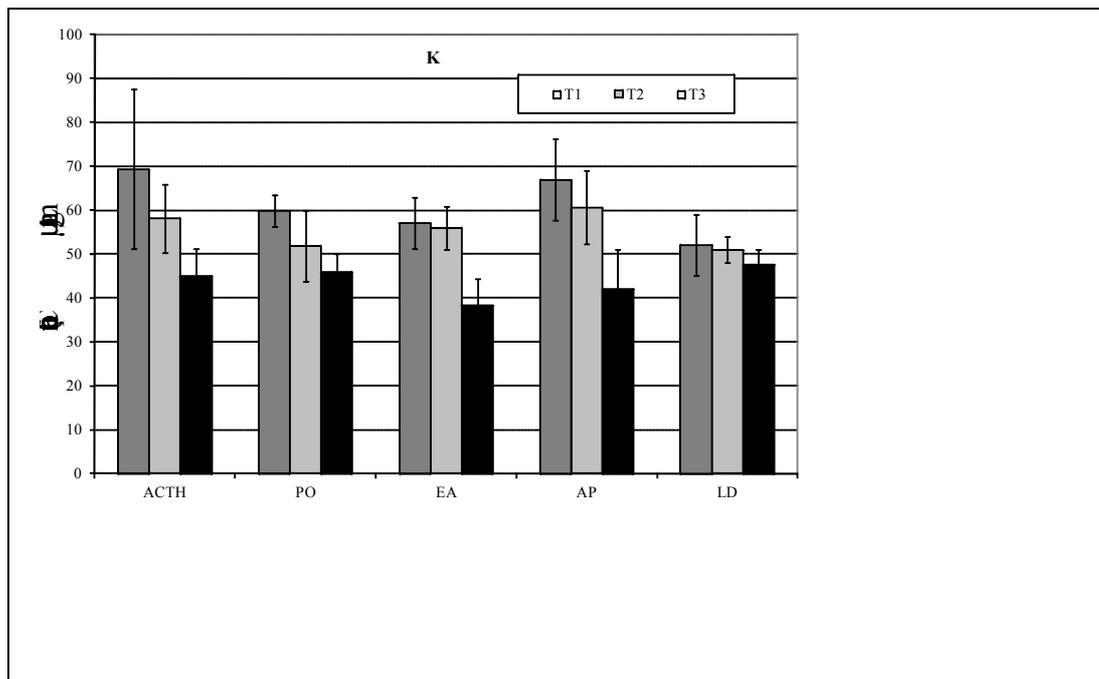


Figura 16 – Concentração média de K para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.

Nos grupos de animais tratados com ACTH, há uma tendência a uma diminuição que é mostrada no tempo T3, quando comparada com os tempos T1 e T2, respectivamente. A redução é claramente significativa ($P < 0,01$) no caso dos extratos EA e AP, enquanto que para o LD essa tendência parece ser contrariada. Os altos valores de K encontrados no T1 do grupo de ACTH provavelmente refletem a presença de

hemólise e pode ser considerado um artefato (muito freqüente em análises de sangue desse elemento), particularmente considerando os valores normais encontrados nos mesmos animais depois de 3h (T2). Estes dados indicam que o acompanhamento deste elemento pode ser útil durante o tratamento com ACTH.

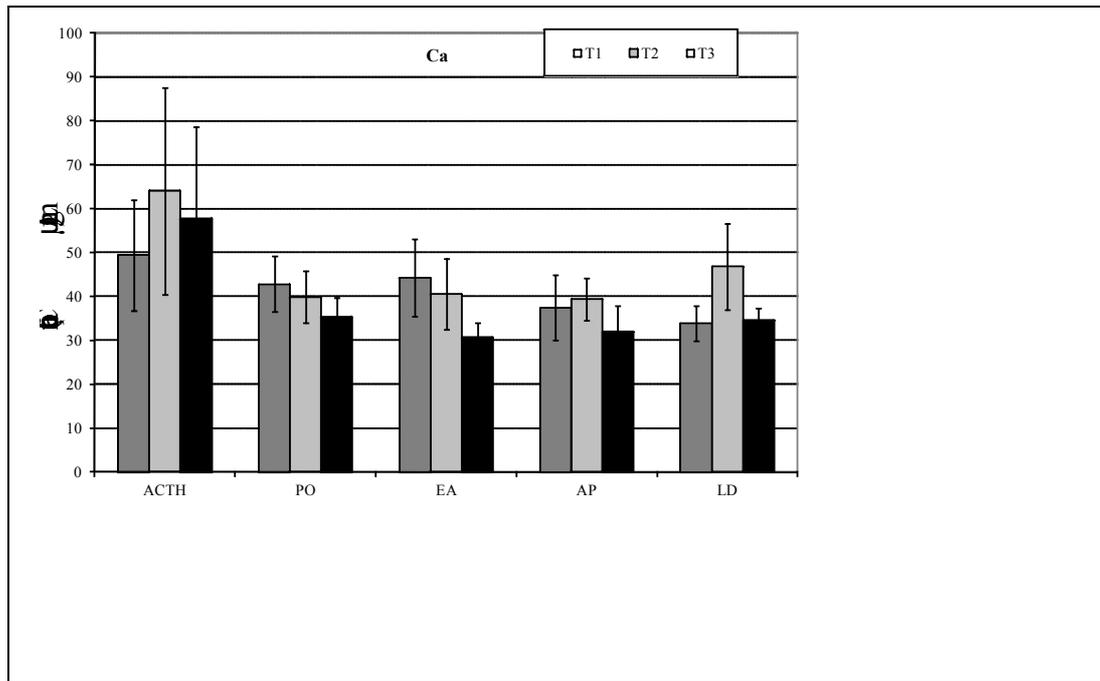


Figura 17 – Concentração média de Ca para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.

Na análise por SR-TXRF, nenhuma variação relacionada ao ACTH é evidenciada, já que não ocorreu nenhum tipo de desconforto nos animais. Por outro lado, algumas drogas podem causar uma leve mudança na concentração de Ca no sangue promovendo a sua excreção ou reduzindo a sua absorção pelo intestino. Este parece o caso do suplemento a base de ervas utilizado em nosso estudo já que nas nossas análises houve uma tendência à diminuição do nível de Ca para todos os bioativos usados quando comparados com os grupos do ACTH (no tempo T3, $P < 0,01$). Este efeito deve ser levado em consideração principalmente quando tratamentos de longo prazo feitos com esses extratos são utilizados.

IV.2.2.2. CuCp e cobre

Tabela 9. Resultados da análise bioquímica de CuCp.

Grupo	CuCp ($\mu\text{g/mL}$)		
	T1	T2	T3
ACTH	0,18 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02	0,21 \pm 0,05
PO	0,18 \pm 0,02	0,20 \pm 0,03	0,20 \pm 0,02
EA	0,26 \pm 0,12	0,23 \pm 0,07	0,23 \pm 0,06
AP	0,17 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02
LD	0,17 \pm 0,02	0,20 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04

As concentrações de CuCp não variaram significativamente tanto em função do tempo de amostragem quanto em função do grupo (tabela 9), mas uma tendência clara é evidente a partir dos dados da tabela. Os animais do grupo EA mostraram concentrações elevadas desta proteína plasmática para todos os tempos de amostragem. Entretanto, as variações não representaram valores estatisticamente significativos por meio de análises multivariadas devido a uma variação inter-individual das ovelhas. A tendência parece indicar que o extrato EA afeta este parâmetro, o qual é geralmente aumentado por condições de estresse e eventos inflamatórios. No entanto, uma vez que as mudanças não estão numa faixa patológica, o aumento de CuCp pode refletir um mecanismo desconhecido de ação da droga e necessita de investigações futuras.

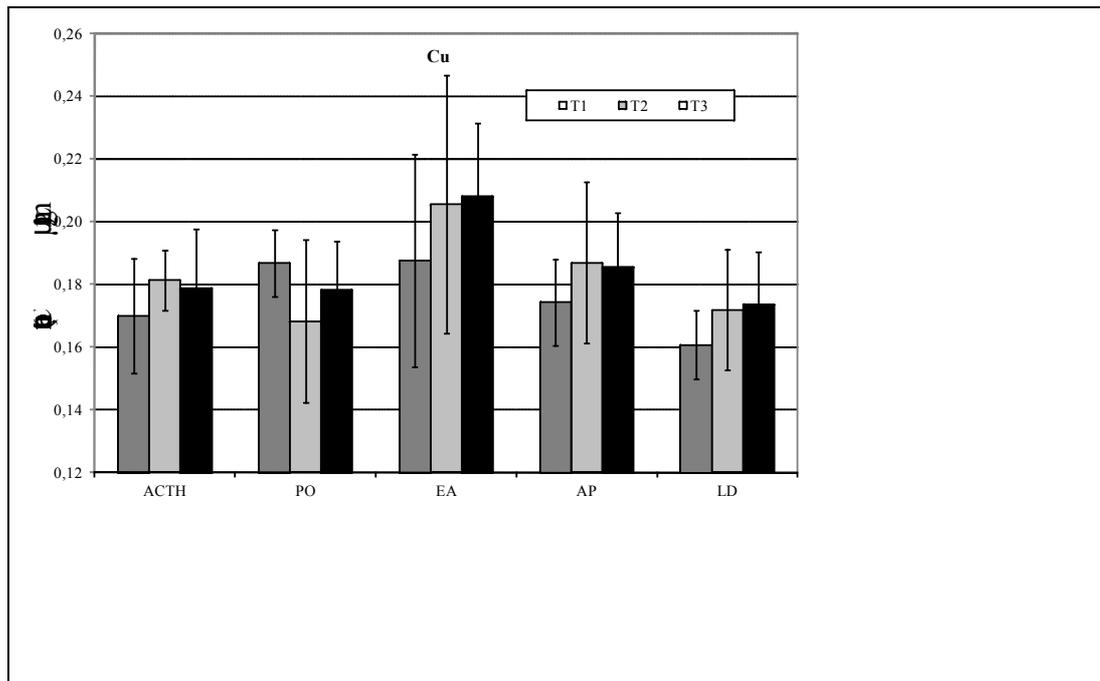


Figura 18 – Concentração média de Cu para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.

Através das análises por SR-TXRF, foram obtidas as concentrações de Cu no sangue. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no nível de Cu depois da administração de ACTH. O tratamento com extrato EA resultou num suave aumento do nível de Cu ($P < 0,01$). Estes resultados confirmam e adicionam uma significância estatística à análise bioquímica da CuCp para as mesmas amostras, indicando que o extrato EA realmente afeta o metabolismo do Cu (Tabela 9).

Isto pode ter implicações importantes para entender o efeito da adição de EA nos alimentos, uma vez que Cu e suas proteínas de ligação têm claramente um papel nos mecanismos de imunomodulação e inflamação (STEFANON, 2007). Mais estudos são necessários para demonstrar o efeito benéfico potencial da droga através de uma mudança no metabolismo do Cu.

IV.2.2.3. Zinco

Tabela 10. Resultados da análise bioquímica de zinco.

Grupo	Zn ($\mu\text{g/mL}$)		
	T1	T2	T3
ACTH	0,80 \pm 0,08	0,83 \pm 0,11	0,55 \pm 0,10
PO	0,83 \pm 0,09	0,78 \pm 0,10	0,74 \pm 0,12
EA	0,80 \pm 0,11	0,79 \pm 0,12	0,68 \pm 0,05
AP	0,78 \pm 0,21	0,71 \pm 0,10	0,61 \pm 0,09
LD	0,81 \pm 0,11	0,84 \pm 0,09	0,64 \pm 0,14

As concentrações de Zn diminuíram significativamente ($P < 0,05$) entre o tempo de amostragem dos grupos de ACTH, AP, EA e LD, sendo influenciado pelo tratamento de ACTH (ARTHINGTON et al, 2003; CEBRA et al, 2003 e SGORLON et al, 2007).

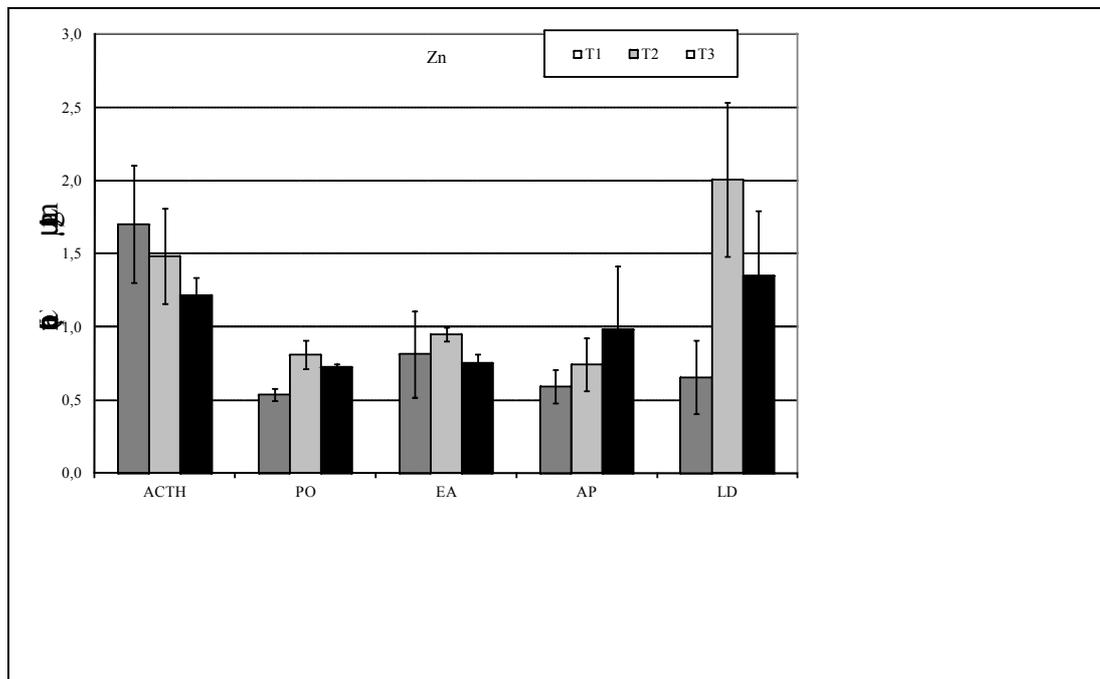


Figura 19 – Concentração média de Zn para todos os grupos analisados em relação ao tempo de amostragem.

Os grupos PO ($P = 0,000$) e EA ($P = 0,000$) apresentaram uma diminuição significativa de suas concentrações médias principalmente no tempo T3. O que indica

que esses extratos não foram capazes de suprir a deficiência de Zn provocada pela injeção de ACTH.

Foi feito o teste de correlação linear de Pearson, os resultados mostram forte correlação negativa, ao comparar a técnica da análise bioquímica com a de TXRF, ao avaliar as variáveis: cortisol e grupos de extratos quanto ao nível de K ($r = 0,9908$ e $p < 0,05$). À medida que aumenta uma das variáveis, a outra decresce de valor, não havendo, entretanto, relação de dependência entre as variáveis. As demais correlações não são estatisticamente significativas.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

A interação entre minerais, produção animal e resistência a doenças é extremamente complexa. Muitos fatores podem afetar a resposta de um animal ao se utilizar suplementação mineral, tais como a duração e a concentração do mineral utilizado, a suplementação fisiológica de um animal, a ausência ou presença de antagonistas na dieta, fatores ambientais, e a influência do estresse sobre o metabolismo mineral. Neste estudo, provamos que o estresse afeta a concentração de soro de ovelhas.

Neste trabalho, pode-se demonstrar a aplicabilidade e as vantagens de se usar a técnica quantitativa SR-TXRF para monitorizar alterações elementares mínimas do soro durante tratamentos nutricionais, particularmente úteis em um conceito de medicina personalizada.

Com esse estudo foi possível concluir que há uma tendência à diminuição da concentração de K para todos os animais, no período de 51 horas após o tratamento ATCH. A concentração média de Ca mostrou uma tendência de queda para todos os compostos bioativos em relação ao grupo de controle e de ACTH. Não houve diferença significativa no nível de Cu após administração de ACTH.

O tratamento com extrato de EA, mas não com o PO, AP e LD, resultou em um suave aumento dos níveis séricos de Cu. Isto pode ter implicações importantes para entender o efeito da adição de EA nos alimentos, uma vez que Cu e suas proteínas de ligação têm claramente um papel nos mecanismos de imuno-modulação e inflamação.

Uma elevada variação inter-individual nos níveis de Zn foi encontrada por SR-TXRF em todos os grupos de animais analisados que está de acordo com as análises bioquímicas convencionais. Nossos resultados indicam que o uso de suplementos na dieta pode afetar as concentrações de alguns elementos do soro e análises futuras deverão particularmente investigar o significado das variações fisiológicas de Ca e Cu.

Devido às diferenças inter-individuais entre as ovelhas, concluímos que é necessário aumentar o número de amostras.

Através desse trabalho, foi possível demonstrar a aplicabilidade e as vantagens da análise quantitativa por SR-TXRF ao avaliar as mínimas mudanças elementares do soro

durante o tratamento nutricional, particularmente útil em um conceito de medicina personalizada.

Como sugestão para trabalhos futuros, pretende-se verificar os efeitos desses extratos em outros animais e avaliar os efeitos de outros extratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGINGER, H., WOBRAUSCHEK, P. 1974, "A method for quantitative X-ray fluorescence analysis in the nanogram region" *Nuclear Instruments and Methods*, v. 114, p. 157-158.

ARTHINGTON, J. D., EICHER, S. D., KUNKLE, W. E., MARTIN, F.G. 2003, "Effect of transportation and commingling on the acute phase protein response, growth and feed intake of newly weaned beef calves" *J. Anim. Sci.* v. 81, p. 1120-1125.

BALM P. H. M. Stress physiology in animals. Sheffield: Academic Press, 1999. 51 p.

BEACH, R. S., GERSHWIN, M. E., HURLEY, L. S. 1981, "Nutritional factors and autoimmunity. I. Immunopathology of zinc deprivation in New Zealand mice" *J. Immunol.* v. 126, p. 1999-2006.

BEISEL, W. R. 1996, "Nutrition and immune function: Overview" *J. Nut.*, v. 126 (10), p. 2611S-2615S.

BECKER, D. E. & SMITH, S. E. 1950, "Chemical and morphological study of normal sheep blood" *Cornell Vet.* v.40, p.350.

BARTON, B.A. 2000, "Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress" *North American Journal of Aquaculture.* v. 62, p. 12-18.

BERTONI, G., LOMBARDELLI, R., PICCIOLI-CAPPELLI, F., BLUM, J. 2002, "Basal levels and diurnal variations of some hormones and metabolites in blood of dairy cows treated daily with rbST in early and late lactation" *Ital. J. Anim. Sci.*v. 1, p. 127-141.

BERTONI, G., TREVISI, E., CALAMARI, L., LOMBARDELLI, R. 1998, "Additional energy and protein supplementation of dairy cows in early lactation: Milk yield, metabolic-endocrine status and reproductive performances" *Zootec. Nutr. Anim.* v. 24, p. 17-29.

BOUMANS, P.; KLOCKENKÄMPER, R. 1989, "Total reflection X-ray fluorescence spectrometry" *Spectrochimica Acta B* v. 44, p. 433-549.

BOUTINAUD, M., GUINARD-FLAMENT, J., JAMMES, H. 2004, "The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production" *Reproduction, Nutrition and Development*. v. 44, p. 499-508.

BRESOLIN, T. M. B., CHECHINEL FILHO, V. (Orgs.) Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, 2003.

BROOM, D. M. 1991, "Animal-welfare: concepts and measurements" *J. of Ani. Sci.*, v. 69, p. 4167-4175.

BUCKHAM SPORER, K. R., BURTON, J. L., EARLEY, B., CROWE, M. A. 2007, "Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodelling, margination, and anti-bacterial function" *Vet Immunol Immunopathol* v. 118, p. 19-29.

CÁCERES, D. D., HANCKE, J. L., BURGOS, R. A., WIKMAN, G. K. 1997, "Prevention of common colds with *Andrographis paniculata* dried extract: A pilot double-blind trial" *Phytomedicine* v. 4, p. 101-104.

CALABRESE, C., MERMAN, S. H., BABISH, J. G., MA, X., SHINTO, L., DORR, M., WELLS, K., WENNER, C. A., STANDISH, L. J. 2000, "A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers" *Phytother Res* v. 14, p. 333- 338.

CARBAJAL, S., ORIHUELA, A. 2001, "Minimal Number of Conspecifics Needed to Minimize the Stress Response of Isolated Mature Ewes" *Journal of Applied Animal Welfare Science*, v. 4, p. 249-255.

CARNEIRO, A. E. V. 1995 *Análise quantitativa da composição química do sedimento depositado nas planícies de inundação de alguns rios da Amazônia*. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. São Paulo, 219p.

CARNEIRO, A. E. V., NASCIMENTO FILHO, V. F. 1996, “Análise quantitativa de amostras geológicas utilizando a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia” *Scientia Agricola* v. 53, p. 95-105.

CARVALHO, M. L., CUSTÓDIO, P. J., REUS, U., PRANGE, A. 2001, “Elemental analysis of human amniotic fluid and placenta by total-reflection X-ray fluorescence and energy-dispersive X-ray fluorescence: child weight and maternal age dependence” *Spectrochim. Acta Part B*. v. 56(11), p. 2175–2180.

CASTILHO, R. B., 2006, *Fotoionização de produtos naturais voláteis utilizando luz síncrotron e técnicas de tempo de voo*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CEBRA, C. K., HEIDEL, J. R., CRISMAN, R. O., STANG, B. V. 2003, “The relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in postparturient Holstein cows” *J. Vet Intern. Med.* v. 17, p. 902-907.

CHANDRA, R. K. 1997, “Nutrition and the immune system: an introduction” *Am. J. Clin. Nutr.* v. 66 (2), p. 460S-463S.

CHANDRA, R. K. 2002, “Nutrition and the immune system from birth to old age” *Eur. J. Clin. Nutr.* v. 56 (3), p. S73-S76.

CHESTERS, J. K. 1974, “Biochemical functions of zinc with emphasis on nucleic acid metabolism and cell division” In: W.G. HOEKSTRA, J.W. SUTTIE, H.E. GANTHER AND W. MERTZ (Eds). *Trace Element Metabolism in Animals – 2*. PP 39-50. University Park Press. Baltimore, MD.

COCKRAM, M. S. *et al.* 1994, “The behavioral, endocrine and immune responses of sheep to isolation” *Animal Productions*, v. 58, p. 389-399.

DELGODA, R., WESTLAKE, A. C. G. 2004, “Herbal interactions involving cytochrome P450 enzymes: a mini review” *Toxicol Rev* v. 23, p. 239-249.

DENG, W. L. 1978, “Outline of current clinical and pharmacological research on *Andrographis paniculata* in China” *News Chinese Herbal Med* v. 10, p. 27-31.

DOYLE, R. E. *et al.* 2010, “Release from restraint generates a positive judgment bias in sheep” *Applied Animal Behaviour Science*, v. 122, p. 28-34.”

DROKE, E. A. & SPEARS, J. W. 1993, “In vitro and in vivo immunological measurements in growing lambs fed diets deficient, marginal or adequate in zinc” *J. Nutr. Immunol.* v. 2, p. 71-90.

DUKES, H. H. (1955) *The Physiology of Domestic Animals*. Cornell University Press, Ithaca, New York. p. 49.

DWYER, R. E., LAWRENCE, A. B. 2008, “Introduction to Animal Welfare and the Sheep” In: DWYER C. (Ed.). *The Welfare of Sheep*. Edinburgh: Springer Netherlands, v.1, 2008, p. 1-40.

EUROPEAN COMMISSION (Commission of the European Communities), White Paper on Food Safety, 2000, http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_en.pdf.

FARINACCI, M., COLITTI, M., SGORLON, S., STEFANON, B. 2008, “Immunomodulatory activities of plant residues on ovine neutrophils” *Vet. Immunol. Immunopathol.* v. 126, p. 54-63.

FARINACCI, M., COLITTI, M., STEFANON, B. 2009, “Modulation of ovine neutrophil function and apoptosis by standardized extracts of *Echinacea angustifolia*, *Butea frondosa* and *Curcuma longa*” *Vet. Immun. and Immunopa.* v.128, p. 366–373.

FLANNERY, M. A. 1999, “From *Rudbeckia* to *Echinacea*: the emergence of the purple cone flower in modern therapeutics” *Pharm Hist.* v. 41, p. 52-59.

FOSTER S. *Echinacea: Nature’s Immune Enhancer.* Rochester, VT : Healing Arts Press; 1991.

FRASER A.F. Sheep. In: ROLLIN B.E. (Ed) *Experimental Animal in Biomedical Research.* Colorado: CRC-Press, v.2, 1995. P.560.

FRIEND, T. H. 1991, “Response of animals to stress: Behavioral aspects of stress” *J. Dairy Sci.* v. 74, p. 292-303.

GIRARDI, F., PAULY, J.; SABBIONI, E.; VOS, G. “Elemental analysis of a biological standard reference material by non-destructive methods” In: IAEA, ed. – *Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences.* Viena, p. 229, 1967.

GOUD, P. S., PULLAIAH, T., 1996, “Folk veterinary medicine of Kurnool District, Andhra Pradesh” *Ethnobotany* v. 8, p. 71–74.

GRANDIN, T. 1997, “Assessment of stress during handling and transport” *J. Anim. Sci.* v. 75, p. 249-257.

GUARRERA, P.M., 1994, “Il patrimonio etnobotanico del Lazio” *Regione Lazio e Dipartimento di Biologia Vegetale*, Roma, pp. 301.

HARGREAVES, A. L., HUTSON, G. D., 1997, “Handling systems for sheep” *Livestock Production Science*, v. 49, p. 121-138.

HOBBS, C. *The Echinacea Handbook.* Sandy, OR: Eclectic Medical Publications; 1989.

HOTTA H, NAGANO S, MASASHI UEDA M, YOSHIO TSUJINO Y, JUNKO KOYAMA J, OSAKAI T, 2002, “Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be scribed to chemical reactions following their oxidation” *Biochim Biophys Acta*. v. 1572 p. 123-132.

HUGHES, D. A., 1999, “Effects of carotenoids on human immune function” *Proceedings of the Nutrition Society* ; v. 58, p. 713-718.

HUTSON, G. D. Behavioral principles of sheep handling. In: GRANDIN, T. (Ed.). *Livestock handling and transport*. Wallingford: CAB International, 1993, p. 127.

IAEA. Radioisotopes X-Ray Fluorescence Spectrometry. Vienna: International Atomic Energy Agency. Technical Reports Series. n. 115. 102p., 1970.

IRURETAGOYENA, M. I., TOBAR, J. A., GONZALEZ, P. A., SEPULVEDA, S. E., FIGUEROA, C. A., BURGOS, R. A., HANCKE, J. L., KALERGIS, A. M. 2005, “Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse” *J Pharmacol Exp Ther*. v. 312(1), p. 366-372.

IZZO, A. A., ERNST, E. 2001, “Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review” *Drugs* v. 61, p. 2163-2175.

JARUKAMJORN, K. 2008, “Andrographis paniculata: a review of aspects of regulatory mechanisms of hepatic CYP1A enzymes” *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* v. 7 (2), p. 100 – 107.

KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. (eds): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Sand Diego, Academic Press, v.1, 2008, pp. 605-622.

KLOCKENKÄMPER, R.; KNOTH, L.; PRANGE, A.; SCHWENKE, H. 1992, “Total reflection Xray fluorescence spectroscopy” *Analytical Chemistry*. v. 64. P. 1115-1123.

KLOCKEMKÄMPER, R. & VON BOHLEN, A. 1996, “Elemental analysis of environmental samples by total reflection fluorescence: A review” *X-ray Spectrometry* v. 25, p. 156 - 162.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. 2002, “Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer” *Am. J. Med.* v. 30(9B), p. 71S-88S.

KOLHIR, V. K.; BYKOV, A. I.; BAGINSKAJA, S. Y.; SOKOLOV, N. G.; GLAZOVA, N. G.; LESKOVA, T. E.; SAKOVICH, G. S. 1996, “Antioxidant Activity of a Dihydroquercetin Isolated from *Larix gmelinii* (Rupr.)” *Rupr. Wood. Phytother. Res.* v. 10, p. 478–482.

KOOPMANN, C., PRANGE, A., 1991, “Multielement Determination in Sediments from the German Wadden Sea – Investigations on Sample Preparation Techniques” *Spectrochim. Acta*, v. 46, p. 1395-1402.

KORTE, S. M., BOUWS, G. A., KOOLHAA, J. M., BOHUS, B. 1992, “Neuroendocrine and behavioral responses during conditioned active and passive behavior in the defensive burying/probe avoidance paradigm: Effects of ipsapirone” *Physiol. Behav.* v. 52, p. 355-361.

KUMAR, R. A., SRIDEVI, K., KUMAR, N. V., NANDURI, S., RAJAGOPAL, S. 2004, “Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*” *J Ethnopharmacol* v. 92, p. 291-295.

LACHANCE, G. R., CLAISSE, F., 1994, *Quantitative X-ray Fluorescence Analysis: Theory and Application*. 1ed. New York, Wiley.

LADISICH, W., RIEDER, R., WOBRAUSCHEK, P., 1994, “Quantitative total reflection X-ray fluorescence analysis with monoenergetic excitation” *X-Ray Spectrometry* v. 23, p. 173-177.

LANS, C., BROWN, G., 1998a. "Observation on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago" *Preventive Veterinary Medicine* v. 35, p. 125–142.

LANS, C., BROWN, G., 1998b, "Ethnoveterinary medicines used for ruminants in Trinidad and Tobago" *Preventive Veterinary Medicine* v. 35, p. 149–163.

LANS, C., HARPER, T., GEORGES, K., BRIDGEWATER, E., 2000. "Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago" *Preventive Veterinary Medicine* v.45, p. 201–220.

LYKKESFELDT, J., SVENDSEN, O., 2007, "Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals" *Vet. J.* v. 173, p. 502-511.

LONG, C. H., ULLREY, D. E., MILLER, E. R., VINCENT, B. H., ZUTAUT, C. L. 1965, "Phosphorus, Magnesium, Sodium and Potassium Sheep Hematology from Birth to Maturity III. Serum Calcium" *J Anim. Sci* v. 24, p. 145-150.

LOPEZ, M.E., AGUILAR, A., 2001, "Plantas medicinales utilizadas en El tratamiento de Granos". In: Third International Congress of Ethnobotany, Etnobotanica Napoli 2001 —Italy, September 22–30, Abstracts. Botanical Garden and Department of Plant Biology University of Naples Federico II, Italy, Delpinoa n.s. 43, p. 71.

MACUHOVA, J., TANCIN, V., KRAETZL, W. D., MEYER, H. H. D., BRUCKMAIER, R. M. 2002, "Inhibition of oxytocin release during repeated milking in unfamiliar surroundings: The importance of opioids and adrenal cortex sensitivity" *J. of Dairy Research*. v. 69, p. 63-73.

MARCÓ, L. M. P. & HERNÁNDEZ-CARABALLO, E. A., 2004, "Direct analysis of biological sam- ples by total reflection X-ray fluorescence" *Spectrochim. Acta Part B*. v. 59, p. 1077-1090.

MARGARITONDO, G. 1995, "A primer in Synchrotron Radiation: Everything you wanted to know about SEX (Synchrotron Emission of X-Rays) but afraid to ask" *Journal of Synchrotron Radiation* v. 2, p. 148-154.

MARTINEZ, D. Larix. In: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. 5. Ausgabe; BLASCHEK, W., HAÑSEL, R., KELLER, K., REICHLING, J., RIMPLER, H., SCHNEIDER, G., Eds.; Springer Verlag: Berlin, Germany, 1998; Vol. 3, pp 38-43.

MATTERI, R. L., CARROLL, J. A., DYER C.J. 2000, "Neuroendocrine response to stress" In MENCH, M. AND MOBERG, G.O., (eds) *Biology of Animal Stress*. Oxon: CAB International, p.43-76.

MATHIAS-MUNDY, E., McCORKLE, C., 1989, "Ethnoveterinary medicine: an annotated bibliography" *Bibliographies in Technology and Social Change* N.6. Iowa State University, Technology and Social Change Program, Ames.

MAXIMILIANO, R., 2002, *Utilização da técnica de fluorescência de raios X com microsonda (m-XRF) aplicada a amostras de interesse arqueológico*. Tese de D.Sc., Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

MAYER, H. K., LEFCOURT, A. M. 1987, "Failure of cortisol injected prior to milking to inhibit milk ejection in dairy cattle" *J. of Dairy Research*, v. 54, p. 173-177.

McBRIDE, S. D., CUDDOLFORD, D. 2001, "The putative welfare reducing effects of preventing equine stereotypic behaviour" *Anim. Welfare*. v. 10, p. 173-189.

McCORKLE, C., MATHIAS-MUNDY, E., 1992, "Ethnoveterinary medicine in Africa" *Africa International African Institute* v. 62, p. 59-93.

MEIJ, B. P., MOL, J. A. 2008, "Adrenocorticol function;" In. KANEKO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML (eds): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Sand Diego, Academic Press,v.1, p. 605-622.

MELCHART, D., LINDE, K., WORKU, F., *et al.* 1995, "Results of five randomized studies on the immunomodulatory activity of preparations of Echinacea" *J Altern Complement Med*. v. 1, p. 145-160.

MOBERG, G. P. 1987, “A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals” *J. of Anim. Sci.* v. 65, p. 1228-1235.

MONDELLO F., DE BERNARDIS F., GIROLAMO A., SALVATORE G., CASSONE A., 2003. “In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts” *J. Antimicrob. Chemother.* v. 51, p. 1223.

MONOGRAPH: Larch Arabinogalactan. *Altern. Med. Rev.* 2000, 5, 463-466.

MORAZZONI P, CRISTONI A, DI PIERRO F, AVANZINI C, RAVARINO D, STORNELLO S, ZUCCA M, MUSSO T, 2005, “In vitro and in vivo immune stimulating effects of a new standardized *Echinacea angustifolia* root extract (Polinacea™)” *Fitoterapia* v. 76, p. 401-411.

MOREIRA, S.; VIVES, A. E. S.; ZUCCHI, O. L. A. D.; DE JESUS, E. F. O.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; BRIENZA, S. M. B. 2006, “Analysis of beers from Brazil with synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence” *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* v. 270(1), p. 167–171.

MUNCK, A., GUYR, P. M., HOLBROOK, N. J. 1984, “Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions” *Endocr. Rev.* v. 5, p. 25-41.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Committee on Animal Nutrition, 1985. Nutrient Requirements of Sheep, Sixth Revised Edition, National Academy Press, Washington, D.C.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2008. Recognition and alleviation of distress in laboratory animals. Washington, D.C.: National Academy Press: 132p.

NEGRÃO, J. A., MARNET, P. G. 2003, “Cortisol, adrenalin, noradrenalin and oxytocin release and milk yield during first milkings in primiparous ewes” *Small Ruminants Res.* v. 47, p. 69-75.

NEGRÃO, J.A.; MARNET, P.G. 2006, "Milk yield, residual milk, oxytocin and cortisol release during machine milking in Gir, Gir x Holstein and Holstein cows" *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 46, p. 77-85.

NEIVA, J. N. M., TEIXEIRA, M., TURCO, S. H. N. *et al.* 2004, "Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santas Inês mantidos em confinamento na região litorânea do Nordeste do Brasil" *Revista Brasileira Zootecnia*, v. 33, p. 668-678.

NIEZGODA, J. *et al.* 1987, "Lack of adaptation to repeated emotional stress evoked by isolation of sheep from the flock" *Zentralbl Veterinarmed A.* v. 34, p. 734-739.

NOCKELS, C. F., DEBONIS, J., TORRENT, J. 1993 "Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources" *J. Anim. Sci.* v. 71, p. 2539.

NOGUEIRA, L. P., 2011, *Microtomografia Computadorizada e Microfluorescência de Raios X pó Luz Síncrotron para Avaliação dos Efeitos da Radiação em Microestruturas Ósseas de Ratos*, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

NORRIS, J. H. & CHAMBERLIN, W. E. 1929, "A chemical and histological investigation in Victoria of the blood of cattle and sheep" *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.* v. 285, sp.

NOWAK, R. *et al.* 2008, "Behaviour and the Welfare of the Sheep" In: DWYER, C. (Ed.). *The Welfare of Sheep. Edinburg: Springer Netherlands*, v. 1, p. 81-134.

OBACH, R. S. 2000, "Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression" *J Pharmacol Exp Ther* v. 294, p. 88-95.

PARROTT, R. F., HOUP, K. A., MISSION, B. H. 1988, "Modification of the responses of sheep to isolation stress by the use of mirror panels" *Applied Animal Behaviour Science*, v. 19, p. 331-338.

PIERONI, A. (Ed.), 1999a. Herbs, Humans and Animals/Erbe, uomini e bestie. Experiences Verlag, Cologne, Germany.

PIERONI, A., QUAVE, C., NEBEL, S., HEINRICH, M., 2002°, "Ethnopharmacy of the Arbëreshë in Lucania (southern Italy)" *Fitoterapia* v. 73, p. 217-241.

PIERONI, A., NEBEL, S., QUAVE, C., MÜNZ, H., HEINRICH, M., 2002b, "Ethnopharmacology of liakra: traditional weedy vegetables of the Arbëreshë of the Vulture area in Southern Italy" *Journal of Ethnopharmacology* v. 81, p. 165-185.

PIETARINEN, S. P.; WILLFOR, S. M.; AHOTUPA, M. O.; HEMMING, J. E.; HOLMBOM, B. R. 2006, "Knotwood and Bark Extracts: Strong Antioxidants from Waste Materials" *J. Wood Sci.*, v. 52, p. 436-444.

PINEIRO, M., PINEIRO, C., CARPINTERO, R., MORALES, J., CAMPBELL, F. M., ECKERSALL, D. P., TOUSSAINT, M. J. M., LAMPREAVE, F., 2007, "Characterization of the pig acute phase protein response to road transport" *The Vet. J.* v. 173, p. 669-674.

PRANGE, A., e H. SCHWENKE, 1989, "Sample Treatment for TXRF: Requirements And Prospects". *Adv. X-Ray Anal.* v. 32, p. 211.

PRANGE, A.; BÖDDEKER, H.; KRAMER, K., 1993, "Determination of Trace Elements in Riverwater using Total-Reflection X-Ray Fluorescence", *Spectrochimica Acta* v. 48, p. 207- 215.

PURI, A., SAXENA, R., SAXENA, R. P., SAXENA, K. C., SRIVASTAVA, V., TANDON, J. S. 1993, "Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*" *J Nat Prod* v, 56, p. 995-999.

RAYNAERT, R., DE PAEPE, M., PEETERS, G. 1976, “Influence of stress, age and sex on serum growth hormone and free fatty acids in cattle” *Horm. Metab. Res.* v. 8, p. 109-114.

REHMAN, J., DILLOW, J. M., CARTER, S. M., *et al.* 1999, “Increased production of antigen-specific immunoglobulins G and M following in vivo treatment with the medicinal plants *Echinacea angustifolia* and *Hydrastis canadensis*” *Immunol Lett.* v. 68, p. 391-395.

RININGER, J. A., KICKNER, S., CHIGURUPATI, P., MCLEAN, A., FRANCK, Z. 2000, “Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells” *J Leukoc Biol.* v. 68(4), p. 503-510.

ROCHFORT, S.; PARKER, A. J.; DUNSHEA, F. R. 2008, “Plant bioactives for ruminant health and productivity” *Phytochemistry*, v. 69, p. 299–322.

ROESLER, J., STEINMULLER, C., KIDERLEN, A., *et al.* 1991, “Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*” *Int J Immunopharmacol.* v. 13, p. 27-37.

SELYE, H. 1973, “The evolution of the stress concept” *American Scientist*, v. 61, p. 692-699.

STEWART, J. & HOLMAN, H. H. 1944, “The blood picture of pinning conditions in sheep” *J. Comp. Path. and Therap.* v. 54, p. 41.

SEVI, A., CASAMASSIMA, D., PULINA, G., PAZZONA A. 2009, “Factors of welfare reduction in dairy sheep and goats” *Ital J Anim Sci* v. 8, p. 81–101.

SGORLON S., STRADAIOLI G., ZANIN D., STEFANON B., 2006. Biochemical and molecular responses to antioxidant supplementation in sheep. *Small Rum. Res.* 64, 143-151.

SGORLON, S., COLITTI, M., FARINACCI, M., GASPARDO, B., STEFANON, B., 2007, “Activity of plant wastes on acute phase and immune response in heifers” Proc. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz (Austria), September 2-6. *Planta Medica.* v. 73, p. 838.

SHEN, Y. C., CHEN, C. F., CHIOU, W. F. 2000, “Suppression of rat neutrophil reactive oxygen species production and adhesion by the diterpenoid lactone andrographolide” *Planta Med* v. 66, p. 314-317.

SIMAMBUCO, S. M. 1993, *Emprego da fluorescência de raios X por dispersão de energia no estudo da dinâmica da vinhaça no solo.* Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. São Paulo, 153p.

SIMAMBUCO, S. M.; NASCIMENTO FILHO, V. F. 1994, “Quantitative analysis by energy dispersive X-ray fluorescence by transmission method applied to geological samples” *Scientia Agricola* v. 51, p. 197-206.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento.* Florianópolis: Editora da UFSC, 2003.

SORRELLS, S.F., SAPOLSKY, R. M. 2007, “An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS” *Brain Behav Immun.* v. 21, p. 259–272.

STEFANON, B., COLITTI, M., GIANFRANCO, G., KNIGHT, C. H., WILDE, C. J. 2002, “Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals” *J. of Dairy Research.* v. 69, p. 37-52.

STEFANON, B., SGORLON, S., DE MORO G., ASQUIN E., 2009, “Action of larch bark in the regulation of cortisol induced stress in sheep” *Ital.J.Anim.Sci.* v. 8, p. 162-164.

STEINMULLER, C., ROESLER, J., GROTTTRUP, E., *et al.* 1993, “Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*” *Int J Immunopharmacol.* v. 15, p. 605-614.

STRANDELL, J., NEIL, A., CARLIN, G. 2004, “An approach to the in vitro evaluation of potential for cytochrome P450 enzyme inhibition from herbals and other natural remedies” *Phytomedicine* v. 11, p. 98-104.

SUN, L. Z., CURRIER, N. L., MILLER, S. C. 1999, “The American coneflower: a prophylactic role involving nonspecific immunity” *J Altern Complement Med.* v. 5, p. 437-446.

TAPSELL, L. C., HEMPHILL, I., COBIAC, L., PATCH, C. S., SULLIVAN, D. R., FENECH, M., ROODENRYS, S., KEOGH, J. B., CLIFTON, P. M., WILLIAMS, P. G., FAZIO, V. A., INGE, K. E. 2006, “Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future” *Med J Aust* v. 21, p. S4-24.

TIAN, S. A., CHANG, C. J., CHIANG, C. C., PEH, H. C., HUANG, M. C., LEE, J. W., ZHAO, X. 2005, “Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactation goats” *Canadian Journal of Vet. Res.* v. 69, p. 39-45.

UNDERWOOD, E. J. & SUTTLE, N. F. (2001) *The mineral nutrition of livestock*, 3rd Edition, CAB International.

VAN-ADRICHEM, P. W. M., VOGT, J. E. 1993, “The effect of isolation and separation on the metabolism of sheep” *Livestock Production Science*, v. 33, p. 151-159.

VIEGI, L., BIOLI, A., VANGELISTI, R., CELA RENZONI, G., 1999, “Prima indagine sulle piante utilizzate in medicina veterinaria popolare in alcune località dell’alta Val di Cecina” *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali*, Memorie, Serie B v. 106, p. 1–10.

VIEGI, L., PIERONI, A., 2000a, “The state of art of the ethnoveterinary studies in Italy: a review”. Proceedings of the 4ème Colloque Européen d’Ethnopharmacologie “Des sources du savoir aux médicaments du futur”, Metz, 11–13 May, 2000, No. 40.

VIEGI, L., PIERONI, A., 2000b, “Una banca dati di piante usate per la medicina veterinaria popolare in Italia” In: Atti 95° Congresso Società Botanica Italiana “Problematiche di Biologia Vegetale in Ambiente Mediterraneo”, Messina, 28–30 September, 2000, p. 101.

VILLAREAL QUINTANILLA, J.A., 2001, “Etnotaxonomia de las Plantas Utiles Del Noreste del Mexico” In: Third International Congress of Ethnobotany, Etnobotanica Napoli 2001—Italy, September 22–30, Abstracts. Botanical Garden and Department of Plant Biology University of Naples Federico II, Italy. *Delpinoa* n.s. 43, p. 81.

WOBRAUSCHEK, P.; AIGINGER, H. 1975, “Total reflection fluorescence spectrometric determination of elements in ng amounts” *Analytical Chemistry* v. 47, p. 852-855.

WOBRAUSCHEK, P. 1998, “Total reflection X-ray fluorescence spectrometric determination of trace elements in femtogram region: a survey” *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy* v. 13, p. 333-337.

YONEDA, Y. 1963, “Anomalous surface reflection of X-rays” *Physical Review*, v.131, p. 2010-2013.

YONEDA, Y., HORIUCHI, T. 1971, “Optical flats for use in X-ray spectrochemical microanalysis” *Review of Scientific Instruments*, v. 42, p. 1069-1070.

ZUCCHI, O. L. A. D. 1994, *Caracterização qualitativa e quantitativa de elementos, pela técnica de fluorescência de raios X, em suplementos minerais para animais*. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 175p.