

**ANTONIO DE OLIVEIRA LOBÃO**

Médico Veterinário pela Escola de Veterinária  
da Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte

**DISTRIBUIÇÃO DE FÓSFORO RADIOATIVO ( $^{32}\text{P}$ ) EM TECIDOS DE OVINOS**

Orientador: *Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo*

Dissertação apresentada à Escola Superior  
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da  
Universidade de São Paulo, para obtenção  
do título de Mestre.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - BRASIL

1 9 7 3

À memória de meu pai,

SEBASTIÃO

À minha mãe,

DORCELINA

À minha esposa,

VERA MARIA

Aos meus filhos,

ANTONIO CARLOS

ANGELA

ROBERTO e

TERESA CRISTINA

D E D I C O

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pelo incentivo durante meu curso e dedicada orientação na execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Aristeu Mendes Peixoto, pelo estímulo, sugestões e valiosa colaboração no sacrifício dos primeiros animais e coleta de fragmentos de tecidos.

Ao Prof. Dr. Admar Cervelini - Diretor do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelas facilidades de trabalho naquela Instituição de pesquisas.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear, pela bolsa de estudos (1971) que permitiu o meu ingresso na pesquisa com técnicas nucleares, além do auxílio financeiro para execução do presente trabalho, sem o qual não poderia realizá-lo.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas pela bolsa de Pesquisador Assistente (1972 e 1973).

Ao Instituto de Zootecnia, pela minha liberação para frequência ao Curso de Pós-Graduação e pelo fornecimento dos animais.

Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Virgílio F. Nascimento Filho pelas sugestões e colaboração durante o preparo das amostras, detecção da radioatividade e cálculos.

Ao Prof. Dr. Max Lázaro Vieira Bose e Med. Vet. José Antonio Jerez pelo auxílio na coleta de fragmentos de tecidos e pesagens.

Ao Prof. Dr. Décio Barbin pela orientação nas análises estatísticas.

Aos Srs. Lineu Domingo Mazzonetto Delfini, José Osório Bertoli, Claudio Berreta e Marco Antonio Castilho, pelo auxílio nos Laboratórios.

À Bibliotecária Srta. Maria Helena Bursi, da Divisão de Nutrição Animal e Pastagens do Instituto de Zootecnia - Nova Odessa - pela organização das Referências bibliográficas.

Ao Sr. Evilásio de Camargo e demais funcionários do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelo auxílio no manejo dos animais e eliminação do resíduo radioativo.

Aos Srs. funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela colaboração quando solicitados.

Ao Sr. Milton Ribeiro pelo esmero na datilografia e confecção dos volumes.

E a todos aqueles que concorreram para o bom andamento deste trabalho.

# Í N D I C E

	pág.
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA .....	3
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1. Local .....	8
3.2. Material biológico .....	9
3.3. Equipamentos .....	9
3.3.1. Gaiolas de metabolismo .....	9
3.3.2. Protetor vertical contra radiações .	10
3.3.3. Funil de borracha para coleta de uri na .....	11
3.3.4. Mesa para contenção e necrópsia.....	13
3.4. Delineamento experimental .....	14
3.5. Períodos experimentais .....	15
3.5.1. Período preliminar .....	16
3.5.2. Período de adaptação .....	16
3.5.3. Período experimental .....	17
3.6. Aplicação endovenosa .....	18
3.7. Solução radioativa .....	19
3.8. Obtenção das amostras .....	19
3.9. Preparo das amostras para detecção da radio atividade .....	24
3.10. Detecção da radioatividade .....	24
3.11. Cálculos .....	25
3.12. Análises estatísticas .....	26
3.13. Eliminação do resíduo radioativo .....	26
4 - RESULTADOS .....	27
4.1. Eficiência de contagem por tecido .....	27
4.2. Teores séricos de fósforo antes da aplica- ção da solução radioativa .....	28
4.3. Retenção do fósforo radioativo( <sup>32</sup> P) em tec dos dos animais.....	29
5 - DISCUSSÃO .....	55
5.1. Equipamento e Metodologia .....	55
5.2. Teores séricos de fósforo antes da aplica- ção da solução radioativa.....	56

	pág.
5.3. Retenção do fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ em tecidos dos animais.....	56
6 - CONCLUSÕES .....	59
7 - RESUMO .....	60
8 - SUMMARY .....	62
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64



## 1 - I N T R O D U Ç Ã O

Toda a forma de vida na natureza necessita de elementos minerais para que o processo vital se torne normal; esses elementos, cujas funções vêm sendo ativamente estudadas, são encontrados isoladamente ou formando compostos específicos dentro do sistema e apresentam, na maioria das vezes, uma estreita relação funcional entre si. É o caso do fósforo e do cálcio, cuja principal função no organismo animal é dar forma e rigidez aos ossos. Estes, além de servirem para a inserção e proteção dos tecidos moles, funcionam como reservatórios de tais minerais, que são prontamente mobilizados quando no organismo ocorre uma deficiência dietética ou metabólica.

Existe uma predominância da forma lábil destes elementos nos reservatórios, e o intercâmbio entre eles e os íons existentes nos líquidos contíguos aos ossos é constante; conseqüentemente há uma regulação dos níveis de íons no plasma sanguíneo e outras partes do corpo. Além de exercer as funções plástica e reguladora, o fósforo participa do equilíbrio eletrolítico na forma de fosfatos solúveis primários e secundários, formando os sistemas tampões.

Supondo-se que cada fenômeno fisiológico envolve perda e ganho de energia, pela formação ou ruptura de fosfatos, o fósforo intervém nas reações metabólicas comprometidas na transferência de tal energia. Como com

ponente das moléculas proteicas que formam os tecidos moles, apresenta-se sempre na forma de radicais fosfóricos e é um elemento invariável do ácido ribonucleico, composto vital para síntese proteica.

O estudo da composição do corpo e distribuição de minerais pelos tecidos dos animais é de grande valia para que se estabeleçam as quantidades fisiológicas normais dos elementos, permitindo, desse modo, um melhor diagnóstico do estado nutritivo dos animais. Além disso, pode-se conhecer as influências da idade, níveis dietéticos, enfermidades e contaminação ambiente por elementos cuja função fisiológica, se existe, não foi estabelecida até o momento. Esses estudos são grandemente facilitados quando se usa fósforo radioativo. É o que foi feito no presente trabalho cujo objetivo foi conhecer a "porcentagem de dose" do fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ ) em tecidos de carneiros de duas diferentes idades, submetidos à injeção endovenosa e sacrificados em intervalos de 8, 16 e 24 horas após à injeção.



## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

O nível de fósforo inorgânico no sangue é um critério adotado para diagnóstico de deficiência do elemento nos animais (AMMERMAN, et alii, 1957; PRESTON & PFANDER, 1964; UNDERWOOD, 1969). Segundo UNDERWOOD (1969) o soro sanguíneo dos animais domésticos contém de 4,5 a 6,5 mg %, havendo flutuações variáveis de 2 a 3 mg %, podendo dentro da mesma espécie, encontrar-se níveis mais elevados nos jovens quando comparados com os adultos.

O nível de fósforo no sangue está diretamente relacionado com o nível dietético (PRESTON & PFANDER, 1964; TOMAS, et alii, 1967). Sabe-se, também, pelos trabalhos de vários autores e entre eles SMITH, et alii (1955) e TOMAS, et alii (1967), que uma grande quantidade de fósforo inorgânico encontrado no rume procede da saliva, havendo uma correlação direta entre o nível do elemento na saliva e no sangue (LUEKER & LOFGREEN, 1961; TOMAS, et alii, 1967).

Poucos são os trabalhos executados com a finalidade de estudar a retenção de fósforo radioativo em tecidos de animais.

COHN & GREENBERG (1938) estudaram o metabolismo do  $^{32}\text{P}$  em ratos. Utilizaram animais de duas diferentes idades que após um jejum de 12 horas foram submetidos a aplicação de  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  por duas vias: intraperitoneal e gástrica. Após o período experimental que va

riou de 1 a 150 horas os animais foram anestesiados e sacrificados, procedendo-se a coleta de fezes, urina e tecidos. As amostras foram incineradas à 500°C, tratadas com ácido clorídrico e a radioatividade detectada com o auxílio de um eletroscópio. Puderam, assim, os autores estudar a absorção, distribuição em tecidos e excreção do  $^{32}\text{P}$ . A retenção decresceu na seguinte ordem: ossos, músculos, fígado, estômago e intestinos (repletos), sangue, rins, coração, pulmão e cérebro, em porcentagem de radioatividade aplicada.

SMITH et alii (1951) trabalhando com 3 grupos de suínos de diferentes idades (2, 4 e 8 meses) num total de 12 animais, aplicaram uma solução de fosfato de sódio marcado com  $^{32}\text{P}$ . Decorridas algumas horas (de 1 a 48), sacrificaram os animais colhendo fragmentos de órgãos que após secos e queimados, foram tratados com ácido clorídrico diluído e contados em Geiger Müller. A análise do fósforo estável também foi efetuada a fim de se estabelecer a atividade específica em cada órgão. Os autores concluíram que a incorporação do fósforo no fígado e no rim se dá rapidamente, ao contrário do que ocorre no cérebro. Em média a incorporação decresceu na seguinte ordem: biles, fígado, rim, timo, nódulo linfático, baço, língua, músculo, pulmão, estômago (músculo liso), gastrocnemius, bíceps e cérebro. Concluíram também que existe um considerável efeito da idade sobre a incorporação do fósforo pelos diferentes tecidos.

SHIRLEY, et alii (1951) a fim de conhecerem a incorporação de fósforo proveniente de adubo em tecidos de animais, forneceram a um novilho com aproximadamente 210 kg, durante 18 horas, mistura de festuca e aveia colhidas em terreno adubado com superfosfato contendo  $^{32}\text{P}$ . Efetuaram 3 coletas de fezes e urina em intervalos de 12 horas. Três horas após a última coleta, o animal foi sacrificado e vários segmentos do tubo digestivo e principais órgãos foram colhidos. O material foi tra

tado com ácido nítrico e posteriormente contado em contador Geiger Müller. Os autores encontraram 45% do radioisótopo da forragem no trato digestivo, sendo que o conteúdo do rúmen e retículo apresentava 36,3%. As fezes e urina continham 1,34% e 1,54% respectivamente. Os valores em porcentagem de dose decresceram, para os tecidos moles, na seguinte ordem: fígado, pulmão, rim, baço, coração, pâncreas, bÍles, parótida, adrenal, bexiga e cérebro. Para os ossos: vértebra, valor correspondente ao do coração, costela, ao da parótida; e o fêmur, porcentagem acima da adrenal. Após tais observações os autores obtiveram a indicação de que a planta não somente utiliza o fertilizante recebido, mas o contém em forma tal que é rapidamente assimilado por um animal em crescimento.

SMITH et alii (1952) utilizando 15 carneiros de várias raças e divididos em 3 grupos, de acordo com as idades que eram de 1, 4 e 10 meses, aplicaram por via venosa o  $^{32}\text{P}$  na forma de fosfato de sódio. Os animais foram sacrificados e submetidos à sangria total em diferentes intervalos de tempo após a aplicação. O método de preparação das amostras bem como a detecção da atividade foi a mesma usada anteriormente pelos autores. Em média esses encontraram uma incorporação decrescendo na seguinte ordem: bÍles, tÍmo, fígado, língua, rim, coração, nódulo linfático, baço, pulmão, parede do rúmen, testículos, bíceps, gastrocnemius e cérebro, similar a encontrada nos suínos, embora tenha ocorrido maior variação na posição dos tecidos na série de diferentes idades. No fígado dos animais novos a atividade era muito maior logo após as injeções. Comparando os dados entre ensaios levados a efeito com suínos e ovinos, os autores observaram que o efeito da idade em ovinos é menos pronunciado do que em suínos, quando se estuda a incorporação do fósforo em tecidos.

ABOU-HUSSEIN, et alii (1968) trabalharam com 6 carneiros de um ano de idade, aos quais foram forneci

das dietas com diferentes níveis de fósforo por um período de 2 meses. Decorrido esse tempo, os animais receberam, por via venosa, 500  $\mu$ ci de  $^{32}\text{P}$  na forma de fosfato de sódio. Após 8 dias os animais foram sacrificados e a atividade detectada nas fezes, urina, sangue e diferentes tecidos. A ordem de retenção do  $^{32}\text{P}$  nos tecidos foi a seguinte: fígado, língua, rins, coração, baço, pulmão, músculo e cérebro.

ABOU-HUSSEIN et alii (1971) estudando o metabolismo do  $^{32}\text{P}$  em aves com dietas de diferentes níveis de fósforo concluíram que a ordem de distribuição do elemento entre os tecidos não é influenciado pelo seu nível dietético, nem pela via de administração do  $^{32}\text{P}$  (intramuscular ou intraperitoneal). Entre os tecidos moles a ordem obtida foi: biles, fígado, rins, coração, baço, testículos, gastrocnemius, músculo peitoral. O cérebro foi o que menos reteve o elemento. A retenção do fósforo pelos ossos é acentuada mais tardiamente após a aplicação. Confirmando outros trabalhos, os autores obtiveram maiores valores de fixação em animais que foram submetidos a tratamentos com rações de baixos níveis de fósforo.

Vários fatores influenciam a retenção de minerais pelo corpo dos animais.

Rosenfeld & Beath (1952) (in ABOU-HUSSEIN, et alii 1968) acreditam que a incorporação de fósforo pelo tecido não depende da quantidade do elemento no tecido, mas sim da permeabilidade da célula para o íon fósforo.

HANSARD & PLUMLEE (1954) trabalhando com ratos verificaram que a absorção e retenção do cálcio aumentou nos animais que apresentavam baixo armazenamento do elemento no corpo, mas o mesmo não ocorreu com o fósforo radioativo que apresentou menor retenção.

HANSARD et alii (1954) trabalhando com bovinos

nos de diferentes idades observaram que a digestibilidade verdadeira do cálcio é mais elevada nos animais mais jovens; por outro lado GARCES & EVANS (1971) não encontraram diferença significativa devido à idade de bovinos na absorção e retenção do magnésio.

Para a aplicação de radioisótopos em animais destinados a ensaios de metabolismo, um equipamento especial deve ser adotado.

HANSARD (1951) estudando os vários tipos de gaiolas para trabalhos de balanço nutricional, concluiu que nos ensaios em que se emprega material radioativo, deve-se dar preferência a um equipamento que satisfaça as seguintes exigências: ser facilmente ajustável para o tamanho e sexo do animal a ser usado; restrinja os movimentos do mesmo mantendo-o confortavelmente na posição desejada; facilite o fornecimento contínuo de alimentos evitando a presença constante do tratador; dificulte o contato dos alimentos com os excrementos; dê fácil acesso para aplicação de injeções, ministração de produtos por via oral e coleta de amostras; permita a coleta de fezes e urina e finalmente que seja econômico e de fácil construção, pois poderá ser destruído total ou parcialmente no caso de intensa contaminação.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - (ESALQ) e no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em Piracicaba, Estado de São Paulo, em duas diferentes fases: dezembro de 1971 a janeiro de 1972 e dezembro de 1972 a janeiro de 1973. O intervalo de um ano prendeu-se à disponibilidade de animais em condições experimentais.

Para manutenção dos animais na fase experimental, sacrifício, necrópsias e coleta de material, utilizou-se de uma pequena sala com dimensões aproximada de 2,90m x 2,50m e que teve seu piso todo forrado com lâmina de plástico transparente e na qual colocou-se uma gaiola de metabolismo, mesa de necrópsias e mais três pequenas mesas para os instrumentos de aplicação da solução radioativa, necrópsias, e um contador Geiger Müller que ali permaneceu durante toda a fase experimental com a finalidade de detectar uma possível contaminação do operador e objetos.

O laboratório utilizado para preparo das amostras foi o de Bioquímica de Plantas do CENA, próprio para trabalhos com material radioativo.

### 3.2. Material biológico

Foram utilizados 12 carneiros, machos, não castrados, da raça Corriedale nascidos e criados no Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetininga, Estado de São Paulo. Esses animais foram mantidos em regime exclusivo de pasto de capim pangola (Digitaria decumbens Stent) recebendo, ainda, mistura de minerais e farinha de ossos à vontade. Os animais foram vacinados contra a febre aftosa e receberam anti-helmínticos.

### 3.3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente trabalho consistiam de gaiolas de metabolismo, protetor vertical contra radiações, funil de borracha para coleta de urina e mesa para contenção e necrópsias.

#### 3.3.1. Gaiolas de metabolismo

As gaiolas de metabolismo utilizadas foram semelhantes as descritas por HANSARD (1951), com pequenas modificações. Construídas totalmente de madeira tiveram seus pisos forrados com uma lâmina de plástico branco e transparente, a fim de evitar que os excrementos entrassem em contato direto com a gaiola ou caíssem ao chão. Para confecção do coletor de fezes, empregou-se folha de latão. (Figura 1)



Fig. 1 - Gaiola de metabolismo com coletor de fezes.

### 3.3.2. Protetor vertical contra radiações

Com a finalidade de proteger o operador durante a aplicação da solução radioativa no animal, construiu-se um protetor contra radiações formado de um suporte de madeira com altura de 1,30 m e largura de 0,56m, no qual encaixava-se facilmente uma placa de acrílico de 0,83 m x 0,48 m x 0,01 m. (Figura 2).



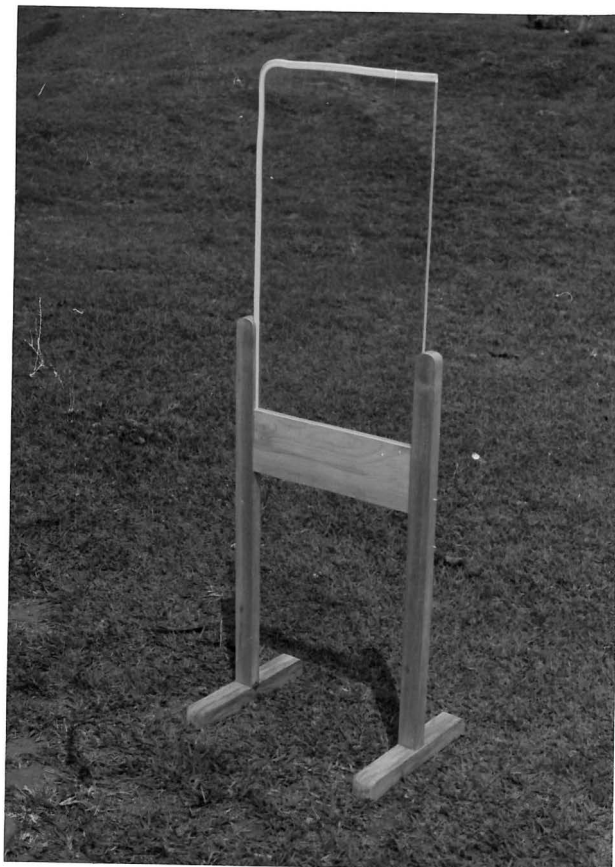


Fig. 2 - Protetor vertical contra radiações

### 3.3.3. Funil de borracha para coleta de urina

Na confecção do funil empregou-se um retângulo de 39 x 20 cm de lâmina de borracha de 5/10 mm de espessura, 50 cm de fio de cobre encapado de número 14, 1,20 m de tubo latex de 0,5 cm de diâmetro, 1/3 de uma bisnaga plástica utilizada em inseminação artificial e cola especial para borracha\*. A lâmina de borracha foi cortada em forma de meio círculo o qual tinha 39 cm de diâmetro. A borda curva foi recortada em 9 pontas equidistantes e com 5 cm de altura. Na metade da borda reta

\* Marca comercial (Blascoplast)

cortou-se um triângulo isóceles de 2,5 cm de base por 2 cm de lado (Figura 3). Tais procedimentos permitiram um melhor acabamento da peça. Em seguida, as duas metades da borda reta foram coladas dando-lhe o formato de um funil. O fio de cobre, em forma de arco, foi adaptado externamente à parte mais ampla do funil, utilizando-se para tal as pontas existentes neste local, que foram coladas ao corpo deste.

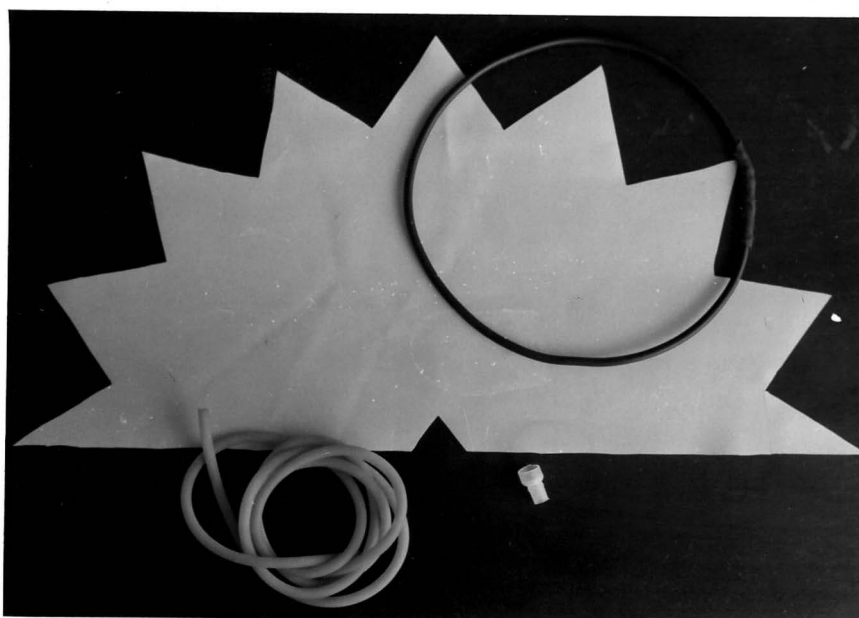


Fig. 3 - Partes integrantes do funil de borracha

Em seu bico adaptou-se o pedaço de bisnaga plástica e que serviu de conexão entre o funil e o tubo de látex. A fim de melhor adaptar o funil ao abdomen do animal, fez-se uma pequena depressão no arco, para que não houvesse compressão deste no pênis do carneiro. Posteriormente amarrou-se lateralmente à depressão acima citada, dois pedaços de barbante que serviram para manter o funil preso ao abdomen do animal. (Figura 4)



Fig. 4 - Detalhes do funil de borracha para coleta de urina

#### 3.3.4. Mesa para contenção e necrópsia

A mesa para contenção dos animais foi toda construída de madeira, possuindo um acessório que era facilmente adaptado e movimentado no sentido horizontal e vertical de acordo com as necessidades e cuja finalidade foi proteger o operador da radioatividade. A parte superior da mesa era formada pela junção, em ângulo de 90°, de duas tábuas (1,10 m x 0,30 m x 0,02 m), com altura de 1,00 m. O protetor de radiações, de forma retangular (0,86 m x 0,65 m) tinha em seu centro, um visor de placa de acrílico (0,43 x 0,26 x 0,01 m) (Figura 5).



Fig. 5 - Mesa para contenção e necrópsia com protetor contra radiações

#### 3.4. Delineamento experimental

Seis carneiros de cada fase foram pesados e a grupados aos pares e constituíram os blocos (Quadro I). A retenção de  $^{32}\text{P}$  em tecidos, detectada 8, 16 e 24 horas a pós a injeção endovenosa da solução radioativa, constituiu os tratamentos.

QUADRO I - Distribuição dos animais por tratamento, nascimentos, pesos, idades e radioatividade aplicada.

Primeira fase						
Tratamento	Animal número	Nascimento	Peso (kg)		Idade Dias	Radioatividade de $\mu\text{Ci}$
			Dia do sorteio	Dia do experimento		
8 horas	617	06/09/72	11,5	12,0	105	500,0
	619	06/09/72	11,5	12,5	107	453,7
16 horas	621	07/09/72	13,0	12,0	111	356,1
	600	02/09/72	11,5	11,0	118	323,2
24 horas	618	06/09/72	10,0	11,5	120	241,6
	645	11/09/72	10,5	11,5	121	225,9
Segunda fase						
8 horas	177	22/06/71	17,2	16,8	183	500,0
	168	13/06/71	17,5	19,2	193	477,5
16 horas	165	10/06/71	16,7	18,5	216	181,1
	175	13/06/71	14,8	18,5	215	164,0
24 horas	179	22/06/71	14,1	18,5	217	96,2
	160	09/06/71	12,1	15,8	222	87,5

### 3.5. Períodos experimentais

Os períodos experimentais foram divididos em preliminar, adaptação e experimental propriamente dito. Os alimentos, fornecidos sempre à vontade, foram os mesmos nos três períodos.

### 3.5.1. Período preliminar

Os animais utilizados na primeira fase foram mantidos em baias durante 8 a 45 dias antes do experimento, e os da segunda fase durante 54 a 76 dias. A diferença em número de dias de manutenção foi devida a preparação do local e do material a ser usado, mais demorada na segunda fase experimental.

Os animais receberam, à vontade, água, forragens, minerais e ração concentrada comercial. As forragens eram compostas de capim colômbio (Panicum maximum, Jacq. var.) e capim angola (Panicum purpurascens Raddi). Os minerais foram fornecidos em duas fórmulas, seguindo-se as recomendações de VIANA (1965)

A - Farinha de ossos autoclavados	80 Kg
Cloreto de sódio.....	20 Kg
B - Cloreto de sódio.....	10 Kg
Sulfato de cobalto.....	4 g
Sulfato de cobre.....	25 g

As análises bromatológicas das rações comerciais revelaram os seguintes resultados:

COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES								
NUTRIENTES NA MATÉRIA ORIGINAL								
Fases	MS	P.B.	F.B.	E.E.	M.M.	E.N.N.	Ca	P
1ª	87,21	10,97	11,56	4,02	9,01	51,65	1,73	0,72
2ª	78,21	15,91	17,39	1,13	8,12	57,45	2,10	0,36

### 3.5.2. Período de Adaptação

Sete dias antes da aplicação da solução radio

ativa, cada animal foi colocado na gaiola individual de metabolismo com o funil de borracha preso ao seu abdomen.

### 3.5.3. Período experimental

No dia anterior ao da aplicação da injeção da solução radioativa, realizou-se o corte da lã do pescoço e dos membros posteriores à altura das jugulares e safenas externas, respectivamente. Retirou-se da jugular direita, aproximadamente 40 ml de sangue que permaneceu em repouso por uma noite a fim de se obter o soro sanguíneo no qual dosou-se, posteriormente, o fósforo, pelo método de FISKE e SUBBAROW (1925).

No dia do experimento o animal, em jejum de 13 horas, foi pesado com o auxílio de uma balança do tipo de vara e em seguida colocado sobre a mesa apropriada, tendo seus membros, com exceção de sua perna esquerda que ficou livre para que se fizesse a aplicação da injeção, sendo amarrados na própria mesa totalmente forrada de plástico e papéis. (Figura 6)



Fig. 6 - Carneiro amarrado para aplicação da injeção endovenosa

### 3.6. Aplicação endovenosa

Utilizando-se de uma seringa de vidro anteriormente lubrificada com silicone e com capacidade para 1 ml, injetou-se a solução endovenosamente na veia safena externa com o auxílio de uma agulha calibre 25 x 7. Durante a aplicação o operador permanecia com o corpo protegido pela placa de acrílico (Figura 7).



Fig. 7 - Aplicação da solução radioativa por via endovenosa

Posteriormente, o animal foi colocado na gaiola de metabolismo, onde permaneceu até a hora da retirada de material para análise. Durante esse período efetuou-se a coleta total de fezes e urina (Figura 8). Os alimentos foram fornecidos à vontade.





Fig. 8 - Coleta de fezes e urina

### 3.7. Solução radioativa

A solução radioativa empregada foi produzida pelo Instituto de Energia Atômica de São Paulo e consistiu de  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ . A diluição da solução foi feita calculando-se o decaimento do  $^{32}\text{P}$ , e no dia da primeira injeção 1 ml teria 500  $\mu\text{ci}$  de atividade. A solução utilizada para se efetuar a diluição foi preparada com 0,01 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 100 ml de água destilada.

### 3.8. Obtenção das amostras

Decorrido o tempo experimental, o animal recebeu uma injeção de 1,0 ml de solução de Cloridrato de 2 (2,6 xilidino - 5,6 dihidro - 4h-1,3 tiazina (cloridrato de xilazina)\* aplicado nos músculos posteriores da perna esquerda.

Após o início dos sintomas de anestesia: dispnéia, sialorreia e incoordenação, o animal, tendo sua cabeça protegida por um saco plástico, para evitar contaminação de objetos pela saliva, foi colocado e amarrado na mesa de contenção e necrópsias (Figura 9).



Fig. 9 - Animal anestesiado amarrado a mesa de contenção e necrópsia .

---

\* Nome comercial: ROMPUN - Gentilmente oferecido pela Aliança Comercial de Anilinas - Bayer.

Quando o animal encontrava-se na fase cirúrgica, já imobilizado, foi sacrificado por sangria total, por corte transversal da jugular e carótida esquerda. A fim de facilitar a saída de todo o sangue, a extremidade da mesa que correspondia a parte posterior do animal, e ra levantada do solo aproximadamente 15 cm.

Durante a sangria fez-se a coleta de sangue diretamente da jugular. Foram recolhidos 50 ml em 2 frascos estéreis um dos quais contendo 0,2 ml de heparina para receber o sangue total, e o outro destinado ao sangue que se coagularia para retirada do soro sanguíneo 12 horas após.

Os fragmentos dos órgãos foram recolhidos em cadinhos de porcelana com capacidade de 30 ml e que haviam sido mantidos na estufa a 100° C por 12 horas, pesados e guardados em dessecadores até a hora do uso.

Na retirada de material para análise, procurou-se fazer as tomadas sempre da mesma parte dos órgãos em todos os animais e, com exceção do animal nº 177, foram tomadas duas amostras de cada órgão. Durante essa operação, o operador permanecia atrás do protetor contra radiações e que era um acessório da mesa. (Figura 10).



Fig. 10 - Obtenção de amostras

Utilizando-se de pinças de dissecção, tesouras, bisturís e serra, recolheram-se fragmentos dos seguintes órgãos: língua, cérebro, coração, diafragma, bado, rim, fígado e ossos. Os ossos escolhidos foram os metatarsos que, após livres de tecidos moles, foram serrados a 1 cm de sua extremidade proximal, retirando-se uma secção de 1 cm. Efetuou-se a limpeza de sua parte medular. Sempre após a tomada de amostra de um determinado órgão, os instrumentos de trabalho eram submetidos a lavagem com líquido carregador e água destilada.

A medida em que se fazia a retirada dos fragmentos, um auxiliar efetuava a pesagem dos cadinhos contendo a amostra do tecido.

As áreas escolhidas para tomadas de amostras de cada órgão são apresentadas no Quadro II.

QUADRO II - Áreas escolhidas para obtenção de amostras de órgãos

Órgão	Ordem da amostra	- Área
FÍGADO	1ª	- Borda direita - próximo a fí <span style="text-decoration: underline">s</span> ura umbilical
	2ª	- Idem (parte contígua)
RIM	1ª	- Extremidade anterior do rim direito
	2ª	- Extremidade anterior do rim esquerdo
BAÇO	1ª	- Extremidade ventral
	2ª	- Parte central
CORÇÃO	1ª	- Vértice
	2ª	- Parte contígua ao vértice (ven <span style="text-decoration: underline">tr</span> ículo esquerdo)
LÍNGUA	1ª	- Ponta (3 cm)
	2ª	- Continuação da parte móvel (3 cm)
OSSO	1ª	- Metatarso direito
	2ª	- Metatarso esquerdo
DIAFRAGMA	1ª	- Porção costal direita
	2ª	- Porção costal esquerda
CÉREBRO	1ª	- Hemisfério cerebral direito
	2ª	- Hemisfério cerebral esquerdo

### 3.9. Preparo das amostras para detecção da radioatividade

A fim de se conseguir uma secagem mais rápida e total das amostras, o material foi picado em pequenos pedaços e levados à estufa a 100° C aí permanecendo até a obtenção de peso constante, geralmente após 36 horas.

Posteriormente as amostras eram moídas em gral de porcelana e colocadas na estufa a 100° C durante uma hora. Após o resfriamento em dessecador, pesou-se 0,5 g de cada amostra colocando-se em cadinhos que foram submetidos à temperatura de 500° C por um período de 24 horas. Durante a incineração, tomou-se o cuidado de evitar a perda de material por fervura, assim a temperatura foi sendo elevada lenta e progressivamente.

Para digestão da cinza, preferiu-se o método de Lindner & Harley (in COMAR, 1955). A cinza foi tratada com 0,5 ml de água destilada e 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, procedendo-se em seguida, um ligeiro aquecimento até dissolução da cinza. A fim de clarear a solução, adicionou-se 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volumes) a cada cadinho que era novamente aquecido ligeiramente.

A solução foi filtrada sob vácuo diretamente nas ampolas do cintilador e em seguida completou-se o peso das ampolas para 15 g com água destilada.

### 3.10. Detecção da radioatividade

A atividade da amostra foi determinada através da radiação Cerenkov (HABERER, 1966), e para tal utilizou-se um contador por cintilação líquida da "Nuclear Chicago Corporation", série 720, U.S.A.

A fim de se obter maior precisão na determinação da radioatividade, empregou-se a técnica da padronização interna (PARNETIER & TEN HAAF, 1969) e adotada em nosso meio por ALTERMAN (1971).

A atividade de cada amostra foi determinada por 10 minutos ou pelo tempo suficiente para que registrasse 20.000 contagens. Logo após adicionava-se uma alíquota (60 micromililitro) de uma solução radioativa de  $^{32}\text{P}$  cuja atividade era conhecida.

Uma segunda detecção ou recontagem era feita por 2 minutos e assim pode-se determinar a eficiência de cada contagem de acordo com a seguinte equação:

$$E = \frac{C' - \frac{C}{f}}{D_a}, \text{ onde:}$$

E = Eficiência de contagem em porcentagem;

C = Contagem da amostra em impulsos por minuto;

C' = Contagem da amostra mais contagem da alíquota em impulsos por minuto;

f = Fator de correção do tempo decorrido entre contagem e recontagem.

D<sub>a</sub> = Atividade da alíquota adicionada, em desintegração por minuto.

### 3.11. Cálculos

Os cálculos foram feitos em um computador de mesa tipo "Olivetti Programma 101".

Utilizando-se 7 amostras de cada tecido, determinou-se a eficiência de contagem por tecido e o respectivo erro padrão. O resultado, expresso em porcentagem, foi utilizado para correção das contagens das amostras, que

posteriormente foram transformadas em desintegrações por minuto.

Transportando a atividade aplicada ao animal até o dia de sua morte e levando-se em consideração o decaimento do  $^{32}\text{P}$ , calculou-se a porcentagem da dose de acordo com equação citada por CHASE & RABINOWITZ (1968):

$$\% \text{ de dose/g de M.S.} = \frac{A' \cdot 100}{A \cdot x}, \text{ onde:}$$

A' = Atividade detectada em desintegrações por minuto;

A = Atividade aplicada em desintegrações por minuto;

x = Massa da amostra em gramas;

### 3.12. Análises estatísticas

As análises de variância dos dados obtidos foram desenvolvidas de acordo com método descrito por GOMES (1963) para delineamento em blocos ao acaso. Para comparação entre tecidos, aplicou-se o teste de Tukey e para tempos de aplicação, desdobrou-se os graus de liberdade para as componentes linear e quadrática.

### 3.13. Eliminação do resíduo radioativo

Os excrementos e as carcaças dos animais, o resto dos alimentos e das amostras foram colocados em sacos de plástico e enterrados em covas individuais de aproximadamente 1,50 m de profundidade por 1,20 m de comprimento e 1,00 m. de largura.



#### 4 - RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados dizem respeito a eficiência de contagem por tecido, teores séricos de fósforo antes da aplicação da solução radioativa e retenção do fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ ) em tecidos dos animais.

##### 4.1. Eficiência de contagem por tecido

A eficiência média de contagem obtida em "porcentagem" apresentou uma variação, por tecido, que oscilou de 14,53% a 25,12%. Os maiores valores registrados, foram para o diafragma, cérebro e língua e os menores para o sangue, baço e fígado. O desvio padrão foi calculado e variou de 0,90% a 4,53%, sendo que os maiores valores foram registrados para o osso, coração e diafragma e os menores para o cérebro, rim e sangue. (Quadro III).

QUADRO III - Eficiência de contagem por tecido e erro padrão

Tecido	Eficiência média %	Erro padrão %
Fígado	19,45	1,38
Rim	19,62	0,98
Baço	15,08	1,79
Coração	21,85	2,73
Língua	22,96	2,11
Soro	22,86	1,10
Osso	21,65	4,35
Diafragma	25,12	2,27
Sangue	14,53	1,02
Cérebro	23,96	0,90

4.2. Teores séricos de fósforo antes da aplicação da solução radioativa

Os teores séricos de fósforo expressos em "mg %" apresentaram menores valores nos animais utilizados na primeira fase, quando comparados aos do tratamento correspondente e utilizados na segunda fase.

Nas duas fases experimentais, os animais sacrificados 16 horas após à aplicação da solução possuíam maiores teores séricos de fósforo e os sacrificados 24 horas menores teores (Quadro IV) (Figura 11).

QUADRO IV - Teores séricos de fósforo antes da aplicação da solução radioativa

Tratamento	Fase	Número do animal	mg % de P por animal	mg % média
8 horas	1ª	617	7,6	8,4
		619	9,2	
	2ª	177	9,2	9,6
		168	10,1	
16 horas	1ª	621	10,9	10,0
		600	9,1	
	2ª	165	11,1	10,4
		175	9,8	
24 horas	1ª	618	7,6	7,3
		645	7,1	
	2ª	179	7,7	8,1
		160	9,6	

4.3. Retenção do fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ ) em tecidos dos animais

Os resultados obtidos nas duas fases experimentais estão apresentadas como "porcentagem de dose por grama de matéria seca de tecido" (Quadros V e VI). Os animais utilizados na primeira fase apresentaram maior retenção de fósforo. (Figuras 12 a 21).

Com exceção do soro, osso e cérebro, a re

tenção nos demais tecidos decresceu na seguinte ordem de tratamento: 24, 8 e 16 horas (Figuras 12 a 16 e 19 e 20). Para o osso e o cérebro a ordem foi 24, 16 e 8 horas (Figuras 18 e 21), e finalmente para o soro 16, 8 e 24 horas (Fig. 17).

Nos animais utilizados na segunda fase experimental, não se observou uma uniformidade como na fase anterior. A ordem de retenção decresceu com o tempo experimental para os seguintes tecidos: fígado, rim, coração e sangue (Figuras 12, 13, 15 e 20).

Para o baço, língua, diafragma e cérebro, a retenção decresceu na seguinte ordem: 8, 24 e 16 horas (Figuras 14, 16, 19 e 21); no soro a ordem foi 16, 8 e 24 horas (Figura 17), e finalmente para o osso 16, 24 e 8 horas (Figura 18).

QUADRO V - Percentagem de dose por grama de M.S. de tecido - Primeira fase

ORDEM DAS AMOSTRAS	8 horas		16 horas		24 horas		
	617	619	621	600	618	645	
FÍGADO	1º	0,12402	0,12067	0,12850	0,13930	0,12439	0,13369
	2º	0,13127	0,13246	0,08335	0,13469	0,11998	0,15661
RIM	1º	0,11395	0,09269	0,04849	0,09392	0,10404	0,12733
	2º	0,11444	0,09353	0,05462	0,08705	0,10377	0,13698
BAÇO	1º	0,08168	0,05765	0,06906	0,05552	0,07619	0,09837
	2º	0,07990	0,07149	0,04148	0,05730	0,07869	0,10790
CORÇÃO	1º	0,08781	0,04696	0,04152	0,04581	0,07214	0,05341
	2º	0,10223	0,04005	0,04014	0,04753	0,07639	0,08409
LÍNGUA	1º	0,06601	0,06052	0,02684	0,04001	0,05870	0,08984
	2º	0,04540	0,03716	0,03769	0,05396	0,04850	0,07177
SORO	1º	0,02249	0,02057	0,01832	0,02647	0,01518	0,01814
	2º	0,02157	0,02045	0,01755	0,02350	0,01524	0,02393
OSSO	1º	0,01104	0,01708	0,02462	0,01483	0,03447	0,03705
	2º	0,01113	0,01471	0,01982	0,01539	0,03038	0,03695
DIAFRAGMA	1º	0,01845	0,01346	0,01498	0,01783	0,02352	0,02749
	2º	0,02540	0,01506	0,01503	0,01720	0,02183	0,02862
SANGUE	1º	0,01455	0,01277	0,01272	0,00987	0,01316	0,01818
	2º	0,01327	0,01260	0,01208	0,01240	0,01260	0,01569
CÉREBRO	1º	0,00280	0,00201	0,00336	0,00387	0,00497	0,00567
	2º	0,00318	0,00218	0,00238	0,00276	0,00659	0,00820

QUADRO VI - Porcentagem de dose por grama de M.S. de tecido - Segunda fase

	ORDEM DAS AMOSTRAS	8 horas		16 horas		24 horas	
		177	168	165	175	179	160
F Í G A D O	1ª	0,07407	0,06320	0,05208	0,05210	0,04460	0,04351
	2ª	- - - -	0,06923	0,05173	0,05221	0,04282	0,04361
R I M	1ª	0,05471	0,04125	0,04506	0,04605	0,03299	0,03961
	2ª	- - - -	0,04282	0,04604	0,04825	0,03181	0,03835
B A Ç O	1ª	0,03456	0,02587	0,02508	0,02415	0,02684	0,02994
	2ª	- - - -	0,02457	0,02503	0,02655	0,02323	0,02922
C O R A Ç Ã O	1ª	0,03171	0,01984	0,02335	0,01993	0,01715	0,01726
	2ª	- - - -	0,02391	0,02395	0,02279	0,02215	0,02219
L Í N G U A	1ª	0,02837	0,02860	0,02511	0,02535	0,02622	0,02509
	2ª	- - - -	0,02058	0,01832	0,01761	0,01954	0,01776
S O R O	1ª	0,01578	0,01626	0,01003	0,01251	0,00684	0,00769
	2ª	- - - -	0,01649	0,01083	0,03542	0,00413	0,01049
O S S O	1ª	0,00844	0,00745	0,01480	0,01974	0,01595	0,01407
	2ª	- - - -	0,00866	0,01225	0,01933	0,01290	0,00898
D I A F R A G M A	1ª	0,01164	0,00834	0,00963	0,00574	0,00817	0,00861
	2ª	- - - -	0,00814	0,00899	0,00736	0,00782	0,00827
S A N G U E	1ª	0,01260	0,01083	0,00444	0,00485	0,00395	0,00386
	2ª	- - - -	0,00922	0,00439	0,00464	0,00370	0,00402
C É R E B R O	1ª	0,00208	0,00100	0,00129	0,00121	0,00141	0,00141
	2ª	- - - -	0,00103	0,00138	0,00121	0,00185	0,00158

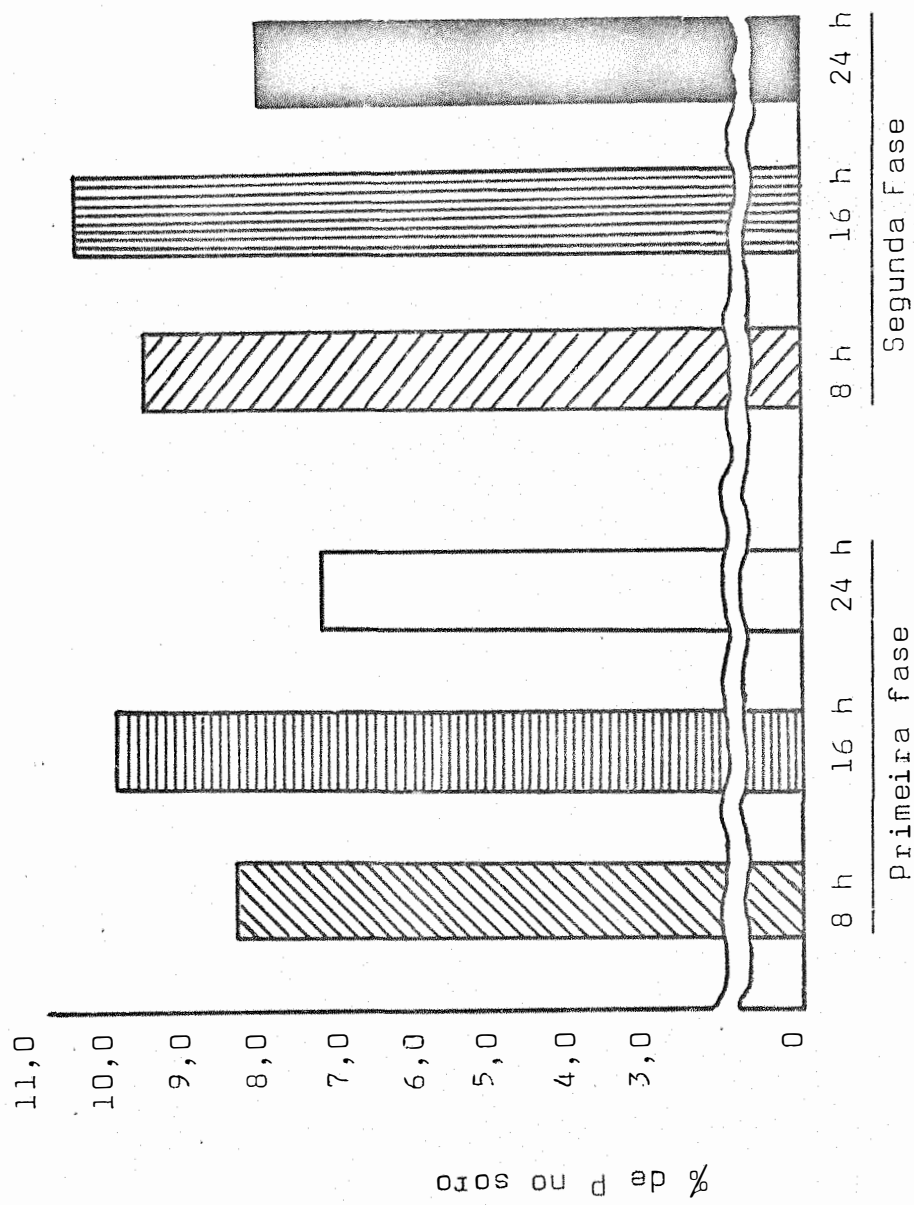


FIG. 11 - Teores séricos de fósforo antes da aplicação da solução radioativa (médias)

F Í G A D O

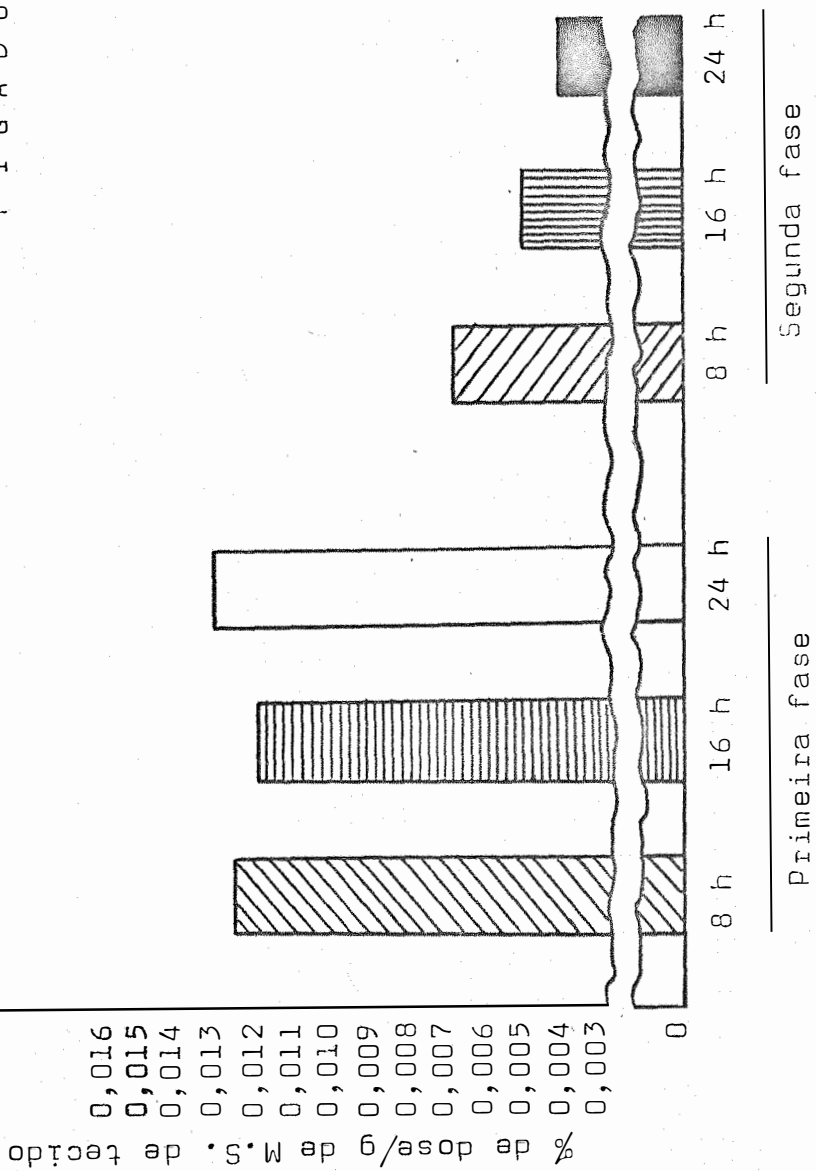


FIG. 12 - Retenção de <sup>32</sup>p por grama de M.S. de fígado (médias)



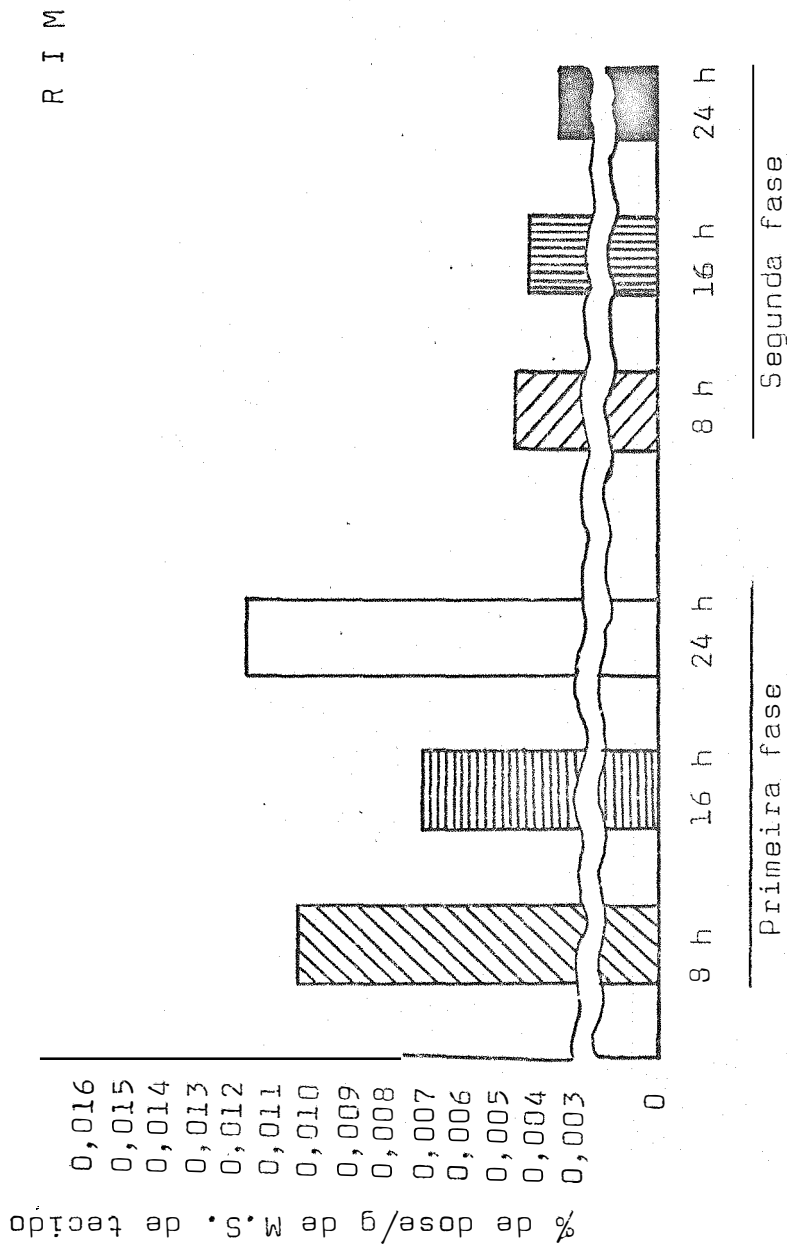


FIG. 13 - Retenção de  $^{32}\text{P}$  por grama de M.S. de rim (médias)

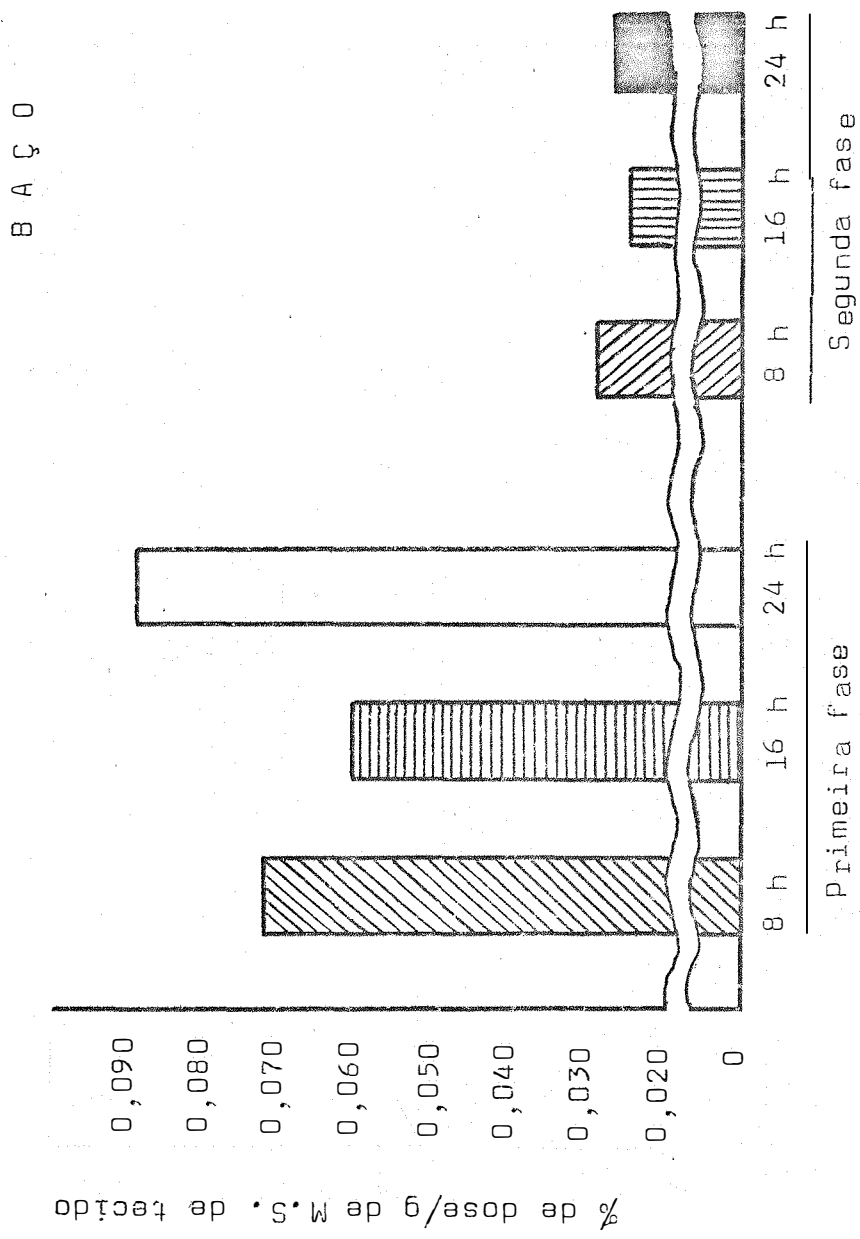


FIG. 14 - Retenção de <sup>32</sup>P por grama de M.S. de baço (médias)

C O R A Ç Ã O

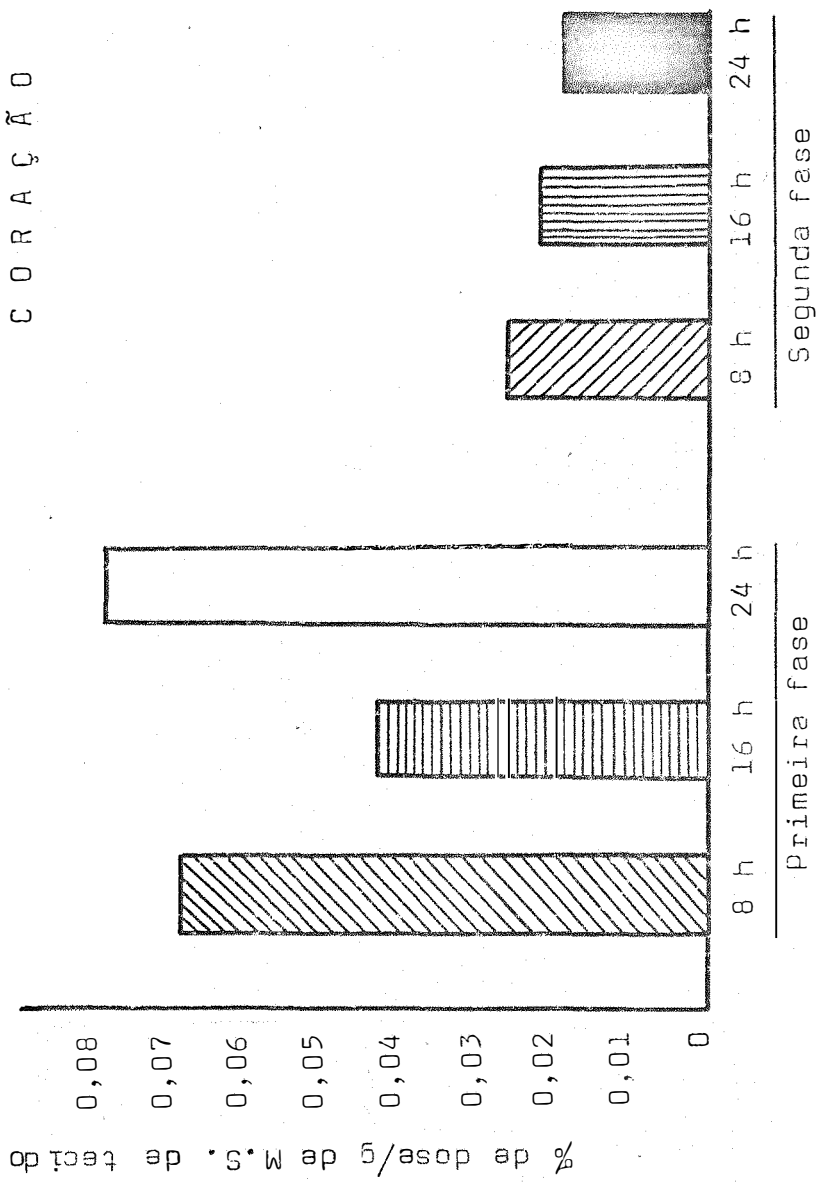


FIG. 15 - Retenção de  $^{32}\text{P}$  por grama de M.S. de coração (médias)

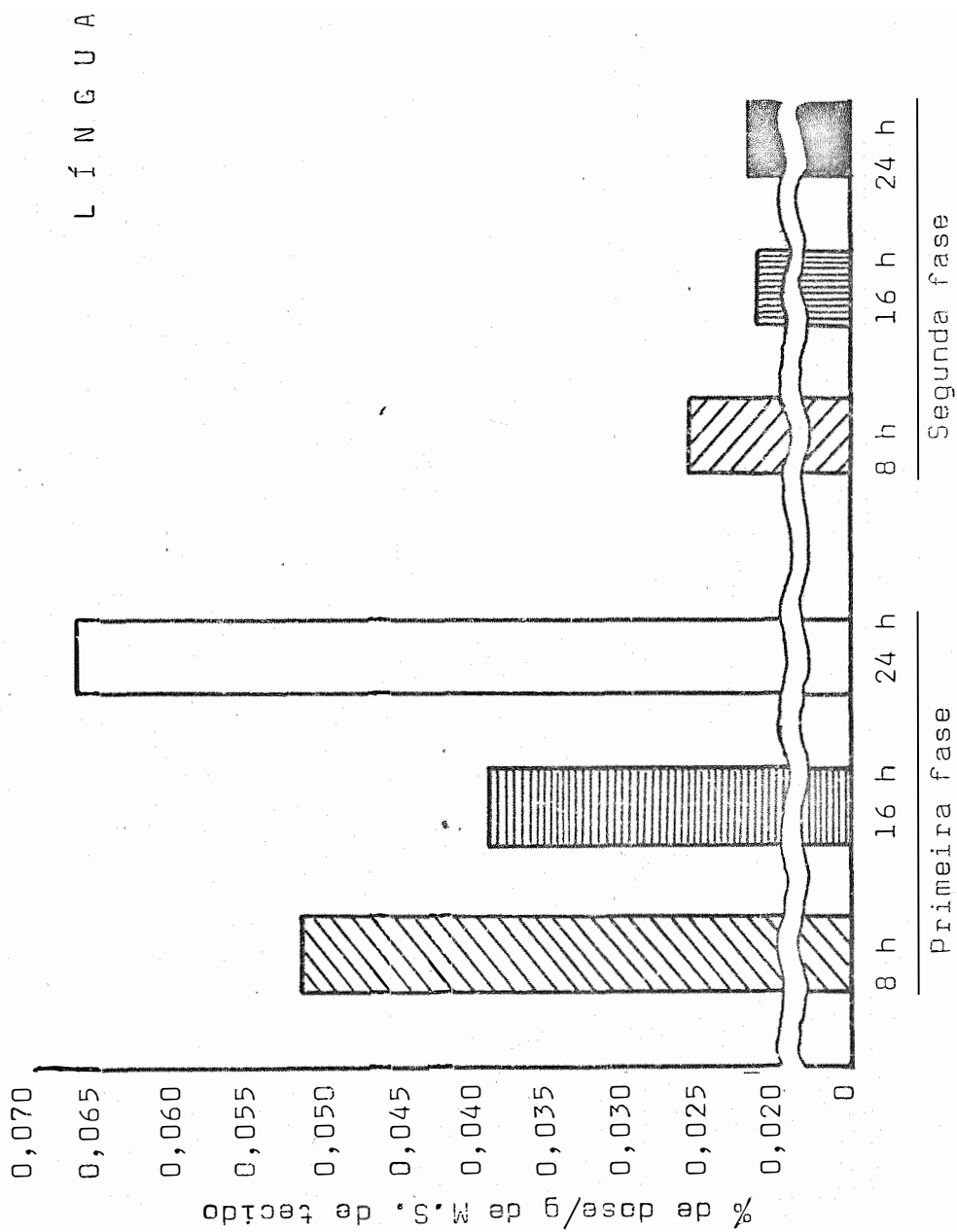


FIG. 16 - Retenção de  $^{32}\text{P}$  por grama de M.S. de língua (médias)

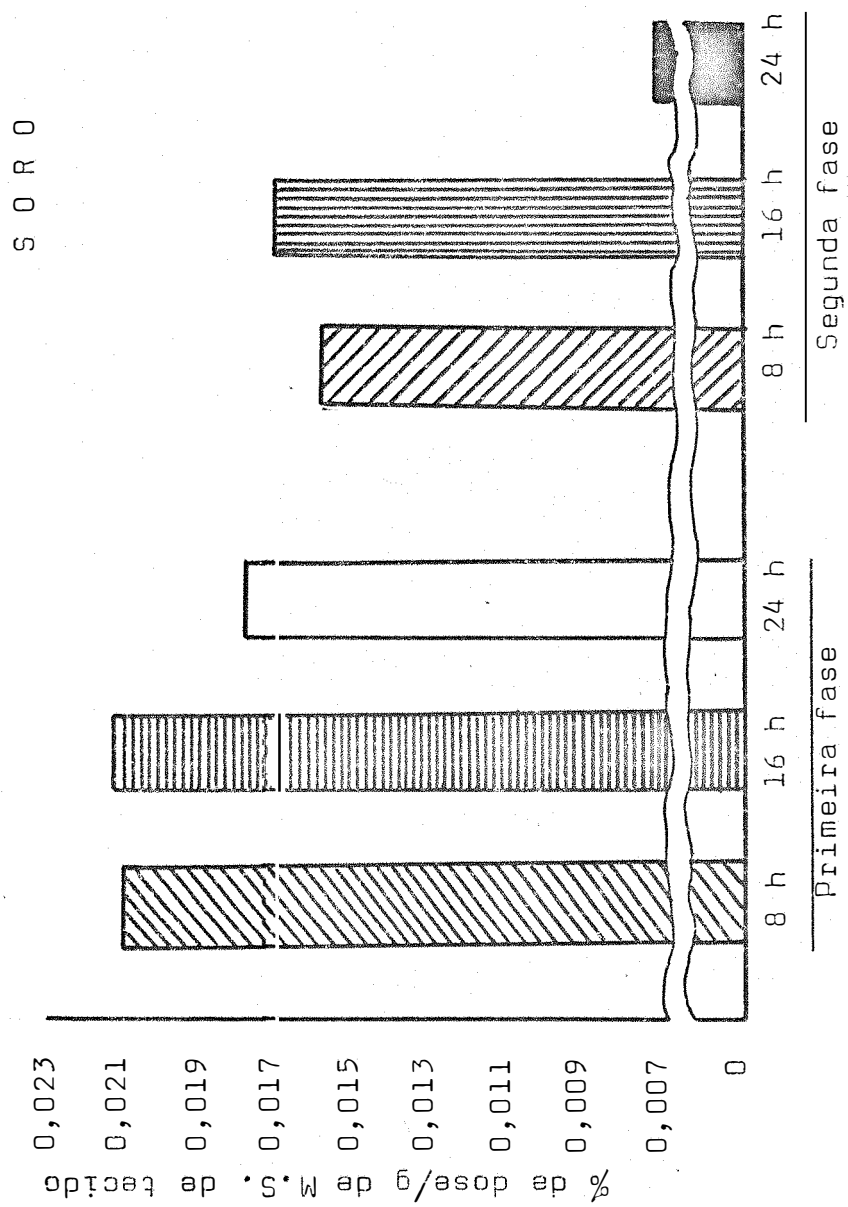


FIG. 17 - Retenção de <sup>32</sup>P por gramas de M.S. de soro (médias)

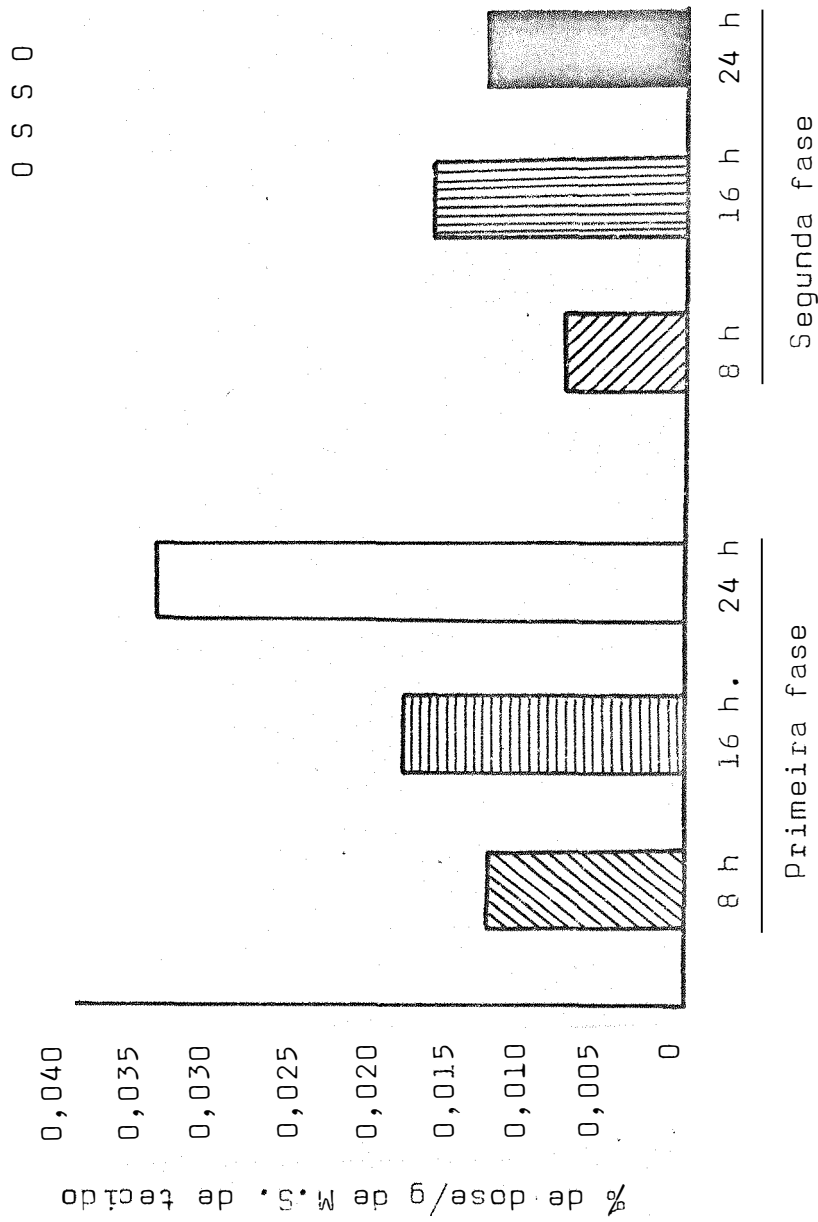


FIG. 18 - Retenção de  $^{32}\text{P}$  por grama de M.S. de osso (médias)

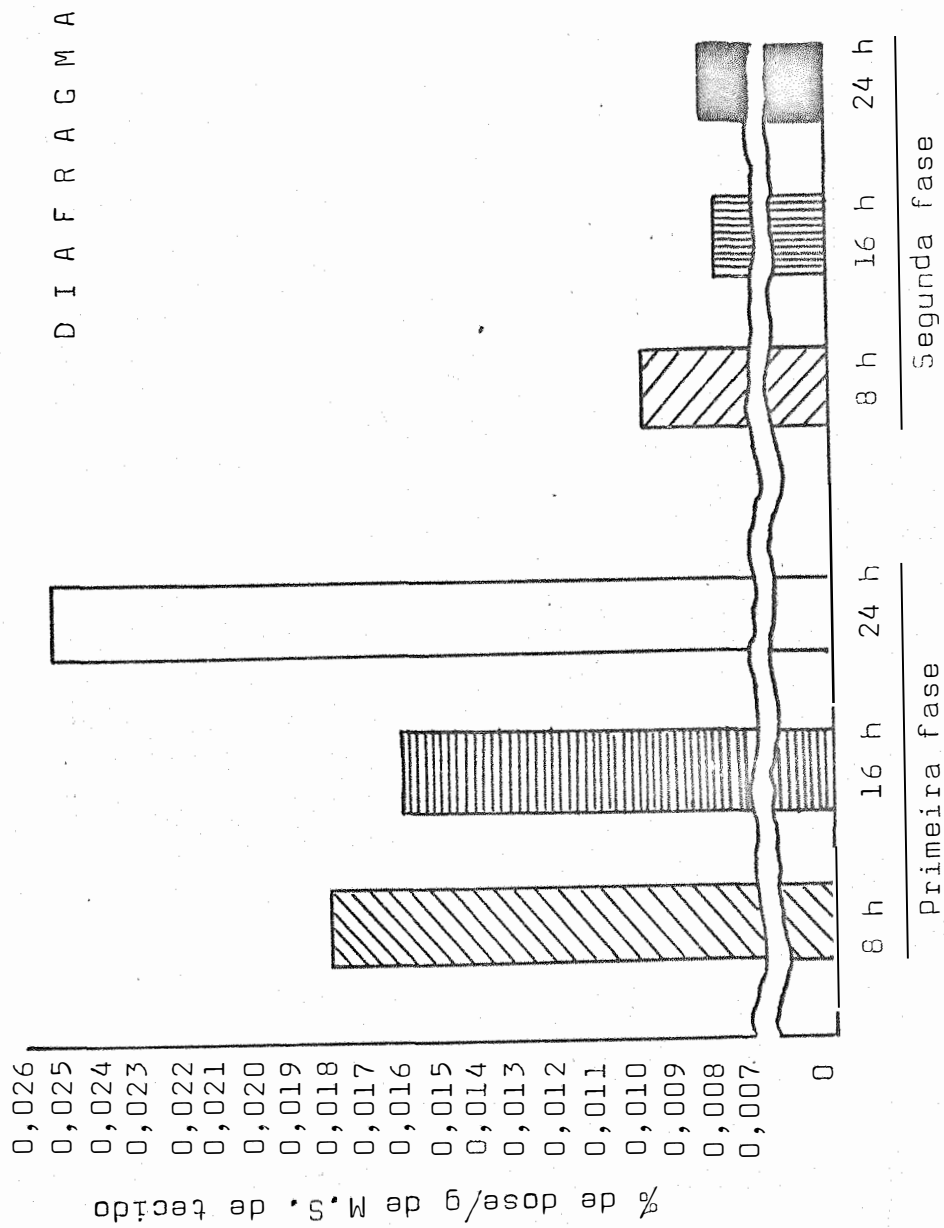


FIG. 19 - Retenção de <sup>32</sup>P por grama de M.S. de diafragma (médias)

S A N G U E

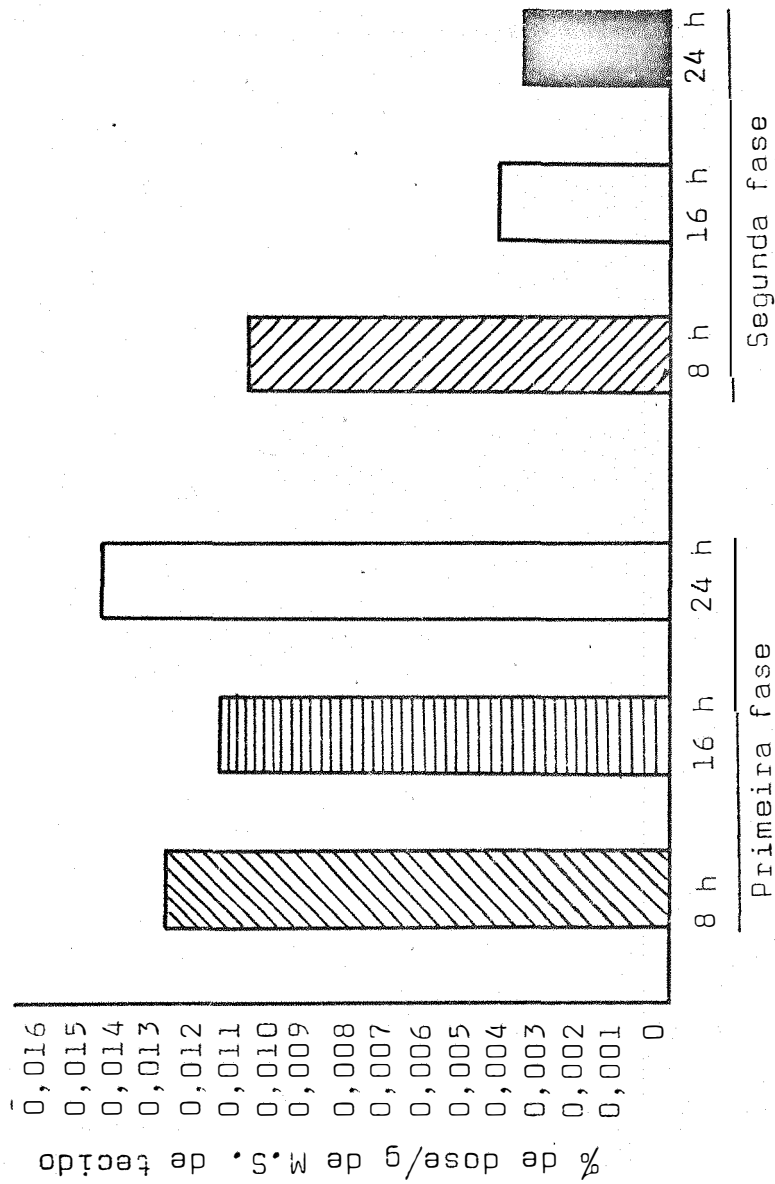


FIG. 20 - Retenção de  $^{32}\text{P}$  por grama de M.S. de sangue (médias)



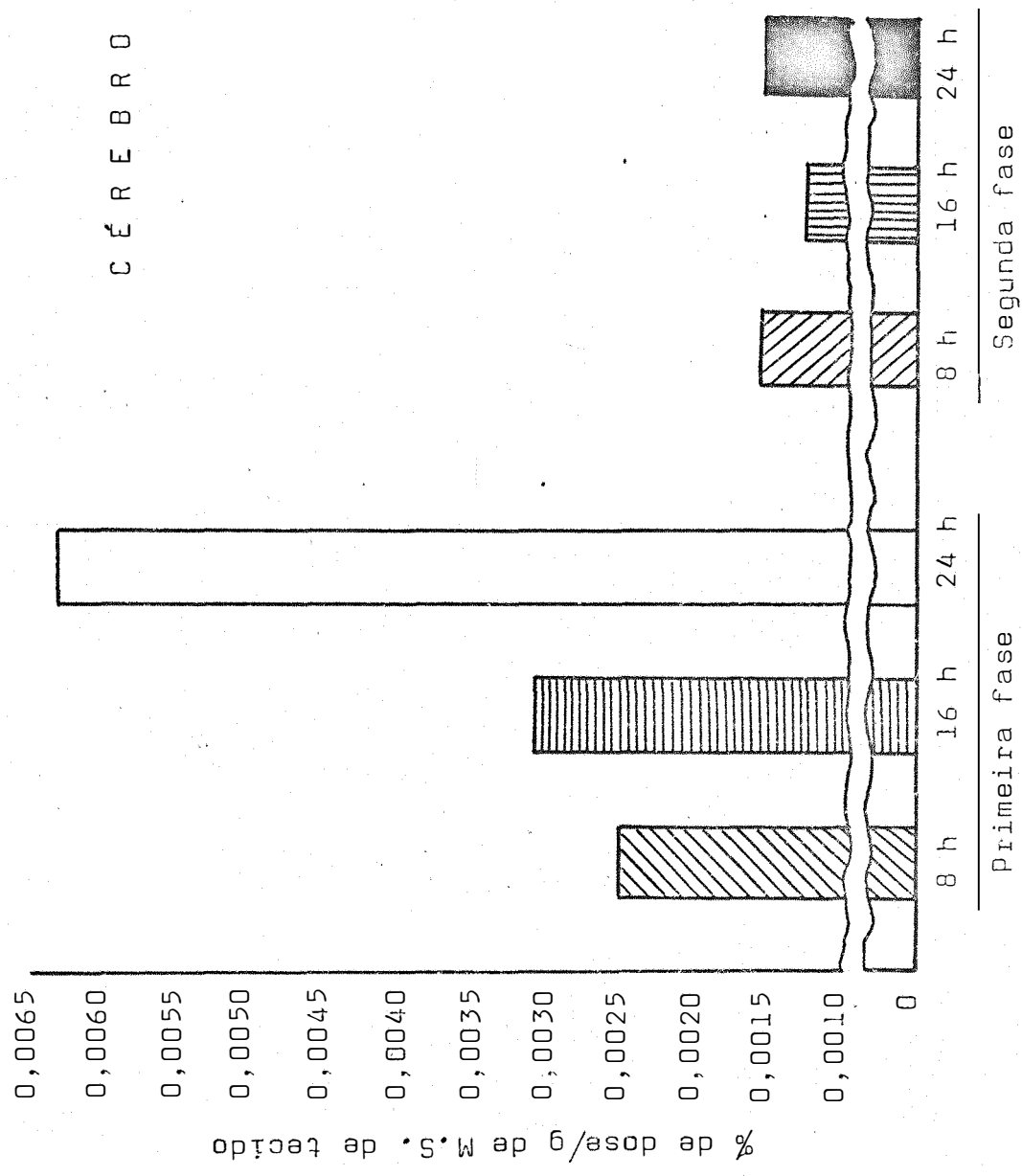


FIG. 21 - Retenção de  $^{32}\text{P}$  por grama de M.S. de cérebro (médias)

Em todos os tratamentos a ordem de retenção de  $^{32}\text{P}$  foi praticamente a mesma nos seguintes tecidos: fígado, rim, baço, coração, língua e cérebro. No diafragma, osso, soro e sangue, encontrou-se uma variação idêntica nas duas fases para os tratamentos 16 e 24 horas, o mesmo não ocorrendo no tratamento 8 horas cuja ordem variou entre as duas fases (Quadro VII).

QUADRO VII - Ordem decrescente da retenção de  $^{32}\text{P}$  em diferentes tecidos

8 horas		16 horas		24 horas	
Iª fase	IIª fase	Iª fase	IIª fase	Iª fase	IIª fase
Fígado	Fígado	Fígado	Fígado	Fígado	Fígado
Rim	Rim	Rim	Rim	Rim	Rim
Baço	Baço	Baço	Baço	Baço	Baço
Coração	Coração	Coração	Coração	Coração	Língua
Língua	Língua	Língua	Língua	Língua	Coração
Diafragma	Soro	Soro	Soro	Osso	Osso
Soro	Sangue	Osso	Osso	Diafragma	Diafragma
Osso	Diafragma	Diafragma	Diafragma	Soro	Soro
Sangue	Osso	Sangue	Sangue	Sangue	Sangue
Cérebro	Cérebro	Cérebro	Cérebro	Cérebro	Cérebro

A fim de melhor visualizar os dados, os resultados da retenção de  $^{32}\text{P}$  foram transformados em porcentagem em relação ao fígado, que foi o órgão que apresentou maiores valores em todos os animais. (Figura 22 e 23).

Efetuada-se a análise estatística separadamente, por fase, foram obtidos os seguintes resultados:

### Primeira fase

Houve uma diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade para tecidos e tempo de retenção (Quadro VIII), e o coeficiente de variação foi de 24,79%. A interação tecido x tempo não foi significativa. Apesar disso, o desdobramento dos graus de liberdade assinalou componente quadrática significativa para rim e coração ao nível de 1% de probabilidade. (Quadro IX).

QUADRO VIII - Análise de variância das porcentagens por grama de M.S. - Primeira fase

Causa de Variação	G.L.	SQ	QM	F
Tecidos (&)	9	0,09041697	0,01004633	64,37**
Tempo (T)	2	0,00319735	0,00159868	10,24**
& x T	18	0,00280908	0,00015606	-
(Tratamentos)	(29)	0,09642297	0,00332493	21,97**
Blocos (Animais)	1	0,0002088	0,00020880	-
Resíduo	29	0,00438829	0,00015132	-
Total	59			

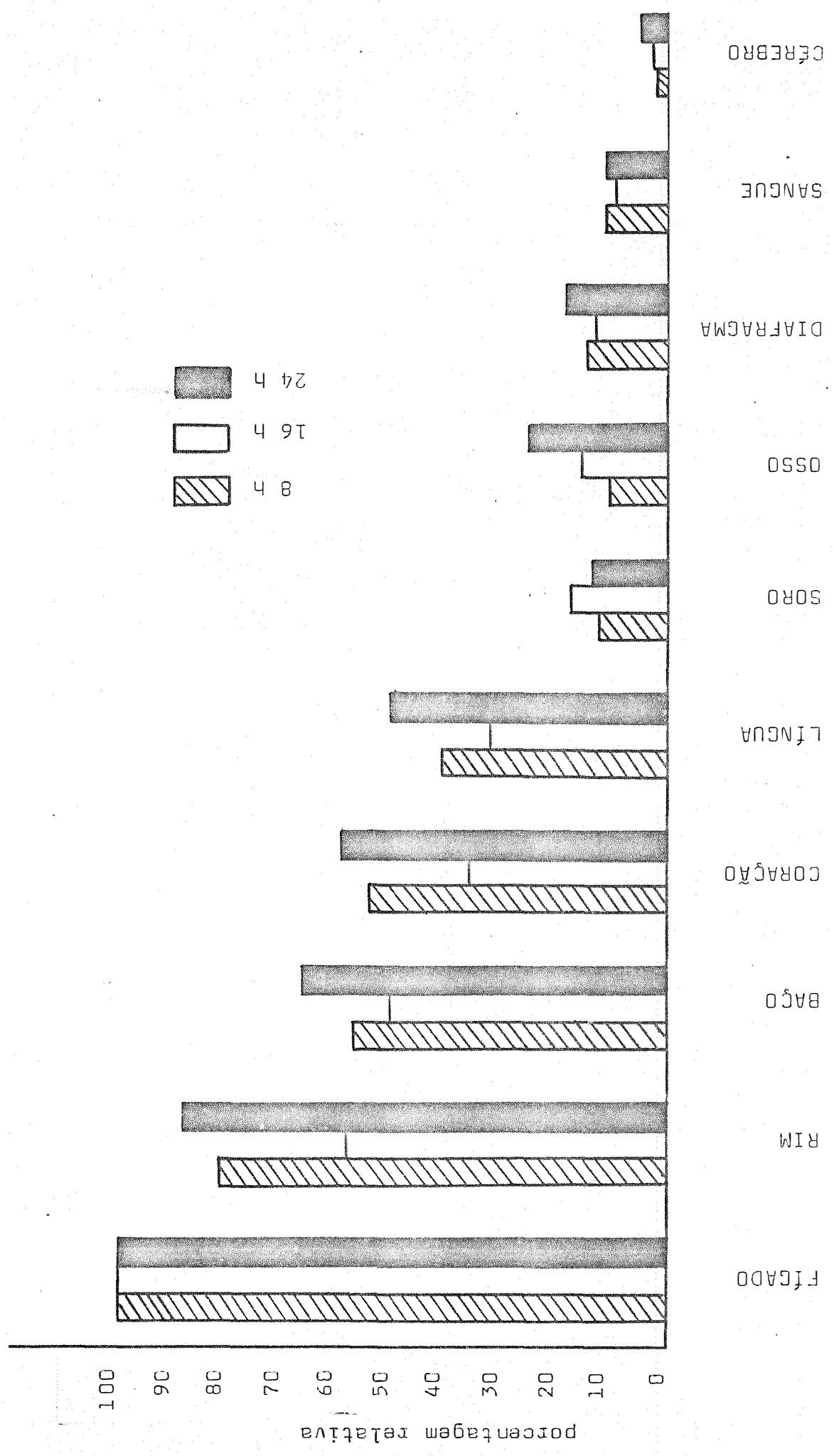


FIG. 22 - Valor relativo da porcentagem de dose por grama de M.S. de diferentes tecidos (médias)

Primeira fase

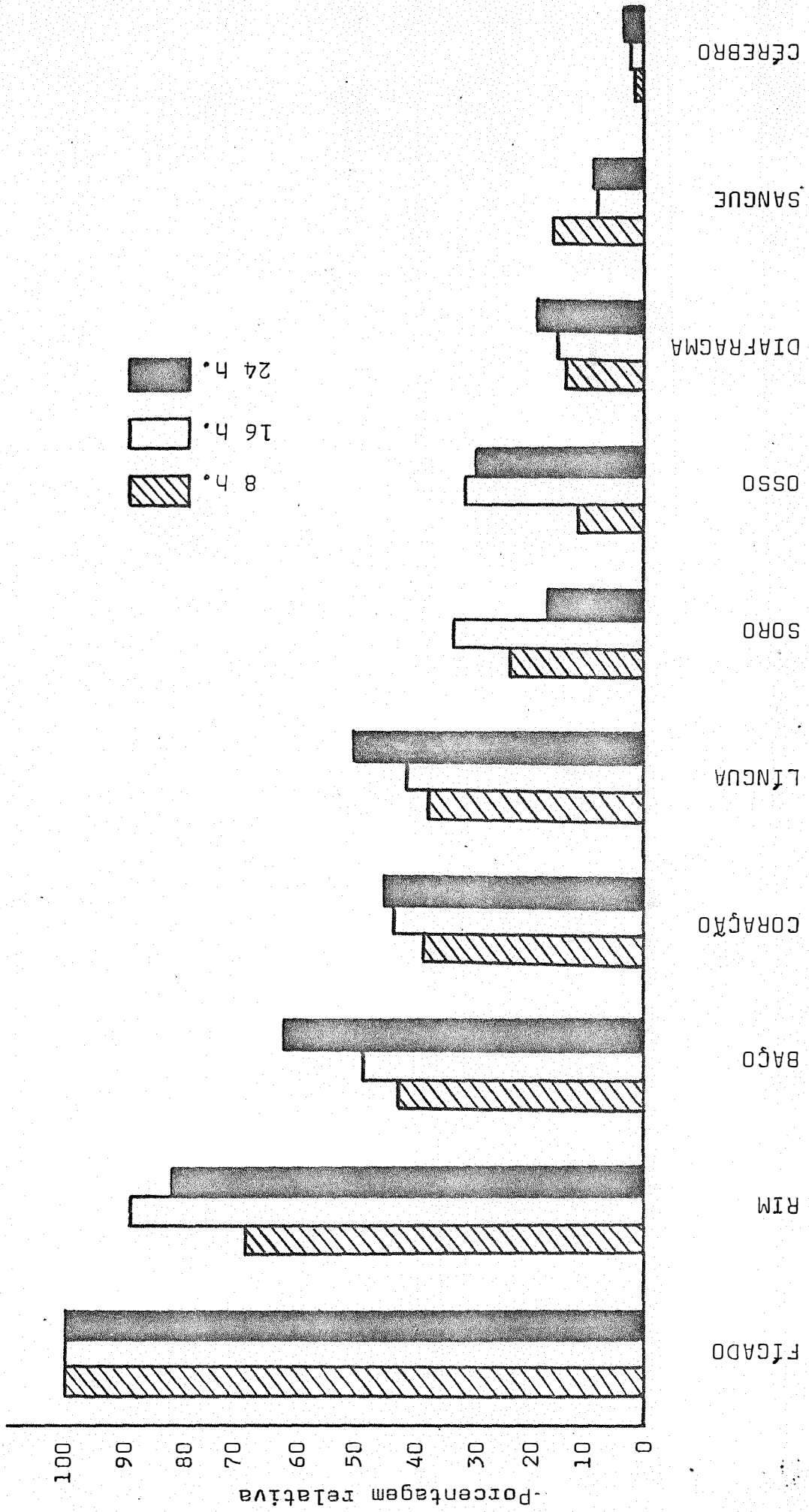


FIG. 23 - Valor relativo da porcentagem de dose por grama de M.S. de diferentes tecidos (médias) Segunda fase

QUADRO IX - Análise de variância com desdobramento dos graus de liberdade para tempo e interação (& x T) - Primeira fase

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
(Entre tempos de fígado)	(2)	0,00014936	0,00007468	0,49
Componente linear	1	0,00004309	0,00004309	0,28
Componente quadrática	1	0,00010626	0,00010626	0,70
(Entre tempos de rim)	(2)	0,00233762	0,00116881	7,72**
Componente linear	1	0,00021228	0,00021228	1,40
Componente quadrática	1	0,00212534	0,00212534	14,04**
(Entre tempos de baço)	(2)	0,00080475	0,00040237	2,66
Componente linear	1	0,00026912	0,00026912	1,78
Componente quadrática	1	0,00053562	0,00053562	3,54
(Entre tempos de coração)	(2)	0,00132876	0,00066438	4,39*
Componente linear	1	0,00009594	0,00009594	0,63
Componente quadrática	1	0,00123282	0,00123286	8,15**
(Entre tempos de língua)	(2)	0,00076239	0,00038119	2,52
Componente linear	1	0,00022290	0,00022290	1,48
Componente quadrática	1	0,00053948	0,00053948	3,56
(Entre tempos de soro)	(2)	0,00001405	0,00000702	0,05
Componente linear	1	0,00000992	0,00000992	0,07
Componente quadrática	1	0,00000413	0,00000413	0,03
(Entre tempos de osso)	(2)	0,00048985	0,00024492	1,62
Componente linear	1	0,00045050	0,00045050	2,98
Componente quadrática	1	0,00003934	0,00003934	0,26
(Entre tempos de diafragma)	(2)	0,00009275	0,00004637	0,30
Componente linear	1	0,00005285	0,00005285	0,35
Componente quadrática	1	0,00003989	0,00003989	0,26
(Entre tempos de sangue)	(2)	0,00000986	0,00000493	0,03
Componente linear	1	0,00000259	0,00000259	0,02
Componente quadrática	1	0,00000726	0,00000726	0,05
(Entre tempos de cérebro)	(2)	0,00001701	0,00000850	0,06
Componente linear	1	0,00001455	0,00001455	0,10
Componente quadrática	1	0,00000245	0,00000245	0,02
Tecidos	9	0,09041697	0,01004633	64,37**
(Tratamentos)	(29)	0,09642297	0,00332493	21,97**
Blocos	1	0,00020880	0,00020880	--
Resíduo	29	0,00438829	0,00015132	--
Total	59			

Pelo teste de Tukey verificou-se que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade da retenção de  $^{32}\text{P}$  do:

fígado com todos os demais tecidos;  
rim com coração, língua, soro, osso, diafragma, sangue e cérebro;

baço com língua, soro, osso, diafragma, sangue e cérebro;

coração e língua com soro, osso, diafragma, sangue e cérebro;

Entre soro, osso, diafragma, sangue e cérebro as diferenças não foram significativas. (Quadro X).

	FÍGADO	RIM	BAÇO	CORAÇÃO	LÍNGUA	SORO	OSSO	DIAFRAGMA	SANGUE	CÉREBRO
FÍGADO	----	0,02977*	0,05320*	0,06339*	0,07437*	0,10712*	0,10512*	0,10750*	0,11408*	0,12341*
RIM	----	----	0,02343	0,03362*	0,04460*	0,07735*	0,07534*	0,07773*	0,08431*	0,09363*
BAÇO	----	----	----	0,01018	0,02117*	0,05392*	0,05191*	0,05430*	0,06088*	0,07020*
CORAÇÃO	----	----	----	----	0,01098	0,04373*	0,04173*	0,04411*	0,05069*	0,06002*
LÍNGUA	----	----	----	----	----	0,03275*	0,03075*	0,03313*	0,03971*	0,04904*
SORO	----	----	----	----	----	----	0,00200	0,00038	0,00696	0,01629
OSSO	----	----	----	----	----	----	----	0,00238	0,00896	0,01829
DIAFRAGMA	----	----	----	----	----	----	----	----	0,00658	0,01591
SANGUE	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,00933
CÉREBRO	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

$\Delta_{5\%} = 0,02420$

QUADRO X - Comparação das percentagens médias de dose por grama de M.S., pelo teste de Tukey  
Primeira fase



Segunda fase

A análise estatística revelou diferença significativa entre tecidos ao nível de 1% de probabilidade entre tempo de retenção ao nível de 5% de probabilidade e interação tecidos e tempos ao nível de 1% (Quadro XI). O coeficiente de variação foi de 16,65%. O desdobramento dos graus de liberdade entre tempos e interação tecidos e tempos apresentou componentes lineares significativos para fígado e rim ao nível de 1% de probabilidade, e para soro e sangue ao nível de 5% de probabilidade (Quadro XII).

O teste de Tukey revelou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade da retenção de  $^{32}\text{P}$  do:

fígado com todos os demais tecidos;

rim com baço, língua, soro, osso, diafragma, sangue e cérebro;

baço com soro, osso, diafragma, sangue e cérebro;

coração e língua com soro, osso, diafragma, sangue e cérebro.

Entre soro, osso, diafragma, sangue e cérebro, as diferenças não foram significativas (Quadro XIII).

QUADRO XI - Análise de Variância das porcentagens de dose por grama de M.S. - Segunda fase

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tecidos (& )	9	0,01557312	0,00173035	37,11**
Tempo (T)	2	0,00044158	0,00022079	4,73*
& x T	18	0,00083924	0,00004662	3,62**
Tratamentos	(29)	0,01685399	0,00058117	45,19**
Blocos (Animais)	1	0,00000876	0,00000876	-
Resíduo	29	0,00037282	0,00001286	-
Total	59			

QUADRO XII - Análise de Variância com desdobramento dos graus de liberdade de tempo e interação (& x T) - Segunda fase

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
(Entre tempos de fígado)	(2)	0,00073404	0,00036702	28,53**
Componente linear	1	0,00070251	0,00070251	54,62**
Componente quadrática	1	0,00003152	0,00003152	2,45
(Entre tempos de rim)	(2)	0,00018566	0,00009125	7,09**
Componente linear	1	0,00016078	0,00016078	12,50**
Componente quadrática	1	0,00002488	0,00002488	1,93
(Entre tempos de baço)	(2)	0,00002207	0,00001103	0,86
Componente linear	1	0,00000668	0,00000668	0,52
Componente quadrática	1	0,00001539	0,00001539	1,20
(Entre tempos de coração)	(2)	0,00005120	0,00002559	1,99
Componente linear	1	0,00005048	0,00005048	3,92
Componente quadrática	1	0,00000071	0,00000071	0,05
(Entre tempos de língua)	(2)	0,00002882	0,00001441	1,12
Componente linear	1	0,00001909	0,00001909	1,48
Componente quadrática	1	0,00000972	0,00000972	0,75
(Entre tempos da soro)	(2)	0,00011782	0,00005890	4,58*
Componente linear	1	0,00007726	0,00007726	6,00*
Componente quadrática	1	0,00004055	0,00004055	3,15
(Entre tempos de osso)	(2)	0,00006902	0,00003451	2,68
Componente linear	1	0,00002232	0,00002232	1,73
Componente quadrática	1	0,00004668	0,00004668	3,63
(Entre tempos de diafragma)	(2)	0,00000473	0,00000236	0,18
Componente linear	1	0,00000297	0,00000297	0,23
Componente quadrática	1	0,00000175	0,00000175	0,13
(Entre tempos de sangue)	(2)	0,00006737	0,00003368	2,61
Componente linear	1	0,00005520	0,00005520	4,29*
Componente quadrática	1	0,00001216	0,00001216	0,94
(Entre tempos de cérebro)	(2)	0,00000011	0,00000005	--
Componente linear	1	0,00000000	0,00000000	--
Componente quadrática	1	0,00000011	0,00000011	--
Tecidos	9	0,01557312	0,00173035	37,11**
(Tratamentos)	(29)	0,01685399	0,00058117	45,19**
Blocos	1	0,00000876	0,00000876	--
Resíduo	29	0,00037282	0,00001286	--
Total	59			

	FÍGADO	RIM	BAÇO	CORAÇÃO	LÍNGUA	SORO	OSSO	DIAFRAGMA	SANGUE	CÉREBRO
FÍGADO	-----	0,01179*	0,02780*	0,03227*	0,03187*	0,04175*	0,04268*	0,04657*	0,04868*	0,05381*
RIM	-----	-----	0,01601*	0,02048*	0,02008*	0,02996*	0,03089*	0,03478*	0,03689*	0,04202*
BAÇO	-----	-----	-----	0,00447	0,00407	0,01395*	0,01488*	0,01877*	0,02088*	0,02601*
CORAÇÃO	-----	-----	-----	-----	0,00040	0,00948*	0,01041*	0,01430*	0,01641*	0,02154*
LÍNGUA	-----	-----	-----	-----	-----	0,00988*	0,01081*	0,01470*	0,01681*	0,02194*
SORO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,00093	0,00482	0,00693	0,01206
OSSO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,00389	0,00600	0,01113
DIAFRAGMA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,00211	0,00724
SANGUE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,00513
CÉREBRO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

$\Delta_{5\%} = 0,00730$

QUADRO XIII - Comparação das porcentagens médias de dose por grama de M.S., pelo teste de Tukey Segunda fase

## 5 - DISCUSSÃO

### 5.1. Equipamentos e metodologia

Os equipamentos utilizados no presente trabalho foram construídos obedecendo-se as recomendações básicas citadas por HANSARD (1951). A fim de se tornarem mais funcionais, pequenas modificações deverão ser feitas. O emprego de lâmina de plástico como forro das gaiolas não trouxe inconvenientes aos animais pois foi utilizada por pequeno espaço de tempo. O emprego do funil de borracha para coleta de urina também mostrou-se de grande valia e evitou a maior contaminação do ambiente por esse líquido.

No que diz respeito à metodologia utilizada pode-se dizer que se mostrou satisfatória, pois consultando o quadro VII, verifica-se boa uniformidade na obtenção dos resultados.

Devido as condições não apropriadas para manter os animais contaminados por períodos mais longos, a diferença entre os tempos experimentais teve que ser reduzido ocorrendo assim a uniformidade dos resultados que permitem, deste modo, melhor avaliação da metodologia empregada; acrescente-se que a ordem da retenção nos tecidos foi a mesma obtida nos trabalhos de outros autores.

A variação ocorrida entre as eficiências de contagem obtidas para os diferentes tecidos foi devida a composição desigual dos mesmos e o método da padronização interna corrigiu os erros de tal natureza (PARMENTIER & TEN HAAF, 1969).

### 5.2. Teores séricos de fósforo antes da aplicação da solução radioativa.

Os doze animais apresentaram teores séricos de fósforo dentro dos limites normais e as variações ocorridas são previstas por UNDERWOOD (1969). Quanto à idade, ainda segundo esse autor, os animais da primeira fase deveriam possuir maiores teores. Isso, entretanto, não foi observado, talvez devido a pequena diferença de idade entre os animais das duas fases (78 a 105 dias). Deve-se observar também que os animais utilizados na segunda fase permaneceram por mais tempo em baias no período preliminar e seu manejo poderia ter exercido influência em seu estado nutritivo, pois, o suplemento de minerais foi fornecido sistematicamente, e sabe-se que o nível de fósforo no sangue está diretamente relacionado com o nível dietético (PRESTON & PFANDER, 1964; TOMAS, et alii, 1967).

### 5.3. Retenção de fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ ) em tecidos

A maior retenção de  $^{32}\text{P}$  nos tecidos dos animais utilizados na primeira fase deve ser atribuída ao baixo teor sérico e à idade dos animais. Para SMITH et alii (1951) a idade apresenta influência na retenção desse elemento em suínos, o mesmo não acontecendo com os ovinos (SMITH et alii, 1952).

Por outro lado, HANSARD, et alii (1954) en

contraram influência da idade na retenção do cálcio radioativo em bovinos. Para esses autores os animais mais novos apresentaram maior retenção e maior digestibilidade verdadeira do elemento.

O decréscimo da retenção de  $^{32}\text{P}$  na maioria dos tecidos dos animais, nos diferentes tratamentos foi influenciado também pelo nível sérico do fósforo inorgânico. Sabe-se, contudo, que o teor sérico do fósforo revela o estado nutritivo do animal em relação ao elemento (AMMERMAN et alii, 1957; PRESTON & PFANDER, 1964 e UNDERWOOD, 1969). Tais observações estão em harmonia com o trabalho de ABOU-HUSSEIN et alii (1968) que encontraram maior retenção em animais que se apresentavam mais deficientes.

A retenção do fósforo pelo cérebro e osso foi crescente com o decorrer do tempo e está de acordo com as observações de vários autores, entre eles, SMITH et alii (1951) e ABOU-HUSSEIN, et alii (1971). Isso seria devido à baixa troca metabólica nesses tecidos ou a menor capacidade da célula de reter o fósforo (Rosenfeld & Beath, 1952 in ABOU-HUSSEIN et alii, 1968).

As maiores variações observadas nos animais utilizados na segunda fase podem ser devidas não só ao nível de fósforo inorgânico no soro como também à diferenças nos processos fisiológicos qualitativos e quantitativos nas diferentes idades (SMITH et alii, 1951).

A ordem de retenção do  $^{32}\text{P}$  em tecidos dos animais está de acordo com o encontrado por outros autores (SMITH et alii, 1951; SHIRLEY, et alii, 1951; SMITH et alii, 1952 e ABOU-HUSSEIN et alii, 1968, 1971). Em todos os trabalhos executados até a presente data o tecido que apresentou maior retenção por grama foi o fígado e o menor o cérebro. No presente trabalho a retenção no cérebro aumentou em relação ao retido no fígado, com o decorrer do tempo.

Pequenas oscilações ocorreram influenciadas pela diferença de técnicas adotadas. A maioria dos autores trabalhou com os órgãos inteiros ao passo que no presente trabalho colheram-se apenas duas pequenas amostras de cada tecido. Pode-se observar, comparando alguns dados, (Quadro V e VI) que houve diferença entre as duas amostras de um mesmo tecido no animal, mas tais diferenças não influenciaram a ordem de retenção pelos tecidos que foi a mesma quando as diferenças eram significativas. A mudança de posição na ordem só se modificou quando as diferenças entre os tecidos não foram significativas.

COHN & GREENBERG (1938) encontraram maior retenção nos ossos, a qual foi devida à massa total de ossos do animal. ABOU-HUSSEIN et alii (1968), por sua vez, encontraram maior retenção no fígado e língua; nesse último órgão, o montante encontrado pode ter sido influenciado por provável contaminação da saliva, fluido rico em fósforo (LUEKER & LOFGREEN, 1964; TOMAS, et alii, 1967).

No presente trabalho foram observadas diferenças entre os valores obtidos na maioria das duas amostras de língua e coração.

Tais diferenças sugerem a necessidade de estudos para aperfeiçoar a técnica de amostragem em trabalhos dessa natureza.



## 6 - CONCLUSÕES

a - Todo o equipamento construído e utilizado no presente trabalho se prestou bem à sua finalidade. A fim de tornarem mais funcionais poderão ser feitas algumas modificações: redução na largura do protetor vertical contra radiações, aumento no calibre do vértice do funil para evitar entupimentos e aumento na extensão horizontal do acessório da mesa de contenção e necrópsia ; a fim de permitir maiores e melhores movimentos;

b - Durante as primeiras 24 horas após a injeção de uma solução de  $^{32}\text{P}$  por via endovenosa, a ordem de retenção do fósforo por grama de matéria seca de tecidos foi a seguinte: fígado, rim, baço, coração e língua; e essa ordem independeu das idades dos animais e do nível sérico de fósforo inorgânico.

c - O cérebro dos animais foi o tecido onde ocorreu menor retenção de fósforo ( $^{32}\text{P}$ );

d - A quantidade de  $^{32}\text{P}$  retido nos tecidos depende não só do nível sérico de fósforo inorgânico mas também da idade dos animais;

e - O montante de  $^{32}\text{P}$  retido no soro, osso, diafragma, sangue e cérebro não foram diferentes estatisticamente.

## 7 - RESUMO

Doze carneiros, machos da raça Corriedale foram separados em dois grupos conforme a idade média (114 dias e 208 dias). Os animais de cada grupo foram sorteados dois a dois conforme o peso e constituíram as repetições. Após um período de adaptação de 7 dias, ocasião em que continuavam recebendo suplementação mineral à vontade, eram submetidos a uma injeção endovenosa de 1 ml de  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ . No volume aplicado a radioatividade variou com o decorrer do tempo: de 500  $\mu\text{ci}$  a 225,9  $\mu\text{ci}$  para os 6 animais da primeira fase, e de 500  $\mu\text{ci}$  a 87,5  $\mu\text{ci}$  para os 6 animais da segunda fase.

Após 8, 16 e 24 horas da aplicação da injeção, os animais foram anestesiados e sacrificados por sangria total. Além do soro e sangue, foram coletados fragmentos de língua, cérebro, coração, diafragma, baço, rim, fígado e osso. Os tecidos foram secos, incinerados, e os extratos obtidos com ácido sulfúrico levados ao cintilador líquido e sua radioatividade detectada através da radiação Cerenkov.

O teor sérico de fósforo inorgânico dos animais foi determinado com material obtido na véspera do experimento.

Os animais mais novos apresentaram menor teor sérico de fósforo inorgânico e maior retenção de  $^{32}\text{P}$  em seus tecidos.

A retenção do  $^{32}\text{P}$  nos tecidos decresceu na seguinte ordem: fígado, rim, baço, coração e língua. O cérebro sempre apresentou menor retenção. Essa ordem não foi influenciada pela idade dos animais, pelo tempo experimental e nem pelo nível sérico de fósforo inorgânico.

O montante do fósforo retido pelos tecidos foi influenciado não só pela idade dos animais mas também pelo teor de fósforo no sangue e para alguns tecidos, também pelo tempo experimental.

8 - SUMMARY

Twelve male lambs (Corriedale) were separated in two groups according to their average age (114 days and 208 days). The animals of each group were selected in twos according to weight to provide duplicates. After a 7 day period of adaptation, during which time the lambs received an unrestricted mineral supplement, they were given intravenous injections of 1 ml of  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ . The amount of radioactivity administered varied with time; from 500  $\mu\text{ci}$  to 225.9  $\mu\text{ci}$  for the 6 younger animals, and from 500  $\mu\text{ci}$  to 87.5  $\mu\text{ci}$  for the 6 older ones.

At 8, 16, and 24 hours after the injections, the animals were anesthetized and sacrificed by bleeding. As well as the serum and blood, pieces, of tongue, brain, heart, diaphragm spleen, kidney, liver and bone were collected. These tissues were dried, incinerated and the extracts obtained with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  counted by Cerenkov radiation in a liquid scintillation counter.

The level of inorganic phosphorus in the serum was determined with material obtained the day before the experiment.

The younger animals had lower levels of serum inorganic phosphorus and retained higher levels of  $^{32}\text{P}$  in their tissues.

The isotope was found in a decreasing order in the following tissues: liver, kidney, spleen, heart and tongue. The brain presented the least retention.

The order of magnitude by which the tissues retained the isotope was not influenced by the age of the animals, by the experimental period, or by the level of serum inorganic phosphorus.

The amount of phosphorus retained by the tissues was affected not only by the age of the animals, but also by the level of phosphorus in the blood and, for some tissues, by the experimental period.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDU-HUSSEIN, E.R.M.; RAAFAT, M.A.; EL-GINDI, I.M.; SAMY, M.S.M. 1968 - Metabolism of  $P^{32}$  in sheep. Pakistan J. Sci. Res., Lahore, 20 (1/2): 28-33.
- \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ - 1971 - Metabolism of  $^{32}P$  in Poultry. United Arab Rep. J. Anim. Prod., Cairo, 11 (1): 77-88.
- ALTERMAN, M. H. - 1971 - Efeito do ácido 2,4-Diclorofenoxi acético (2,4-D) na absorção do fósforo ( $^{32}P$ ) pelo trigo (Triticum aestivum, L) e sua distribuição na planta. Piracicaba, 1971. 45 p. Mestrado - E.S.A.L.Q.
- AMMERMAN, C.B.; FORBES, R.M.; GARRIGUS, U.S.; NEWMANN, A.L.; NORTON, H.W.; HATFIELD, E.E. - 1957 - Ruminant utilization of inorganic phosphates. J. Anim. Sci., Albany, N. Y., 16: 796-810.
- CHASE, G.D. RABINOWITZ, J.L. - 1968 - Principles of radioisotope methodology. 3rd ed. Burgess. Minneapolis. 633 p.
- COHN, W.E. & GREENBERG, D.M. - 1938 - Studies in mineral metabolism with the aid of artificial radioactive isotopes. I. Absorption, distribution, and excretion of phosphorus. J. Biol. Chem., Baltimore, Md., 123 (1): 185-98.

COMAR, C.L. - 1955 - Radioisotopes in biology and agriculture; principles and practice. New York, McGraw-Hill. 481 p.

FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. - 1925 - The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., Baltimore, 66 (2): 375-400.

GARCES, M.A. & EVANS, J.L. - 1971 - Calcium and magnesium absorption in growing cattle as influenced by age of animal and source of dietary nitrogen. J. Anim. Sci., Albany, N. Y., 32 (4): 789-93.

GOMES, F.P. - 1963 - Curso de estatística experimental. 2 ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 384 p.

HABERER, K. - 1966 - Measurement of beta activities in aqueous samples utilizing Cerenkov radiation. Downers Grove, Packard Instrument Company. 14 p. (Tech. B., 16).

HANSARD, S.L. - 1951 - Radioisotope with farm animals. I. Metabolism facilities. Nucleonics, New York, 9 (1): 13-25.

\_\_\_\_\_ & PLUMLEE, M.P. - 1954 - Effects of dietary calcium and phosphorus levels upon the physiological behavior of calcium and phosphorus in the rat. J. Nutr., Philadelphia, Pa., 54 (1): 17-31.

\_\_\_\_\_ ; COMAR, C.L.; PLUMLEE, M.P. - 1954 - The effects of age upon calcium utilization and maintenance requirements in the bovine. J. Anim. Sci., Albany, N. Y., 13 (1): 25-36.

LUEKER, C.E. & LOFGREEN, G.P. - 1961 - Effects of intake and calcium to phosphorus ratio on absorption of these elements by sheep. J. Nutr., Philadelphia, Pa., 74 (3): 233-8.

- PARMENTIER, H. J. & TEN HAAF, F. E. L. - 1969 - Developments in liquid scintillation counting since 1963. Inter. J. Appl. Rad. Isot., New York, 20: 305-34.
- PRESTON, R.L. & PFANDER, W. H. - 1964 - Phosphorus in lambs fed varying phosphorus intakes. J. Nutr., Philadelphia, Pa., 83: 369-78.
- SHIRLEY, R.L.; DAVIS, G.K.; NELLER, J.R. - 1951 - Distribution of  $P^{32}$  in the tissues of a steer fed grass from land that received labeled fertilizer. J. Anim. Sci., Albany, N. Y., 10 (2): 335-6.
- SMITH, A. H.; KLEIBER, M.; BLACK, A.L.; BAXTER, C. F. - 1955 - Transfer of phosphate in the digestive tract. II. Sheep. J. Nutr., Philadelphia, Pa., 57: 507-27.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; EDICK, M.; ROBINSON, R. R.; HEITMAN Jr. H. - 1951 - Distribution of intravenously injected radio active phosphorus ( $P^{32}$ ) among swine tissues. J. Anim. Sci., Albany, N. Y., 10 (4): 893-901.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; LUICK, J.R.; LARSON, R. F.; WEIR, W.C. - 1952 - Distribution of intravenously injected radioactive phosphorus ( $P^{32}$ ) among sheep tissues. J. Anim. Sci., Albany, N. Y., 11 (4): 638-45.
- TOMAS, F. M.; MOIR, R. J.; SOMERS, M. - 1967 - Phosphorus turnover in sheep. Austr. J. Agric. Res., Melbourne, Vic., 18 (4): 635-45.
- UNDERWOOD, E. J. - 1969 - Los minerales en la alimentación - del ganado. Trad. P. Ducar Maluenda. Zaragoza, Acribia. 456 p.
- VIANA, J. A. C. - 1965 - Suplementos minerais para ruminantes. Rio de Janeiro, Serviço de Informação Agrícola. 47 p. (Est. Técn., 31).