

Comparação analítica entre resultados da glicemia em bovinos obtidos com glicosímetro portátil vs método enzimático

Comparative Analysis between Portable Glucometer and Enzyme Method for Measurement of Blood Glucose Levels in Cattle

Michel Abdalla Helayel¹, Nathalie Costa da Cunha¹, Sandro Estevam Moron², Paulo César Amaral Ribeiro da Silva³, Isabelle Magalhães da Cunha¹, Marina Galindo Chenard¹, Márcia Xavier³, Vivian de Assunção Nogueira Carvalho⁴, Guilherme de Souza Nunes⁵ & Samara de Paula Lopes⁴

ABSTRACT

Background: Changes in glycemic levels can negatively affect the body. Several techniques for the measurement of blood glucose have been described, but the enzymatic method is considered standard and more accurate in both humans and animals. The College of American Pathologists recommends the use of portable glucometers (PGs), which are routinely used in human medicine because this is an easy, relatively inexpensive method that delivers results quickly. The aim of this study was to compare the results of the measurement of blood glucose in cattle obtained using portable Accu-Check[®] glucometer with the enzymatic method (EM), which is still considered standard.

Materials, Methods & Results: Thirty crossbred cattle (*Bos taurus*), male and female, of different ages were evaluated. Through a puncture of the jugular vein, 10 mL of blood was collected, and one drop was immediately used in an Accu-Check[®] PG; the remaining blood was stored in tubes containing sodium fluoride and tubes containing EDTA. The samples were packaged and sent to the laboratory for processing. Blood glucose was measured in the sodium fluoride samples using the enzymatic-colorimetric method (EM) employing Labtest[®] glucose kits with automatic ELISA spectrophotometer readings. The glycemic values obtained in this study with PG and EM ranged from 62 to 163.3 mg/dL. Mean glucose concentrations for the PG and EM methods were 93.53 mg/dL and 94.84 mg/dL, respectively, with no statistical difference ($P > 0.05$). The glycemia measurement results generated by both tests were normally distributed by the Shapiro-Wilk test ($P > 0.05$) and equal variances by the Levene test ($P > 0.05$).

Discussion: The glycemic values obtained in this study meant that most of the mean glycemic values evaluated were >45 to 75 mg/dL, considered a reference for the species. This may have occurred due to the stress of handling during sample collection. Some authors compared the GP and EM methods and reported that the mean glucose concentrations obtained using PGs were significantly lower than those using the EM in both cattle and sheep and suggested using a correction factor for PGs. The error rates between PG and EM in our study ranged from 1.7 to 7.8%, much lower than the limits set by the Food and Drug Administration, which stipulates that PG cannot have error rates greater than 20% for blood glucose concentration. Comparison of PG and EM efficacy has been reported for dogs, cats, and horses, and significant differences were observed in the statistical analysis. In studies from other authors concluded that PG provides significantly different results from EM in the measurement of bovine and sheep blood glucose, but the final values can be corrected in order to obtain reliable results to be used in clinical practice. Hematocrit below 30% leads to erroneously high results, whereas hematocrit greater than 55% may give erroneously low results. However, failures are mainly caused by the user, such as improper application of the sample, excessive time to perform the exam, lack of equipment maintenance, and improper storage of test strips. PGs are becoming a very useful tool in the clinical practice with small animals, as studies have shown its reliability in relation to the EM, which is considered the gold standard. This practice may also be extended to cattle due to the reliability of PGs, as indicated in this study.

Keywords: glycemia, livestock animals, glucometer, enzymatic method, metabolism.

Descritores: glicemia, animais de produção, glicosímetro, método enzimático, metabolismo.

DOI: 10.22456/1679-9216.102954

Received: 3 February 2020

Accepted: 14 May 2019

Published: 2 June 2020

¹Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública & ³Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brazil. ²Universidade Federal do Tocantins (UFT), Araguaína, TO, Brazil. ⁴Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ. ⁵Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brazil. CORRESPONDENCE: S. P. Lopes [samaravelopes@gmail.com]. DESP - Faculdade de Medicina Veterinária - UFRRJ. BR 465, Km 07. CEP 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil.

INTRODUÇÃO

A glicose é uma importante fonte de energia celular [10]. Alterações em seus níveis sanguíneos podem ser utilizadas para avaliação de perfil metabólico [28] e ainda indicar doenças específicas [25].

Em ruminantes várias condições cursam com alterações nos níveis glicêmicos [25], tais como: estresse [21], diabetes mellitus possivelmente induzida pelo vírus da diarreia viral bovina [7,18,29] ou secundário a infestação por trematódeos do gênero *Eurytrema* [24] e enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D [25]. Já a hipoglicemia tem em casos de deficiência de cobalto [31], cetose bovina e toxemia da gestação em pequenos ruminantes [25], intoxicação por *Trema micrantha* [32], complexo hipotermia/exposição/hipoglicemia/inanição [26] e em vacas no período periparto [1].

Existem diversas técnicas de mensuração da glicemia [8,33], porém o método enzimático (ME) é considerado padrão e mais preciso tanto em humanos quanto em animais [9,13]. O College of American Pathologists recomenda o uso do método do glicosímetro portátil (GP) [20], que na medicina humana é utilizada como rotina por se tratar de um método fácil, de custo relativamente baixo [8,35]. Estudos com a utilização do glicosímetro portátil vêm sendo descritos em humanos [33], macacos-prego [17], cães [2,22,27], gatos [19,22], equinos [6,12,30] e apenas um relato nas espécies bovina e ovina [15].

Devido à escassez de relatos sobre o assunto na área o objetivo do estudo, foi comparar no Brasil os resultados da avaliação da glicemia em bovinos obtidos por meio do glicosímetro portátil Accu-Check®¹ com o método enzimático (ME), cujo ainda é considerado padrão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização e animais

Trinta bovinos (*Bos taurus*), mestiços, machos e fêmeas, de diferentes idades, procedentes da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins (EMVZ/UFT), campus de Araguaína e propriedades rurais do município.

Colheita das amostras

As coletas de sangue para a medição de glicose foram realizadas através de punção da veia jugular, com agulha hipodérmica 40x12² e seringa plástica descartável de 10 mL², após tricotomia e antissepsia da

área com solução alcoólica 70%³. Dos 10 mL de sangue coletados, uma gota foi imediatamente utilizada no GP¹, 5 mL armazenados em tubos⁴ contendo fluoreto de sódio, e 5 mL em tubos⁴ contendo EDTA acondicionados em isopor com gelo e enviadas ao laboratório da EMVZ/UFT para o processamento.

A avaliação da glicemia foi realizada no momento da coleta de sangue pelo GP Accu-Check®¹ seguindo as recomendações e instruções do fabricante. As amostras em tubos contendo EDTA⁴ foram processadas segundo Kaneko *et al.* [14] para realização de hemograma em até 2 h após a coleta. As amostras sanguíneas em fluoreto de sódio⁴ foram submetidas a avaliação da glicemia por meio do método enzimático-colorimétrico descrito por Trinder [34], utilizando kits de glicose CELM®⁵ com leitura em espectrofotômetro para ELISA automático⁵, em até 2 h após a coleta.

Statistical analysis

Realizou-se a avaliação da homogeneidade da variância e da normalidade dos resultados por meio do teste de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. O teste T para amostras pareadas foi usado para comparação das médias obtidas por ambos os métodos. O teste para avaliar o comportamento entre os resultados de ambos os métodos foi a Correlação de Pearson. Os resultados obtidos pelo método enzimático foram divididos em quatro categorias com base nos valores do primeiro quartil, mediana e terceiro quartil com objetivo de comparar os resultados dos dois métodos dentro de categorias de resultados. Foram também estimados os valores de sensibilidade, especificidade, índice de concordância Kappa e a área sob a curva ROC dos resultados obtido em GP, utilizando-se o ME como teste padrão de referência. Os pontos de corte para estas análises foram os valores observados para os intervalos interquartílicos. As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 8.0 (Statistical Package for the Social Sciences 8.0)⁶.

RESULTADOS

Os valores glicêmicos obtidos neste estudo com GP e ME variaram entre 62 e 163,3 mg/dL. A primeira categoria apresentou resultados de até 82,0 mg/dL. A segunda categoria os níveis variaram entre 82,1 e 93,0 mg/dL. A categoria seguinte foi composta por resultados entre 93,1 e 103,0 mg/dL e a quarta categoria apresentou valores superiores a 103,1 mg/dL.

As concentrações médias de glicose para os métodos GP e ME foram respectivamente, 93,53 mg/dL e 94,84 mg/dL, sem diferença estatística ($P > 0,05$). Os resultados de avaliação da glicemia gerados por ambos os testes apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,05$) e variâncias iguais pelo Teste de Levene ($P > 0,05$).

Considerando as categorias de resultados com base nos intervalos interquartílicos, foram também observadas variâncias ($P > 0,05$) e médias ($P > 0,05$) iguais entre os resultados de acordo com os métodos avaliados. No Tabela 1 estão apresentados os resultados de média, desvio padrão e correlação considerando-se todos os animais e por intervalo interquartil.

Observou-se que as correlações entre os resultados da glicose de acordo com os métodos foram positivas, e significantes quando foram considerados todos os resultados (73,6%), enfatizando-se o índice de correlação de 76,4% do intervalo entre 82,01 e 93,00 mg/dL (Tabela 1).

A sensibilidade variou de 66,7% a 91,3% e o valor preditivo positivo de 44,4% a 91,3%. Ao se avaliar a sensibilidade e o valor preditivo positivo

do glicosímetro em relação ao método enzimático, verificou-se uma redução à medida que o ponto de corte aumenta. Inversamente, a especificidade e o valor preditivo negativo aumentaram à medida que o ponto de corte aumentou. Neste caso a especificidade variou de 71,4% a 80,0% e o valor preditivo negativo de 71,4% a 90,5%. O maior valor para o índice Kappa foi observado quando o ponto de corte foi de 82,0 mg/dL de glicose no sangue, com 86,7% de concordância entre os resultados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos para ambos testes. Apesar da área sob a curva ROC ter sido maior que 80% para os três pontos de corte, o maior valor (93,2%) foi observado também para o ponto de corte de 82,0 mg/dL de glicose (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Os valores glicêmicos obtidos neste estudo com GP e ME variaram entre 62 e 163,3 mg/dL, o que fez com que a maioria das médias dos valores glicêmicos avaliados estivessem acima de 45 a 75 mg/dL, considerado referência para a espécie [14], esse fenômeno pode ter ocorrido devido ao estresse da manipulação no momento da colheita [21].

Tabela 1. Médias, desvios padrões e correlações da glicose no sangue com o glicosímetro e o método enzimático.

Resultados (mg/dL)	N	Método				Correlação de Pearson	
		Enzimático (mg/dL)		Glicosímetro (mg/dL)		IC	P
		Média	DP	Média	DP		
Todos	30	94,81 ^a	19,24	93,53 ^a	16,53	0,736	<0,001
Até 82,0	7	75,88 ^a	5,39	75,42 ^a	8,38	0,317	0,489
Entre 82,1 e 93,0	8	87,95 ^a	3,88	85,87 ^a	2,64	0,764	<0,05
Entre 93,1 e 103,0	9	97,09 ^a	2,67	98,00 ^a	2,28	0,616	0,077
Superior a 103,0	6	122,57 ^a	23,8	111,44 ^a	14,37	0,334	0,518

^aLetras iguais entre colunas significa igualdade estatística ($P > 0,05$); DP: Desvio Padrão; IC: Índice de Correlação; P: Nível de Significância

Tabela 2. Avaliação dos resultados de índices glicêmicos em bovinos avaliados pelo glicosímetro portátil* em diferentes pontos de corte, considerando o método enzimático** como padrão.

Parâmetro	Ponto de corte para glicose bovina (mg/dL)		
	82,00	93,00	103,00
Sensibilidade	0,913	0,800	0,667
Especificidade	0,714	0,800	0,792
Valor preditivo positivo	0,913	0,800	0,444
Valor preditivo negativo	0,714	0,800	0,905
Índice Kappa	0,867	0,800	0,767
Área sob a curva ROC	0,932	0,887	0,896
Nível de significância da curva ROC	<0,01	<0,001	<0,01

*Accu-Chek® Active / Roche Diagnóstica Brasil Ltda. **Labtest®

Ao avaliar os resultados obtidos pelas categorias não é possível comparar com os dados obtidos com outros autores, cujo trabalho possui similaridades [15], pois estes não citam os valores glicêmicos encontrados em seu estudo. Quando comparado às concentrações médias de glicose obtidas pelos métodos GP e ME, alguns autores [15] relatam que as concentrações médias de glicose obtidas a partir do GP foram significativamente menores do que o ME, tanto em bovinos, quanto em ovinos, e sugerem um fator de correção para o uso do GP. As taxas de erro entre o GP e ME variaram de 1,7 a 7,8%, médias muito menores dos limites estabelecidos pela Food and Drug Administration (FDA), onde cita que o GP não pode fornecer taxas de erro superiores a 20% na concentração da glicemia [5].

Do ponto de vista quantitativo, os métodos geraram variações e médias iguais para todos os resultados bem como para as categorias dos mesmos, mostrando que o glicosímetro pode ser uma alternativa ao método enzimático. Em controvérsia, há relatos que mostram menores valores encontrados no GP devido a glicemia no sangue total estar entre 10 e 15% menor que no plasma [23] e pode ser até subestimado [3,11].

Ao observar os resultados conjuntamente, o GP gerou resultados com alto percentual de concordância e exatidão para os três pontos de corte usados. A área sob a curva ROC é uma medida do desempenho de um teste (índice de exatidão do teste). Um teste totalmente incapaz de discriminar indivíduos doentes e não doentes, teria uma área sob a curva de 0,5 (seria a hipótese nula). Acima de 0,7 é considerado desempenho satisfatório [16]. Os resultados mostram que a área sob a curva ROC foi acima de 85% em todas as situações, sendo que a maior exatidão no menor ponto de corte. Entretanto, deve-se observar a sensibilidade e especificidade para definir o objetivo do diagnóstico.

A comparação da eficácia do GP com o ME tem sido relatada em cães [2,27]. Nesta espécie não há diferença significativa na análise estatística ao nível de 1% de probabilidade entre os métodos. Nos felinos [19] foram observadas diferenças significativas na análise estatística. Resultados semelhantes foram encontrados por em equinos [30]. Porém, há estudos com essa mesma espécie que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores obtidos por meio do GP e ME [6]. Em estudos realizados por outros autores [15] concluíram que, o GP apresenta diferença significativa em relação ao ME na dosagem da glicemia de bovinos

e ovinos, contudo os valores finais podem ser corrigidos a fim de se obter resultados confiáveis para serem utilizados na prática clínica.

Anormalidades no hematócrito do paciente podem afetar o resultado obtido, entretanto todos os animais encontravam-se com os índices de hemograma dentro dos valores de normalidade. Hematócrito abaixo de 30% leva a resultados erroneamente elevados, enquanto hematócrito maior de 55% pode fornecer resultados erroneamente baixos [5,3,11,35]. Entretanto, as principais falhas são provocadas pelo próprio usuário, como aplicação inapropriada da amostra [5], excesso do tempo na realização do exame, falta de manutenção do equipamento e o armazenamento inadequado das tiras-teste [4,8].

O glicosímetro portátil está se tornando uma ferramenta muito útil na prática clínica de pequenos animais, já que estudos vêm demonstrando sua confiabilidade em relação ao ME, que é considerado padrão ouro [2,27]. Esta prática também pode se estender aos bovinos devido à confiabilidade do GP comprovada neste trabalho.

CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que o glicosímetro é uma alternativa para realização da medição da glicose em bovinos, não diferindo de resultados gerados pelo método enzimático. A facilidade e praticidade na execução, o menor custo e a possibilidade de realizar o teste à campo para diagnóstico precoce e prevenção de doenças metabólicas são vantagens elucidadas neste estudo em relação ao método enzimático.

MANUFACTURERS

¹Roche Diagnóstica Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

²Plascalp. Feira de Santana, BA, Brazil.

³Miyako do Brasil Ind. Com. Ltda. Garulhos, SP, Brazil.

⁴Glistab Labtest. Lagoa Santa, MG, Brazil.

⁵CELM. Barueri, SP, Brazil.

Funding. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de financiamento 001.

Ethical approval. Todos os procedimentos, tratamentos e cuidados com os animais estavam em conformidade com as diretrizes do Comitê de Ética da Universidade Federal do Tocantins (UFT) (nº 23101.003563/2015-10).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

REFERENCES

- 1 Adewuyi A.A., Gruysi E. & Van Eerdenburg F.J.C.M. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly*. 27(3): 117-126.
- 2 Aleixo G.S., Coelho M.C.O., Tenório A.P.M., Guimarães A.L.N., Andrade M.B. & Cavalcanti H.B. 2010. Uso do glicosímetro portátil para determinar a concentração de glicose no sangue de cães. *Ciência Animal Brasileira*. 11(3): 537-545.
- 3 Bluwol K., Duarte R., Lustoza M.D., Simões D.M.N. & Kogika M.M. 2007. Avaliação de dois sensores portáteis para a mensuração da glicemia em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(6): 1408-1411.
- 4 Böhme P., Floriot M., Sirveaux M. A., Durain D., Ziegler O., Drouin P. & Guerci B. 2003. Evolution of analytical performance in portable glucose meters in the last decade. *Diabetes Care*. 26(4): 1170-1175.
- 5 Briggs A.L. & Cornell S. 2004. Self-monitoring blood glucose (SMBG): now and the future. *Journal of Pharmacy Practice*. 17: 29-38.
- 6 Bromerschenkel I. 2015. Uso do glicosímetro portátil para a mensuração da glicemia em potros neonatos da raça mangalarga marchador. *Acta Veterinaria Brasílica*. 9(4): 369-374.
- 7 Clark Z. 2003. Diabetes mellitus in a 6-month-old Charolais heifer calf. *The Canadian Veterinary Journal*. 44(11): 921-922.
- 8 Cohn L.A., McCaw D.L., Tate D.J. & Johnson J.C. 2000. Assessment of five portable blood glucose meters, a point-of-care analyzer, and color test strips for measuring blood glucose concentration in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 216(2): 198-202.
- 9 Coles E.H. 1984. Patologia Clínica Veterinária. In: *Metabolismo dos carboidratos e função pancreática*. 3.ed. São Paulo: Manole, pp.260-281.
- 10 González F.H.D. & Silva S.C. 2017. *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*. 3.ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, pp.248-299.
- 11 Fahy B.G. & Coursin D.B. 2008. Critical glucose control: the devil is in the details. *Mayo Clinic Proceedings*. 83(4): 394-397.
- 12 Gerber K.L. & Freeman K.P. 2016. ASVCP guidelines: quality assurance for portable blood glucose meter (glucometer) use in veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*. 45(1): 10-27.
- 13 Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 1997. Clinical biochemistry of domestic animals. In: Kaneko J.J. (Ed). *Carbohydrate metabolism and its diseases*. 5th edn. San Diego: Academic Press, pp.45-81.
- 14 Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th edn. San Diego: Academic Press, pp.45-115.
- 15 Katsoulos P.D., Minas A., Karatzia M.A., Pourliotis K. & Christodouloupoulos G. 2011. Evaluation of a portable glucose meter for use in cattle and sheep. *Veterinary Clinical Pathology*. 40(2): 245-247.
- 16 Kramer M. 1988. *Clinical epidemiology and biostatistics: A primer for clinical investigation and decision making*. Berlin: Springer-Verlag., pp.20-100.
- 17 Luppi M.M., Bastos J.A.B., Malta M.C.C., Costa M.E.L.T. & Pereira M.M. 2007. Estudo comparativo entre métodos de determinação da glicemia em macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. 102(561/562): 75-79.
- 18 Murondoti A., Van der Kolk J.H. & Van der Linde-Sipman. 1999. Type 1 diabetes mellitus in a pregnant heifer persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary Record*. 144(10): 268-269.
- 19 Oliveira Y.S.G., Costa Júnior J.D., Santos-Leonardo A. & de Moraes K.S. 2015. Comparação entre os métodos laboratorial e portátil na análise da glicemia em felinos com amostras de sangue venoso central e capilar. *Ciência Animal Brasileira*. 16(2): 279-286.
- 20 Pascali P.M. 2004. Monitorização da glicemia capilar. *BD Terapêutica em Diabetes*. 9(31): 4-5.
- 21 Petersen H.H., Nielsen J.P. & Heegaard P.M.H. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*. 35(2): 163-187.
- 22 Petritz O.A., Antinoff N., Chen S., Kass P.H. & Paul-Murphy J.R. 2013. Evaluation of portable blood glucose meters for measurement of blood glucose concentration in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 242(3): 350-354.

- 23 Pica C.Q., Menezes J.R.D., Albertazzi J.A. & Camiña R.M. 2003. Avaliação comparativa de glicosímetros portáteis através de curva glicêmica induzida. In: *3 Congresso Brasileiro de Metrologia* (Recife, Brazil). pp.1-7.
- 24 Quevedo P.S., Mendes M., Pappen F.G., Soares M.P., Muller G. & Farias N.A.R. 2013. Chronic interstitial pancreatitis in cattle caused by *Eurytrema coelomaticum*. *Ciência Rural*. 43(8): 1449-1452.
- 25 Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edn. Philadelphia: Elsevier., pp.43-111.
- 26 Riet-Correa F.R., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. 2007. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, pp.417-425.
- 27 Serôdio A.T., Carvalho C.B. & Machado J.A. 2008. Glicemia em cães (*Canis familiaris*) com glucômetro digital portátil e teste laboratorial convencional. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*. 1(1): 25-34.
- 28 Suttle N.F. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock*. 4th edn. London: CABI International, 54p.
- 29 Tajima M., Yazawa T., Hagiwara K., Kurosawa T. & Takahashi K. 1992. Diabetes mellitus in cattle infected with bovine viral diarrhoea mucosal disease virus. *Zentralbl Veterinarmed A*. 39(8): 616-20.
- 30 Teixeira Neto A.R., Botelho R.G., Sousa K.E., Gomes J.L. & Lima E.M.M.D. 2011. Ineficácia do Aparelho Portátil Accutrend® Plus na Clínica Médica de Equinos. *Ars Veterinaria*. 27(1): 17-21.
- 31 Tokarnia C.H., Peixoto P.V., Barbosa J.D., Brito M.F. & Döbereiner J. 2010. *Deficiência de Minerais em animais de produção*. Rio de Janeiro: Helianthus, pp.88-103.
- 32 Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção*. 2.ed. Rio de Janeiro: Helianthus, pp.174-176.
- 33 Tonyushkina K. & Nichols J.H. 2009. Glucose Meters: A Review of Technical Challenges to Obtaining Accurate Results. *Journal of diabetes science and technology (Online)*. 3(4): 971-980.
- 34 Trinder P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*. 6: 24-27.
- 35 Wess G. 2000. Evaluation of five portable blood glucose meters for use in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 216(2): 203-209.