



**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO TESTE ENZIMÁTICO DA
ARYLSULFATASE A EM PLASMA SANGUÍNEO DE CAPRINOS LEITEIROS**

JADER FORQUIM PRATES

SOBRAL-CE

2023

JADER FORQUIM PRATES

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO TESTE ENZIMÁTICO DA
ARYLSULFATASE A EM PLASMA SANGUÍNEO DE CAPRINOS LEITEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Estadual Vale do Acaraú, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Xavier Eloy.

SOBRAL-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

Prates, Jader For

PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO TESTE ENZIMÁTICO DA
ARYLSULFATASE A EM PLASMA SANGUÍNEO DE CAPRINOS
LEITEIROS: Padronização do teste enzimático de Arylsulfatase A
para diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina / Jader For Prates. --
Sobral, 2023.

67 f. il. color.

Orientador: Profª. Dr.ª Ângela Maria Xavier Eloy.

Dissertação - Universidade Estadual Vale do Acaraú,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA, Centro de
Ciências Agrárias e Biológicas

1. Curva Análitica. 2. Espectrofotômetro. 3. CAE. I. Título.

JADER FORQUIM PRATES

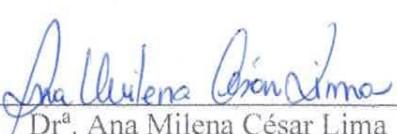
**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO TESTE ENZIMÁTICO DA
ARYLSULFATASE A EM PLASMA SANGUÍNEO DE CAPRINOS LEITEIROS**

Dissertação apresenta
Mestrado em Zootecnia
Estadual Vale do Aca
parcial para obtenção do Título de
em Zootecnia.

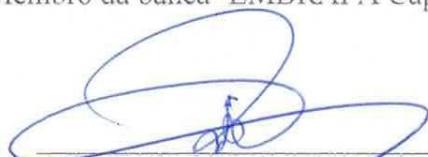
Área de Concentração: Produção
Animal

Dissertação defendida e aprovada em: 25/Agosto/2023 pela comissão
examinadora:


Prof. Dr. Ângela Maria Xavier Eloy
Orientador- Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)


Dr. Ana Milena César Lima
Membro da banca- EMBRAPA Caprinos e Ovinos (Bolsista DCR/ CNPq/ Funcap)


Dr. Francisco Selmo Fernandes Alves
Membro da banca- EMBRAPA Caprinos e Ovinos


Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Membro da banca- EMBRAPA Caprinos e Ovinos

A todos que de alguma forma se empenharam em ajudar e mesmo aos que atrapalharam, sem querer esses também ajudaram a construir e dignificar o presente trabalho e conquistas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus em forma de prece por ter forças e saúde para superar todos os obstáculos para conclusão dessa etapa e obtenção do título de mestre em zootecnia, profissão que muito me gratifica em desempenhar.

Aos meus pais, Carmem Maria Furquim Prates e João Bautista Prates, pela educação e preparação para que um dia realizasse meus sonhos, pelo empenho que tiveram e pelo apoiado nos momentos aos quais precisei.

A meus familiares, obrigado por ter me acolhido e me ajudado, em especial aos tios Natalia Prates Machado e Carlos Roberto Machado que me acolheram em parte da minha vida como estudante, agradecendo a esses em especial, reporto-me a todos os outros familiares de ambas as famílias Forquim (Furquim, Furkin) e Prates.

A Dra. Ângela Maria Xavier Eloy, que foi minha orientadora acadêmica, e sempre esteve disposta a ajudar da melhor forma possível.

A Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) instituição que acolheu e possibilitou a realização do Mestrado Acadêmico em Zootecnia.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa de estudos concedida e pelo financiamento do Projeto, através do Programa BPI.

À Capes, pelo apoio financeiro e suporte ao Mestrado em Zootecnia da UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos.

À Embrapa Caprinos e Ovinos que por meio de seus servidores que possibilitou adquirir conhecimentos extras ao longo de um ano e meio como bolsista, que serão de grande valia para meu desempenho profissional e sempre lembrados com carinho. Também colaboraram para que pudesse fechar mais esse ciclo da minha vida.

À Embrapa Gado de Leite –MG, onde por meio de seus servidores que possibilitou adquirir conhecimentos de base ao longo de quatro anos como estagiário bolsista de iniciação científica, que foram de grande valia para meu desempenho no mestrado.

Ao Dr. Jeferson Ferreira Fonseca, pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, do Núcleo Sudeste, em Minas Gerais, um ser humano especial que tive a felicidade de conhecer, trabalhar e aprender junto. Com muita humildade e serenidade essa pessoa se diferencia e faz a diferença com aqueles que estão próximos, esse foi o grande responsável por essa jornada até Sobral- CE.

Por fim toda a equipe de professores e coordenação do mestrado em zootecnia que deram apoio e contribuição nos estudos. Sempre serei grato!

Muito obrigado a todos!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Mestrando strictu sensu em reprodução e biologia molecular de caprinos Universidade Estadual do Vale do Acaraú- UVA em conjunto com a Embrapa Caprinos e Ovinos, bolsista instituição de fomento FUNCAP. Possui graduação em curso superior de Bacharel em Zootecnia pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Sudeste de Minas Gerais, campus Rio Pomba ano 2018. Estudou Técnico Agrícola com Habilitação em Zootecnia pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Farroupilha campus Alegrete - RS. Foi residente zootécnico junto a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Centro Nacional de Pesquisa em Gado Leiteiro (CNPGL), Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) em Coronel Pacheco - MG no ano 2014. Bolsista do setor de reprodução de caprinos e ovinos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Centro Nacional de Pesquisa em Gado Leiteiro (CNPGL), Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) em Coronel Pacheco - MG (2014-2018). Tem experiência nas áreas de ovinos e bovinos, como produtor rural desde 2004, está constantemente desenvolvendo competências em ovinos, caprinos, bovinos leiteiros e de corte.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XI
RESUMO GERAL.....	XII
GENERAL ABSTRACT	XIII
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3. REFERÊNCIAS	19
4. CAPÍTULO I- Padronização do teste enzimático de Arylsulfatase A para diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina.....	20
 4.1.Resumo.....	21
 4.2.Abstract.....	22
 4.3.Introdução.....	23
 4.4.Material e Métodos.....	24
 4.5.Resultados e Discussão.....	26
 4.6.Conclusões.....	31
 4.7.Referências Bibliográficas.....	32
5. CAPÍTULO II- Validação do teste enzimático em cabras leiteiras, soro positivas ou negativas para Artrite Encefalite Viral Caprina.....	34
 5.1.Resumo.....	35
 5.2.Abstract.....	36
 5.3.Introdução.....	37
 5.4.Material e Métodos.....	37
 5.5.Resultados e Discussão.....	39
 5.6.Conclusões.....	42
 5.7.Referências Bibliográficas.....	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
7. ANEXOS.....	48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - A análise de variância dos dados (ANAVA).....	27
Tabela 2 - Leituras de absorbância das concentrações molares calculadas para definição dos pontos da reta para elaboração da curva analítica a ser estabelecida para o teste de Arylsulfatase A.....	28
Tabela 3 - Análise dos coeficientes da equação da linearidade da reta do gráfico para estabelecer o cálculo de concentração mM de Arylsulfatase.....	30
Tabela 4 - Valores médio de ARSA presentes no plasma sanguíneo de bodes da raça Saanen, avaliados em três concentrações molares do reagente 4- Nitrocatechol.....	32
Tabela 5 - Análise de variância ANAVA dos parâmetros estudados no presente trabalho.....	32

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Teste de medias da concentração de ARSA grupos avaliados pelo teste enzimático realizado por espectrofotometria após padronização para avaliação no plasma sanguíneo de caprinos leiteiros	41
Tabela 2 - Análise de variância dos dados de concentração de ARSA	42

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Avaliação da absorbância em comparação com os pontos de concentração do 4-Nitrocatechol (mM).....	27
Figura 2 – Dispersão das leituras de absorbância em relação as concentrações padrão de 4-Nitrocatechol.....	28
Figura 3 – Linearidade da absorbância da solução 4- nitrocatechol.....	29
Figura 4 – Varredura das soluções padrão de análise.....	31

CAPÍTULO II

Figura 1 – Dispersão média da ARSA em animais negativos para CAE.....	41
Figura 2 – Dispersão média da ARSA em animais positivos para CAE.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARSA	Arylsulfatase A
Nm	Nanomolar
 mM	Milimolar
Nm	Nanometros
 mL	Mililitros
p-NCS	4- Nitrocatechol Sulfato
Nº	Número
%	Porcentagem
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
OIE	Organização Internacional de Saúde Animal
MAPA	Ministério de Agricultura e Pecuária de Abastecimento
ISSN	International Standard Serial Number
UVA	Universidade Estadual do Vale do Acaraú
G	Gramas
°C	Grau Celsius
G	Força Gravitacional
pH	Potencial de Hidrogênio
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

RESUMO GERAL

A Artrite Encefalite Viral Caprina (CAEV), é uma enfermidade clinicamente e economicamente importante, causada pelo vírus do gênero Lentivírus, pertencente à família *Retroviridae*, estando presente, principalmente, em rebanhos caprinos leiteiros, nos sistemas de produção mais intensivo, que possibilitam maior contato entre os animais.

O objetivo deste estudo foi testar a metodologia de diagnóstico enzimático para identificação da Arylsulfatase A (ARSA), em caprinos leiteiros com a infecção pelo CAEV em caprinos leiteiros criados na região nordeste do Brasil. As análises diagnósticas para o estudo foram conduzidas no laboratório de biologia molecular e proteômica da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada em Sobral – CE, na região norte do estado do Ceará. As etapas principais foram a padronização e validação do teste enzimático para avaliação de ARSA em caprinos leiteiros, subdividindo em fases experimentais que foram desde a construção da curva analítica, passando pela avaliação do material analítico e alíquotas de plasma de sangue de 56 animais (30 animais soro positivos e 26 negativos para CAE), perfazendo um total de 152 avaliações em duplicata, com teste já padronizado. Os animais foram testados para CAE, através do teste sorológico *Western Blotting* (WB), sendo sequencialmente realizada a dosagem enzimática de ARSA através da técnica que se baseia em uma hidrólise de quatro horas da enzima ARSA em 4-nitrocatechol substrato sulfato (p-NCS). Os parâmetros de validação do teste enzimático envolveram etapas, como: avaliação da Especificidade, Linearidade, Sensibilidade, Exatidão e Precisão. Foram encontrados os primeiros valores molares médios de referência para o teste diagnóstico enzimático em caprinos (0,064 mM em caprinos machos castrados e 0,074 em cabras). Os parâmetros avaliados da técnica, são iniciais mas podem ser considerados validos e pioneiros para se estabelecer o perfil de Arylsulfatase A (ARSA) em caprinos leiteiros. Necessitam mais avaliações em futuras pesquisas que venham conferir robustez a técnica com o aumento no número de análises realizadas para poder diagnosticar animais com CAE.

Palavras-chave: Curva Analítica, CAE, Espectrofotômetro, *Western Blotting*.

GENERAL ABSTRACT

Caprine Viral Encephalitis Arthritis (CAEV) is a clinically and economically important disease caused by the virus of the genus Lentivirus, belonging to the Retroviridae family, being present mainly in dairy goat herds, in the most intensive production systems, which allow greater contact between animals. The aim of this study was to test the methodology of enzymatic diagnosis for the identification of Arylsulfatase A (ARSA), in dairy goats with CAEV infection raised in northeastern Brazil. The diagnostic analyses for the study were carried out at the molecular biology and proteomics laboratory of Embrapa Goats and Sheep, located in Sobral – CE, northern Ceará. The main steps were the standardization and validation of the enzyme test for the evaluation of ARSA in dairy goats, subdividing into experimental phases that ranged from the construction of the analytical curve, through the evaluation of the analytical material and evaluation of blood plasma aliquots of 56 animals (30 positive and 26 negative for CAE), making a total of 152 duplicate evaluations, with a standardized test. The animals were tested for CAE using the Western Blotting (WB) serological test, the enzymatic dosage of ARSA was sequentially performed using the technique that is based on a four-hour hydrolysis of the ARSA enzyme in 4-nitrocatechol sulfate substrate (p-NCS). The validation parameters of the enzyme test involved evaluative steps such as: evaluation of Specificity, Linearity, Sensitivity, Accuracy and Precision. The first mean molar reference values for the enzymatic diagnostic test in goats were found (0.064 mM in castrated male goats and 0.074 in goats). The evaluated parameters of the technique can be considered valid and pioneering to establish the Arylsulfatase A (ARSA) profile in dairy goats. More evaluations are needed in future studies that will give robustness to the technique with the increase in the number of analyzes performed to be able to diagnose animals with CAE.

Keywords: Dairy goat, CAE, Enzymatic Test, Western Blotting.

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A criação de pequenos ruminantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), vem crescendo significativamente, a produção de caprinos ultrapassa 11 milhões de animais, tornando-se um fator de visibilidade na região do Nordeste do Brasil.

A caprinocultura leiteira é uma das atividades pecuárias que demanda ações efetivas e inovadoras na área de conhecimento e tecnologias. Avanços importantes têm sido alcançados, principalmente no que se refere às características zootécnicas, no que tange aos aspectos produtivos e reprodutivos influenciados, em especial, por inovações diagnósticas como a proteômica.

Esse ramo das ciências biológicas tem se destacado por permitir desenvolver análises complementares e funcional do genoma e vem sendo usado, dentre outras aplicações, para elucidar a biologia de microrganismos e detectar marcadores moleculares que auxiliarão nos diagnósticos e prognósticos envolvidos nas patogenias infecciosas.

Com o passar dos anos, os produtores rurais visaram melhorar geneticamente seus rebanhos e intensificaram a comercialização de animais importados. Entretanto, essa atividade ocasionou a entrada de doenças e preocupações zoosanitárias em nível de rebanhos nacionais. Conforme notificado pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2018), dentre as enfermidades transmitidas, citam-se os *Lentivírus* de pequenos ruminantes (LVPR), como a Artrite Encefalite Caprina (CAE) e Maedi-Visna, patologias estas de cunho veterinário e zootécnico, devido a grandes prejuízos produtivos socioeconômicos.

A Artrite Encefalite Viral Caprina (CAEV), é uma enfermidade clinicamente e economicamente importante, causada pelo vírus do gênero *Lentivírus*, pertencente à família *Retroviridae*, estando presente, principalmente, em rebanhos caprinos leiteiros, nos sistemas de produção mais intensivo, que possibilitam maior contato entre os animais.

Atualmente, o teste imunodiagnóstico IDGA não têm apresentado um índice de precisão satisfatório quando comparado ao teste Western Blotting, isso ocorre devido a momentos em que não há soroconversão da doença e assim não é possível detectar a resposta imune ao vírus, direcionando, assim, a um número significativo de resultados falsos negativos.

Recentemente enzimas como a Arilsulfatase A (ARSA), mostraram-se promissoras para diagnósticos, haja visto que a biologia molecular e a proteômica vem identificando potenciais marcadores para diagnósticos clínicos.

Fatores metabólicos indicam que a ARSA provavelmente possa estar relacionada ao controle do metabolismo de sulfamidas, envolvidas na resposta imunológica do organismo animal em relação ao controle de infecções e suas sintomatologias.

Estudos dessa enzima na medicina humana, possuem resultados precisos no monitoramento do controle e diagnóstico de doenças como a Leucodistrofia Metacromatídica Humana (MLD), esses veem sendo empregados e estão sendo consolidados como técnica de análise laboratorial.

Na área da medicina veterinária e zooteconomia os estudos ainda são incipientes, em relação as enzimas presentes em caprinos infectados ou não pelo vírus da CAE, uma vez que a doença ainda apresenta lacunas a serem esclarecidas quanto ao seu diagnóstico e patogenia.

O tema proposto para essa dissertação de mestrado, será abordado, exposto e discutido ao longo de dois capítulos, nos quais serão estudados e avaliados o comportamento da concentração molar de ARSA e sua relação com caprinos positivos ou negativos para CAE por teste de *Western Blotting* (WB) e Imuno Diagnóstico em Gel de Agarose (IDGA) no plasma sanguíneo de caprinos leiteiros e a relação com esses testes sorológicos.

A Hipótese desafio (H1) do presente estudo é analisar o nível padrão da presença da ARSA no plasma sanguíneo de caprinos infectados por CAEV. A hipótese nula (H0) seria que não haveria diferença entre os níveis de ARSA no plasma sanguíneo de animais positivos ou negativos para o vírus.

O estudo tem como proposta principal, testar a metodologia diagnóstica enzimática de identificação da Arylsulfatase A (ARSA), para diagnóstico da infecção pela CAEV, em caprinos leiteiros criados na região Nordeste. Para isso, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos, contando ainda com um referencial teórico e acrescidos das considerações finais:

I. No capítulo I, serão apresentados os resultados da padronização da técnica e definição da concentração do reagente e o tipo de material a ser utilizado na análise;

II. No capítulo II, serão discorridos os resultados da avaliação da ARSA em caprinos leiteiros e definição da concentração molar obtida a fim de ser utilizado para validar o método de análise.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença viral infectocontagiosa, pertencente à família *Retroviridae*, estudos mostram que os *Lentivírus* possuem uma gama de diversidade filogenética de grupos, devido a uma linhagem mutável. Tanto CAEV como, Maedi-Visna, possuem genótipos de ancestrais em comum, sendo essa uma característica particular para cruzarem barreiras interespécies (Rodrigues *et al.*, 2023).

O vírus da CAEV possui tropismo principalmente por células monócitos/macrófagos e células dendríticas. Estas, sinalizam por meio de citocinas respostas biológicas para defesa contra os microrganismos invasores (Feitosa, 2011).

Os processos inflamatórios gerados pela doença, produzem monócitos e fagocíticos que geram várias substâncias como a histamina e o acúmulo de sulfatides que por consequência aumentam a atividades da Arylsulfatase A. Entretanto, os *Lentivírus* dispõem de alta capacidade de “desvio” dos mecanismos de defesa, favorecendo a adaptabilidade e a variedade genética dentro das células (Rodrigues *et al.*, 2018; Michiels *et al.*, 2020).

Os animais com CAE desenvolvem sinais clínicos como artrite, pneumonia, encefalite e mastite. Todavia, é uma enfermidade que prejudica principalmente os caprinos leiteiros, visto que, é uma variação sintomatológica que desenvolvem quadros clínicos e subclínicos da doença (Leite *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2023).

A glândula mamária das cabras é uma das regiões que mais é acometida pela doença, devido ao declínio da produtividade leiteira afetando de forma desordenada a qualidade produtiva dos caprinos leiteiros conforme relatam pesquisas recentes (Pinheiro *et al.*, 2020). Ademais, as afecções respiratórias e nervosas também são desencadeadas, entretanto o surgimento de sintomatologia nervosa, ocorre mais em animais jovens (Cirone *et al.*, 2019; Martins, 2022)

A Arylsulfatase é uma enzima biológica, responsável por funções relacionadas ao controle do metabolismo das sulfatides envolvidas em processos inflamatórios, que podem em condições normais, serem responsáveis pela inibição da replicação do vírus CAEV e pelo controle do processo inflamatório causado pela artrite encefalite caprina CAE (Virgens, 2010; Pinheiro *et al.*, 2023).

Em estudo pioneiro com caprinos através da proteômica identificou a expressão equivalente a treze proteínas diferentes em animais infectados ou não pela CAE, essas relacionadas à reprodução, sendo elas as seguintes: Espermadhesin Z13-like, Bodhesin e Bodhesin-2, Lipocalin, Proteína PDC-109-like e Albumina. Sugerindo um indicativo de que a

reprodução não foi alterada durante a infecção pelo CAEV, porém, Bezerra Junior *et al.*, (2015) relatam que no plasma seminal de animais infectados foram identificadas proteases como a enzima Arilsulfatase A.

Os resultados do estudo supracitado indicam a possível reação do sistema imuno inato em caprinos cronicamente infectados pela CAE, surgindo promissoramente como possível marcador molecular a Arilsulfatase A que apresenta função ligada ao controle do vírus através da quebra das sulfatides (Ferrante *et al.*, 2002; Bezerra Junior *et al.*, 2015).

Como a enzima arilsulfatase A participa de os eventos fisiológicos da fecundação em touros e ovinos, e foi relatada como ausente em caprinos soronegativos para CAEV, entende-se que provavelmente a principal função desta enzima em caprinos pode estar relacionada ao metabolismo controle de sulfatides, envolvidos no controle do vírus (Torres *et al.*, 2005).

A Arylsulfatase (ARSA) é responsável pela desulfatação dos sulfatídeos, que são compostos químicos orgânicos que possuem 1-galactosylceramida em uma ligação sulfato, essa enzima faz a lise do acúmulo dos sulfatídeos no organismo animal (Laidler *et al.*, 1985; Pereira, 1994; Martino *et al.*, 2005; Virgens, 2010).

Em seres humanos a ARSA vem sendo estudada para fins do tratamento e identificação da leucodistrofia metacromatídica humana (MLD), essa doença é autossômica recessiva de depósito lisossômico, caracterizando-se pelo acúmulo lisossomal de glicolipídios sulfatados especialmente o glicolipídio 3-O-sulfogalactosil (sulfato de galactocerebrosídeo), produto do defeito da hidrolase lisossomal da ARSA (Gadella *et al.*, 1991).

A completa realização do ciclo catabólico dos sulfatides que resultaram na disponibilização de metabolitos secundários que são destinadas as rotas glicolíticas e de catabolismo proteico (Gadella *et al.*, 1991; Moura *et al.*, 2010).

Os glicolipídios contendo o sulfatídeos 3-O-sulfogalactosil localizam-se, em sua grande maioria, na bainha de mielina dos neurônios centrais e periféricos, em pessoas acometidas, pela MLD, sendo as manifestações clínicas, predominantemente, de natureza neurológica, assim como alguns sintomas relacionados a CAE em caprinos.

Histopatologicamente, a MLD promove a desmielinização dos nervos centrais e periféricos, portanto com o acúmulo de glicolipídios sulfatados nos lisossomos há uma coloração metacromática manifestada nos tecidos. A gravidade final da doença é uma consequência de quanto ou quão pouca atividade enzimática residual permanece na presença de uma determinada mutação do gene responsável pela expressão da ARSA (Matzner; Gieselmann, 2005).

No plasma seminal e nos espermatozoides de mamíferos encontram-se altos níveis de ARSA e esse é também um componente da cauda do epidídimo espermático de touros (Gadella *et al.*, 1991, Moura *et al.*, 2010), também podendo participar do processo de ligação dos espermatozoides na ligação com o óvulo e formação da célula embrionária (Gwathmey *et al.*, 2006).

De acordo com o reportado por Bezerra Júnior *et al.*, (2018), a Arylsulfatase A é uma enzima que reduz ou hidrolisa as sulfatides, essa é uma molécula multifuncional que desempenha um papel fundamental em vários processos dos sistemas fisiológicos como: o sistema nervoso, o sistema imunológico, secreção de insulina, coagulação do sangue, infecção viral e infecção bacteriana. E que promissoramente pode ser associada a algumas doenças virais similares ao CAEV, como o HIV-1 (Matzner *et al.*, 2005; Takahashi; Suzuki, 2012; Xiao *et al.*, 2013).

3. REFERÊNCIAS

- BEZERRA JUNIOR, R. Q. ; ELOY, A. M. X. ; FURTADO, J. R. ; PINHEIRO, R. R. ; ANDRIOLI, A. P. ; MORENO, F. B. M. B. ; LOBO, M. D. P. ; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. ; MOREIRA, R. A. ; PINTO, T. M. F. ; TEIXEIRA, M. F. S. . A panel of protein candidates for comprehensive study of Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) infection. *Tropical Animal Health and Production*, p. 1573-7438, 2017.
- BEZERRA JUNIOR, R.; ELOY, A. M. X. ; PEREIRA, E. P.; Furtado, J.R.; SOUZA, K. C.; LIMA, A. R.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M. F. S.. Avaliação das metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae* (online), v. 43, 2015.
- BEZERRA, A. O.; STARLING, R. Z. C.; SENHORELLO, I. L. S.; FERREIRA, P. G.; CLIPES, R. C.; DONATELE, D. M. Artrite encefalite caprina. *Pubvet*. n.8, v.21. 2015.
- CIRONE F.; MAGGIOLINO A.; CIRILLI M.; SPOSATO A.; DE PALO P.; CIAPPETTA G.; PRATELLI A. Small ruminant lentiviruses in goats in southern Italy: Serological evidence, risk factors and implementation of control programs. *Veterinary Microbiology*, n. 228, p. 143–146. 2019.
- DE SOUSA, A. L. M.; PINHEIRO, R.R.; ARAUJO, J.F; PEIXOTO, R.M.; DE AZEVEDO, D. A. A.; LIMA, A. M.C.; CANUTO, K.M.; RIBEIRO, P. R.V.; SOUZA, ANA S.de Q.; SOUZA, S.C.R.; DE AMORIM, S. L.; AMARAL, G.P.; DE SOUZA, V.; DE MORAIS, S.M.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M.F. da S. In vitro antiviral effect of ethanolic extracts from *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* against goat lentivirus in colostrum and milk. *Scientific Reports*, v. 13, p. 4677, 2023.
- FEITOSA, A. L. V. L. **Caracterização molecular de lentivírus de pequenos ruminantes isolados no Brasil. 2011.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2011.
- FERRANTE, R. J.; ANDREASSEN, O. A.; DEDEOGLU, A.; FERRANTE, K. L.; JENKINS, B. G.; HERSCHE, S. M.; BEAL, M. F. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Journal Neuroscience*, v.22, p.1592–1599, 2002.
- GADELLA BM, COLENBRANDER B, LOPES-CARDOZO M. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. *Biology of Reproduction*, v. 45, n. 3, p. 381 – 386, 1991
- GREENE, C. J., NGUYEN, J. A., CHEUNG, S. M., ARNOLD, C. R., BALCE, D. R., WANG, Y. T., YATES, R. M. Macrophages disseminate pathogen associated molecular patterns through the direct extracellular release of the soluble content of their phagolysosomes. *Nature communications*, n. 13, v. 1, 3072, 2022.
- GWATHMEY, T.M.; IGNATZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*, v.75, n. 4, p.501-507, 2006.

- LEITE, B. L. S., MODOLO, J. R., PADOVANI, C. R., STACHISSINI, A. V. M., CASTRO, R. S., SIMÕES, L. B. 2004. Avaliação da taxa de ocorrência da artrite-encefalite caprina a vírus pelas regionais do escritório de defesa agropecuária do estado de São Paulo, Brasil, e seu mapeamento por meio de sistema de informações geográficas. **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 71, vol. 1, n. 21-26, 2004.
- MARTINO, S.; CONSIGKIO, A.; CAVALIERI, C.; TIRIBUZI, R.; COSTANZI, E.; SEVERINI, G.M.; EMILIANI, C.; BORDIGNON, C.; ORLACCHIO, A. Expression and purification of a human, soluble Arylsulfatase A for Metachromatic Leukodystrophy enzyme replacement therapy. **Journal of Biotechnology**, n.117, p. 243-251, 2005.
- MARTINS V. J. R. 2022. Soroprevalência e fatores de risco associados à presença de Lentivírus dos pequenos ruminantes em 28 explorações no concelho de Bragança [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV-Universidade de Lisboa.
- MATZNER, U.; GIESELMANN, V. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy. **Expert Opin Biol Ther**, n . 5, p. 55-65, 2005.
- MATZNER, U.; HERBST E, HEDAYATI KK, LÜLLMANN-RAUCH R, WESSIG C, SCHRÖDER S, EISTRUP C, MÖLLER C, FOGH J.; GIESELMANN V. Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. **Human Molecular Genetics**, n. 14, 1139-1152, 2005.
- MICHIELS, R.; ADJADJ, N. R.; DE REGGE, N. Análise filogenética de pequenos lentivírus ruminantes belgas suporta a transmissão de vírus entre espécies e identifica novas cepas de subtipo B5. **Patógenos**, n. 3, v. 9, p. 183, 2020.
- MOURA, P.P.; FRANCO, M.M.; SILVA, T.; ROCHA, T.L.; LEAL, D.R.; PASSOS, P.I.B.; NEVES, J.P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do semen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, v.40, n. 5, p.1154-1159, 2010.
- PEIXOTO, R. M. ; ANDRIOLI, A. ; PINHEIRO, R. R. ; SOUZA, K. C. ; ARAUJO, J. F.; SOUSA, A. L. M. ; LOPES, ANA KELRY CARNEIRO ; PINHEIRO, R. R. Immune response dynamics of recent and chronic small ruminant lentivirus infection in the male reproductive system. **Semina-Ciencias Agrarias**, v. 44, p. 185-202, 2023.
- PEREIRA, M.L.S (1994) Molecular and biochemical characterization of defects in the arylsulphatase A gene. Division of Medical and Molecular Genetics. United Medical and Dental Schools of Guy's and St Thomas' Hospital. Tese de doutorado, Universidade de Londres, Londres.
- PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, R.; SIDER, L. H.; ELOY, A. M. X.; ALVES, F. S. F.; FROTA, M. N.L. 2020. Orientações de controle da artrite encefalite caprina em rebanhos leiteiros: conviver mantendo a produção. **EMBRAPA**, comunicado técnico 198.
- RODRIGUES, A. S., PINHEIRO, R. R., BRITO, R. L. L., ANDRIOLI, A., OLIVEIRA, E. L., SIDER, L. H., TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação de um controle estratégico da artrite encefalite caprina em rebanho caprino leiteiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n 70, p.139-146, 2018.

RODRIGUES, C. S., DE FARIA, D. A., LACERDA, T. S. A., PAIVA, S. R., CAETANO, A. R., BLACKBURN, H., MCMANUS, C. Lentivirus Susceptibility in Brazilian and US Sheep with TMEM154 Mutations. **Genes**, n. 14, v. 1, p. 70, 2023.

TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T. Role of Sulfatide in Normal and Pathological Cells and Tissues. **Journal of Lipid Research**, n 53, p. 1437-1450, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R026682>

TORRES, A.N.; MATHIASON, C.K.; HOOVER, E.A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**, n. 5, v. 1, p. 332: 272-83, Feb 2005. doi: 10.1016/j.virol.2004.10.050. PMID: 15661159.

VIRGENS M. Y. F. 2010. Caracterização molecular do gene da arilsulfatase a em pacientes brasileiros com leucodistrofia metacromática eanálise estrutural da enzima [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: UFRGS-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

XIAO, B.; SANDERS, M. J.; CARMENA, D. B.; NICOLA, J.; HAIRE, L. F.; UNDERWOOD, E. P.; BHAKTI, R.; HEATH, R. B.; WALKER, P. A.; HALLEN, S. G.; FABRIZIOMARTIN, S.R.; CARLING, D. G.; STEVEN, J. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. **Nature Communications**, n.4, 3017, 2013.

CAPÍTULO I

Padronização do teste enzimático de Arylsulfatase A para diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina

Artigo a ser encaminhado ao Periódico: *Semina- Ciências
Agrárias*

(ISSN 1679-0359)

Qualis CAPES A4

1 Padronização do teste enzimático de Arylsulfatase A para diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina**2 Standardizing of the Arylsulfatase A enzymatic test for the diagnosis of Arthritis Encephalitis in goats**3 Jader Forquim Prates^{1*}; Zenaide Sousa Olímpio¹; Natiely Milly Ramos Gomes²; Ana Milena4 César Lima², Ângela Maria Xavier Eloy²; Raymundo Rizaldo Pinheiro²; Francisco Selmo Fernandes Alves².5 ¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral, Ceará,
6 Brasil.7 ²Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPC), Departamento de Sanidade Animal, Sobral, Ceará, Brasil.

8

9 Artigo a ser submetido ao periódico Artigo a ser submetido ao

10 periódico Semina- Ciências Agrárias

11 Highlights12 A curva-padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância (*A*) e os de concentração;

13 Limite da linearidade da reta para concentração mM do reagente 4-Nitrocatechol;

14 Concentração de 0,400 mM na faixa de absorbância entre 2100 e 2300 nm.

15 Resumo16 O objetivo deste estudo foi padronizar a técnica de Arylsulfatase A humano para uso do teste enzimático como
17 ferramenta de diagnóstico da CAE em caprinos. O estudo foi conduzido no laboratório de Biologia Molecular
18 e Proteômica da Embrapa Caprinos e Ovinos. Foram analisadas as concentrações molares do reagente 4-
19 Nitrocatechol (SIGMA- ALDRICH^(R)) $\geq 96\%$ calculadas em (0,05 mM, 0,100 mM, 0,200 mM, 0,300 mM
20 0,400 mM, 0,500 mM, 0,600 mM, 0,700 mM, 0,800 mM), utilizou-se para as leituras o aparelho
21 espectrofotômetro BioDrop Duo (7444 V2.0.3). A análise de dados utilizou os pacotes básicos da plataforma
22 R, observando a relação dos desvios padrão, coeficientes de variação e dispersão dos dados. Houve
23 crescimento exponencial das leituras para as concentrações de 0,05 mM até 0,6 mM. Para as concentrações
24 testadas superiores a 0,6 mM foi observado o vértice platô da curva analítica onde não houve diferença
25 significativa nas variações da leitura de absorbância. Através da equação $y = 4500,333x + 611,867$, $R^2 = 0,962$,
26 CV = 5,62, Desvio Padrão = 135,75, estabeleceu-se através da transformação matemática a equação $X = (Y -$
27 611,87) / 4500,33 para expressar a concentração mM da Arylsulfatase A em caprinos leiteiros. Conclui-se que
28 a equação matemática e a concentração mM proposta atendem aos parâmetros avaliados para expressar os
29 melhores resultados para a quantificação da ARSA em caprinos.30 **Palavras chaves:** 4- Nitrocatechol, caprinos, concentração molar, espectrofotômetro

31

32 **Abstract**

33 The objective of this study was to standardize and adjust the human Arylsulfatase A technique for use of the
34 enzymatic test as a diagnostic tool in Goats. The study was conducted in the Molecular Biology and Proteomics
35 laboratory at Embrapa Caprinos e Ovinos. The molar concentrations of the reactant 4- Nitrocatechol (SIGMA-
36 ALDRICH(R)) \geq 96% were analyzed, calculated as (0.05 mM, 0.100 mM, 0.200 mM, 0.300 mM, 0.400 mM,
37 0.500 mM, 0.600 mM, 0.700 mM, 0.800 mM), The BioDrop Duo spectrophotometer device (7444 V2.0.3)
38 was used for readings. Data analysis used the basic packages of the R platform, observing the relationship of
39 standard deviations, coefficients of variation and data dispersion. There was exponential growth in readings
40 for concentrations from 0.05 mM to 0.6 mM. For the concentrations tested above 0.6 mM, the plateau vertex
41 of the analytical curve was observed, where there was no significant difference in the variations in the
42 absorbance reading. Using the equation $y= 4500.333x +611.867$, $R^2= 0.962$, $CV= 5.62$, Standard Deviation =
43 135.75, the equation $X= (Y- 611.87) / 4500.33$ was established through mathematical transformation to express
44 the mM concentration of Arylsulfatase A in dairy goats. The criterion adopted for defining the analytical curve
45 was the lowest coefficient of variation and the lowest standard deviation in relation to the concentration
46 obtained for each molar concentration range tested. No differences ($P<0.05$) were found for the parameters
47 evaluated in relation to the concentrations tested when the analysis was performed with blood plasma. For all
48 concentrations tested there was difference between serum and plasma. The best molar concentration interval
49 adopted to standardize the test was 0.400 mM due to the evaluation of the better feasibility of the technique.
50 Through the equation $y= 4500.333x +611.867$, $R^2= 0.962$, $CV= 5.62$, Standard Deviation = 135.75, defined
51 through the mathematical transformation of the equation $X= Y- 611.87/ 4500.33$ to express the mM
52 concentration of Arylsulfatase in dairy goats, the molar concentration in plasma or serum of dairy goats was
53 obtained. It is concluded that the mathematical equation and the proposed mM concentration meet the
54 parameters evaluated to express the best results for the quantification of ARSA in goats.

55 **Keywords:** Nitrocatechol, Goats, Molar Concentration, spectrophotometer

56 *Corresponding author - Tel.: + 55 32 999259990

57 E-mail address: jader.forquimprates@yahoo.com.br

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68 **Introdução**

69 A Arylsulfatase ARSA, foi identificada em caprinos através de estudos proteômicos de Bezerra- Junior
70 (2018) utilizando a técnica de eletroforese 2DE. Esse autor relatou a expressão de bandas da enzima em animais
71 positivos para CAE, surgindo com esses estudos a potencialidade da enzima como um marcador molecular
72 para fins de avaliação de algumas doenças. A Leucodistrofia Metacromatídica Humana (MLD), já dispõe de
73 técnica padronizada para avaliação da atividade enzimática da ARSA e diagnóstico rápido da doença, sendo
74 essa um horizonte para os trabalhos com doenças caprinas (Kovacs et. al, 2015).

75 Relatos de Azevedo et al., (2019) reportam o teste *Western Blotting* como sendo o mais sensível na
76 identificação a reação das imunoglobulinas em resposta a infecção viral a CAE, nos testes sorológicos,
77 observando- se os dados dessas pesquisas, foi possível verificar que identificam- se um elevado número de
78 falsos negativos, quando comparamos com o teste de IDGA que é o teste padrão designado pelo Ministério de
79 Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para diagnóstico oficial da CAE (Alves et al., 1997; Pinheiro
80 et al., 2006; MAPA, 2010; Rodrigues et al., 2014).

81 Assim surge promissoramente testes com a leitura de análises em espectrofotômetro como o teste
82 enzimático, que vem sendo empregada em laboratório, tanto para análises como a de proteína total pelo método
83 de Bradford, como para a leitura da concentração de íons e óxidos afim determinar a qualidade da água
84 (Bradford, 1976; Kich & Böckel, 2017). Nos diagnósticos de Arylsulfase A em humanos, essa técnica é
85 empregada com rotina e detém resultados precisos para determinação da doença Leucodistrofia
86 Metacromatídica Humana (MLD). (Kovacs et. al, 2015).

87 Etapa importante para construção de um teste preciso é a padronização dos métodos analíticos,
88 portanto, devem ser observados pontos importantes, dentre eles a necessidade de construir uma curva analítica
89 do reagente 4 Nitrocatechol, bem como, conhecer o material analítico e a estabelecer concentração ideal desse
90 reagente. Essas etapas utilizadas durante a confecção e padronização de um método são necessárias para
91 obtenção de resultados precisos na concentração enzimática (Rocha & Teixeira., 2004; Compri-Nardy et al.,
92 2009; Kovacs et. al, 2015; INMETRO, 2020).

93 O objetivo desse estudo foi padronizar o teste de Arylsulfatase A em caprinos com CAEV, a fim de
94 elaborar a curva analítica, estabelecer o material analítico e as concentrações molares do reagente 4-
95 nitrocatecol para aplicação do teste enzimático como ferramenta para diagnóstico.

96 **Material e Métodos**

97 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa
98 Caprinos e Ovinos, sob registro no protocolo de nº 006/2020.

99 A construção da curva analítica e leitura das soluções foi conduzido no laboratório de Biologia
100 Molecular e Proteômica da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, Ceará, conduzido nos meses de agosto a
101 outubro de 2022. Foram analisadas as concentrações do reagente 4- Nitrocatechol (SIGMA- ALDRICH^(R)) \geq
102 96% em molaridades calculadas de 0,050 mM, 0,100 mM, 0,200 mM, 0,300 mM 0,400 mM, 0,500 mM, 0,600

103 mM. 0,700 mM e 0,800 mM, para todas as leituras das análises utilizou-se o aparelho espectrofômetro
104 BioDrop Duo (7444 V2.0.3).

105 As unidades experimentais foram compostas da análise de alíquotas de plasma e soro sanguíneo de 20
106 animais caprinos, machos castrados da raça Saanen, em triplicata perfazendo um total de 60 avaliações.

107 As amostras de sangue foram obtidas por meio de venipunção jugular, utilizando-se tubos Vacutainer®
108 com anticoagulante de sódio heparina para obtenção do plasma e tubos sem anticoagulante para obtenção do
109 soro. Foram coletados cerca de 10 mL de sangue de cada animal. As amostras foram centrifugadas a 2000 × g,
110 durante 10 minutos em temperatura de 4 °C. Em seguida, o plasma sanguíneo dos animais foi obtido e
111 armazenado em tubos do tipo eppendorf a -20 °C até a realização dos testes de Imunodifusão em Gel de
112 Agarose (IDGA) e *Western Blootting* (WB).

113 Foram testadas as concentrações 0,200 mM, 0,400 mM e 0,800 mM do reagente 4- Nitrocatechol
114 (SIGMA- ALDRICH®) com pureza mínima 96%, sendo realizada a técnica descrita a seguir:

115 O Teste de Arisulfatase A (ARSA) é um método de dosagem enzimática que promove uma reação de
116 hidrólise ou dissolução em meio ácido (pH= 5,0) por um período de quatro horas da enzima ARSA em 4-
117 nitrocatecol substrato sulfato (p-NCS).

118 O preparo das soluções A, B e C foram realizadas da seguinte forma: Solução A: prepara se uma
119 solução de ácido acético a 1 molar em água destilada Milliq; Solução B: prepara se uma solução de 34,0 g de
120 acetato de sódio ou 20,5g para acetato de sódio anidro em 250 mL de água destilada Milliq e então adicionar
121 111,5 mg de pyrophosphate inorgânico; e 50,0g de cloreto de potássio, constituindo a solução B. Solução C:
122 prepara-se uma solução composta em percentuais aproximados de 30:70 volume/volume, composta de solução
123 A com a solução B, denominada tampão, com pH ajustado para 5,0, o qual excelente para ativação da ARSA.
124 A solução de análise foi preparada em sequência, o qual consistem consiste em pesar 62 mg de 4-nitrocatechol
125 substrato sulfato (p-NCS), diluindo em volume na solução C para as concentrações 0,200 mM, 0,400 mM e
126 0,800 mM.

127 Na etapa de preparo da análise, as amostras de plasma e soro foram descongeladas em banho maria a
128 37 °C e mantidas em refrigeração, executando o procedimento em tubos de ensaio das amostras sondas,
129 controles e branco do espectrofotômetro.

130 Para a amostra sonda de cada animal, adicionou-se 0,24 mL do plasma ou soro sanguíneos em 1,20
131 mL da solução de análise e estes foram incubados durante 4 horas à 37°C usando estufa de ambiente controlado
132 BOD®.

133 No final da incubação adicionou-se 1,20 mL de hidróxido de sódio 1,25 M para interromper as reações
134 das amostras sonda, a fim de finalizar a hidrolisação do ARSA no substrato e promover a viragem para a
135 coloração de análise na cor roxa (500 a 520 nm).

136 Preparo da amostra controle, os controles para esta análise foram adquiridos da leitura sem incubação
137 em tempo inferior a 30 minutos, sendo contabilizados assim contabilizados dois compostos em tubos de ensaio
138 separadamente para um mesmo animal, seguindo as mesmas condições de preparo.

139 No final do preparo sem incubação adicionou-se 1,20 mL de hidróxido de sódio 1,25 M, para
140 interromper as reações das amostras controle, a fim de finalizar a hidrolisação do ARSA no substrato. Em
141 tempo inferior a 30 minuto.

142 Determinação da concentração molar da enzima ARSA- Para mensuração das concentrações molares
143 das sondas, adotou- se um método baseado na diferença entre as concentrações molares das amostras controle
144 correspondente em cada unidade animal. Foi usado o espectrofotômetro Biodrop® com UV-visível em
145 comprimento de onda de 515 nm. Os cálculos para unidade de medida utilizada para a concentração do
146 substrato ARSA p-NCS foi mM/4h. Seguindo o modelo: C= A-B.

147 Onde: C- é a concentração de ARSA, A- é a concentração molar medida na amostra sonda, analisada
148 na curva analítica do espectrofotômetro após 4h de incubação e B- é a concentração molar medida amostra
149 controle, analisada na curva analítica do espectrofotômetro em tempo inferior a 30 minutos.

150 Ambas as amostras são extraídas do plasma sanguíneo de um mesmo animal e as leitura realizadas em
151 tempos distintos. Foram consideradas as normas contidas no manual para avaliação de métodos analíticos
152 proposto pelo (INMETRO, 2020). A sensibilidade do teste foi avaliada pela capacidade do método em
153 distinguir, com nível determinado de confiança com duas concentrações próximas (Amarante et al., 2001).

154 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente causalizado (DIC), com tratamento
155 correspondente as concentrações molares do reagente na solução de análise, sendo o controle composto pelos
156 mesmos animais testados nas diferentes concentrações. Foram utilizadas 60 análises para cada concentração
157 molar testada no grupo de 20 animais, conforme o modelo estatístico $Y_{ij} = M + G_i + \epsilon_{ij}$, em que M = média
158 geral; G_i = efeito do teste, ϵ_{ij} = erro aleatório associado às observações. As variáveis avaliadas foram
159 submetidas aos testes de Shapiro- Wilk e Bartlett, a fim de serem verificados os pressupostos de normalidade
160 e homogeneidade, respectivamente.

161 Os resultados entre os grupos foram comparados pelo teste F, através da Análise de Variância, seguido
162 do teste de Tukey. A análise estatística foi realizada empregando os pacotes base da plataforma R, adotando
163 como parâmetro para o teste de significância o $P < 0,05$.

164 Os critérios de padronização e validação obedeceram aos parâmetros de validação de técnicas
165 laboratoriais e foram observados nas análises realizadas em relação a teste enzimático as etapas:
166 especificidade/seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão (repetitividade, precisão
167 intermediária e reprodutividade), e robustez. Foram consideradas as normas contidas no manual para avaliação
168 de algumas variáveis.

169 A sensibilidade do teste foi avaliada pela capacidade do método em distinguir, com nível determinado
170 de confiança, duas concentrações próximas segundo Amarante et al., (2001). Adotaremos como satisfatória a

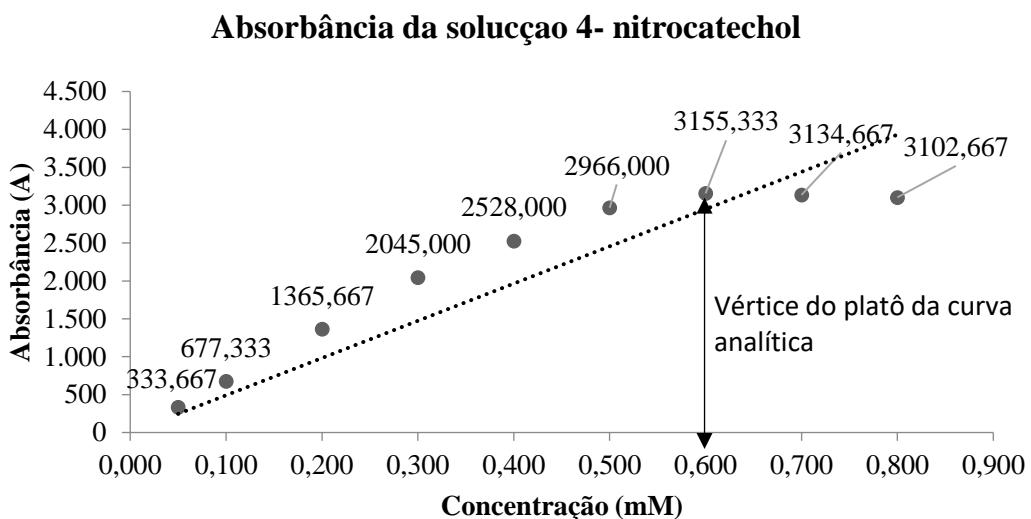
171 linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da
172 unidade (Currie & Svehla, 1994).

173 Considerou-se para definição da melhor equação de reta da curva analítica do reagente Nitrocatechol:
174 $R = 1$ como correlação perfeita; $0,91 < R < 0,99$, correlação fortíssima; $0,61 < R < 0,91$, correlação forte; $0,31$
175 $< R < 0,60$, correlação média; $0,01 < R < 0,30$, correlação fraca e $R = 0$, correlação nula de acordo com a
176 literatura (Natalena et al., 2003).

177 Resultados e Discussão

178 A curva de calibração foi construída medindo-se o sinal analítico de absorbância medida em aparelho
179 espectrofotômetro, em cada uma das soluções previamente elaboradas. Os dados de absorbância obtidos para
180 as concentrações de (0,05 mM até 0,800 mM) são expressos na Fig 1.

181 **Figura 1:** Avaliação da absorbância em comparação com os pontos de concentração do 4- nitrocatechol (mM).



182

183 No eixo ordenada (Y) do gráfico temos a atribuição ao valor do sinal medido e no eixo abscissa (X),
184 a concentração molar do padrão, desta forma pode- se avaliar os pontos no gráfico de acordo com as
185 coordenadas (concentração (x), sinal (y) observando o vértice platô do crescimento da curva a partir da
186 concentração 0,600 mM. Aos pontos onde são observados crescimento de uma reta, podemos aplicar a
187 regressão linear, geralmente por ajuste de mínimos quadrados, para obter a reta que os relaciona e sua função,
188 essa que pode ser observada na análise de variância dos dados na Tab 1.

189 **Tabela 1:** A análise de variância dos dados (ANOVA)

ANOVA					
Modelo	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Sig.
1	Regressão	1	6075900,033	6075900,033	329,710
	Resíduos	13	239563,967	18427,997	0,000 ^b
	Total	14	6315464,000		

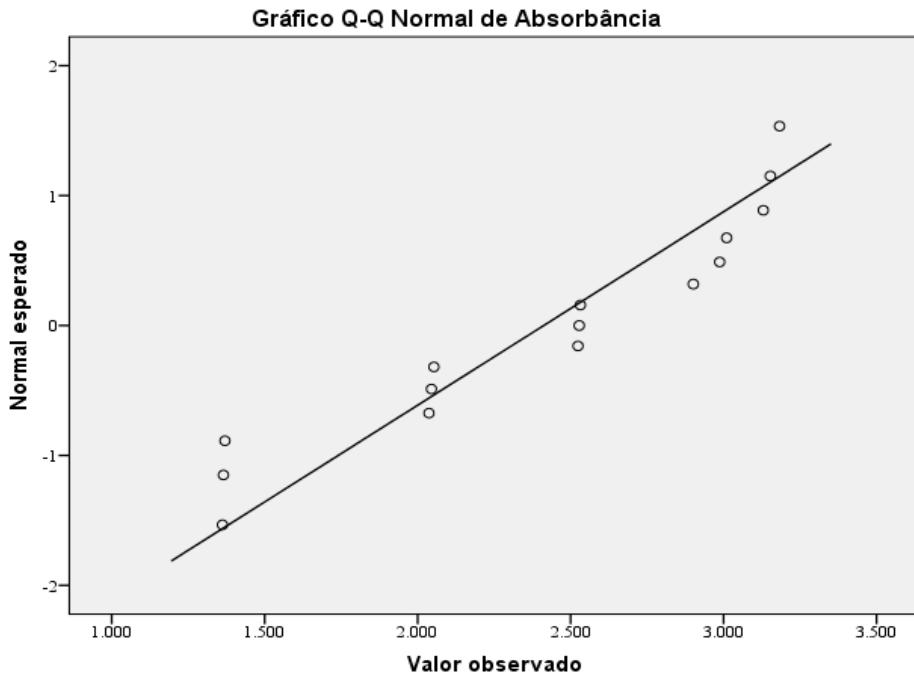
a. Variável dependente: Absorbância

190 b. Preditores: (Constante), Concentração

191

192 Através da avaliação da dispersão dos dados obtidos, encontrou-se a região onde houve o menor desvio
 193 padrão, variação das leituras e dispersão dos dados levando em conta a linha reta tracejada entre os pontos. Na
 194 representação gráfica do programa estatístico R, vemos a distribuição dos pontos de leitura de absorbância no
 entorno da linha reta entre os pontos das concentrações calculadas Fig 2.

195 **Figura 2:** Dispersão das leituras de absorbância em relação as concentrações padrão de 4-Nitrocatechol



196

197 Assim, após analisar a dispersão dos dados, foram selecionados os pontos que serão empregados para
 198 traçar a curva. Os pontos escolhidos para essa finalidade estão detalhados na Tab. 2, a qual mostra os valores
 199 inseridos no espectrofotômetro.

200 201

Tabela 2: Leituras de absorbância das concentrações molares calculadas para definição dos pontos da reta para elaboração da curva analítica a ser estabelecida para o teste de Arylsulfatase A.

Concentração (mM)- Calculada	Absorbância (nm) – Média
0,100	0,677
0,200	1365,667
0,300	2045,000
0,400	2528,000
0,500	2966,000
0,600	3155,333

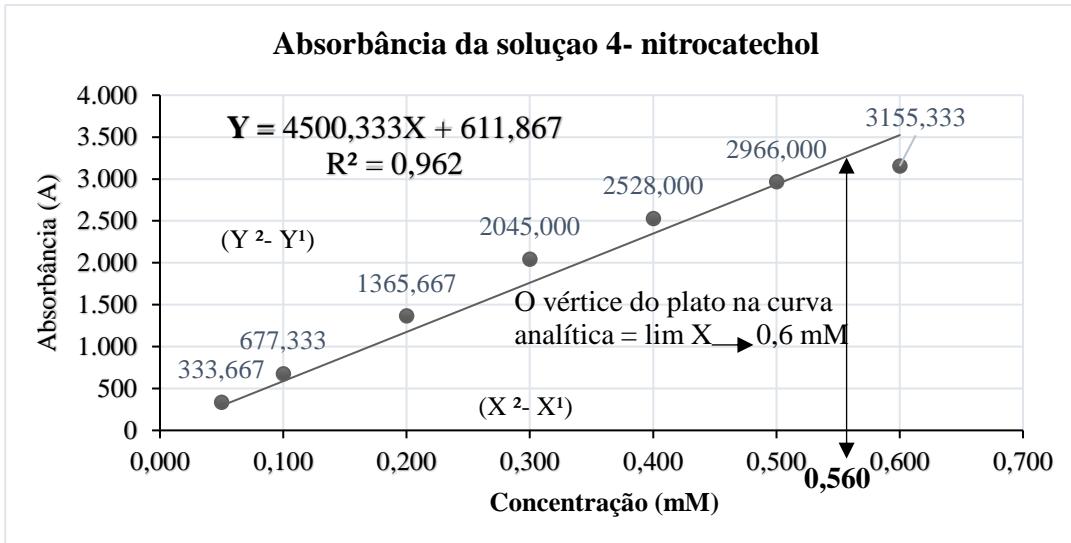
202 203 204 205 206 207

Como temos definidos pelos pressupostos da lei de Lambert & Beer que o limite de linearidade representa o limite de concentração, pode-se aplicar a lei, sendo essa válida para as concentrações até onde o limite matemático tenda a 0,600 mM. Logo, para esse trabalho Lim \rightarrow 0,600 mM, calculando assim 0,560 mM como valor do limite da linearidade da reta para concentração mM do reagente 4-Nitrocatechol na solução de análise. Para concentrações superiores ao limite de linearidade é observado o desvio da lei de Lambert-Beer e assim deixa de existir a proporcionalidade linear entre concentração e absorbância, aumentando assim os erros

208 de leitura no espectrofotômetro, corroborando pelas instruções técnicas contidas no manual de normas técnicas
209 (INMETRO, 2020).

210 A curva-padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância (A) e os de concentração.
211 Na Fig.3, observa- se a análise gráfica onde é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de
212 conversão de valores de absorbância em concentração conforme equação da reta.

213 **Figura 3:** Linearidade da absorbância da solução 4- nitrocatechol



214 Observou-se que o aumento da concentração da substância analisada não altera as características
215 químicas do meio. A principal causa de desvios nas análises são referentes a utilização de soluções
216 concentradas. Essa observação pode ser ilustrada pelo gráfico (Fig. 3), no qual o aumento na concentração é
217 acompanhado pelo aumento crescente e proporcional de absorbância, até um ponto limite. A partir deste ponto
218 (soluções concentradas), deixa de existir a proporcionalidade linear entre os valores.

220 Temos a partir de então que tomando dois pontos da reta, a inclinação é calculada e a concentração de
221 analito medindo no sinal, de acordo com as avaliações realizadas nas soluções padrão do reagente 4-
222 Nitrocatechol. Fica através do presente trabalho proposto, o modelo matemático para cálculo da concentração
223 de Arylsulfatse A, a seguir descrito: $Y = b + mCa$, transformando em $Ca = Y - b / m$.

224 $m = y^2 - y^1 / x^2 - x^1$

225 Y - é a medida do sinal (Absorbância)

226 b - é a ordenada na origem ou interseção da reta na origem de ordenada

227 m - é a inclinação da linha reta

228 Ca - é a concentração do analito representada pelo eixo da abscissa (x).

229 x^1 - é a concentração molar calculada ponto 1

230 x^2 - é a concentração molar calculada ponto 2

231 y^1 - é a absorbância aferida no ponto 1

232 y^2 - é a absorbância aferida no ponto 2

233 Comparando com a equação da reta tem-se: $y = a \cdot (x) + b$. Porém, nem todas as reações colorimétricas
 234 seguem a lei de Lambert-Beer, sendo esta válida para condições restritas, em que: a luz utilizada é
 235 aproximadamente monocromática, as soluções a serem analisadas estejam diluídas (baixas concentrações), não
 236 devem estar presentes na mesma solução mais de uma substância absorvente de luz.

237 Optou- se por adotar como curva padrão o intervalo de concentração molar no qual foi observada a
 238 menor dispersão dos dados de leitura da solução padrão do 4-Nitrocatechol. Isso é claramente representado na
 239 Fig 3,na qual é possível observar a distribuição dos dados de absorbância das concentrações molares padrão
 240 entre 0,05 e 0,600 mM. Ressalta- se que as leituras realizadas em triplicata para cada ponto.

241 Através da análise dos coeficientes da equação linear $y = 4500,333x + 611,867$, com um coeficiente de
 242 determinação (R^2) de 0,962, indicando uma correlação fortíssima conforme descrito por (Natilena et al., 2003),
 243 juntamente com um coeficiente de variação (CV) de 5,62, e um desvio padrão (DV) de 135,75 para as
 244 absorbâncias das concentrações das soluções, é possível obter a concentração em milimolar (mM) da
 245 Arylsulfatase A em caprinos. Isto se dá por meio da transformação matemática $x = (y - 611,87) / 4500,333$. Os
 246 coeficientes para essa equação foram calculados usando o pacote estatístico, conforme indicado na Tab 3.

247 **Tabela 3:** Tabela da análise dos coeficientes da equação da linearidade da reta do gráfico para estabelecer o
 248 cálculo de concentração mM de Arylsulfatase.

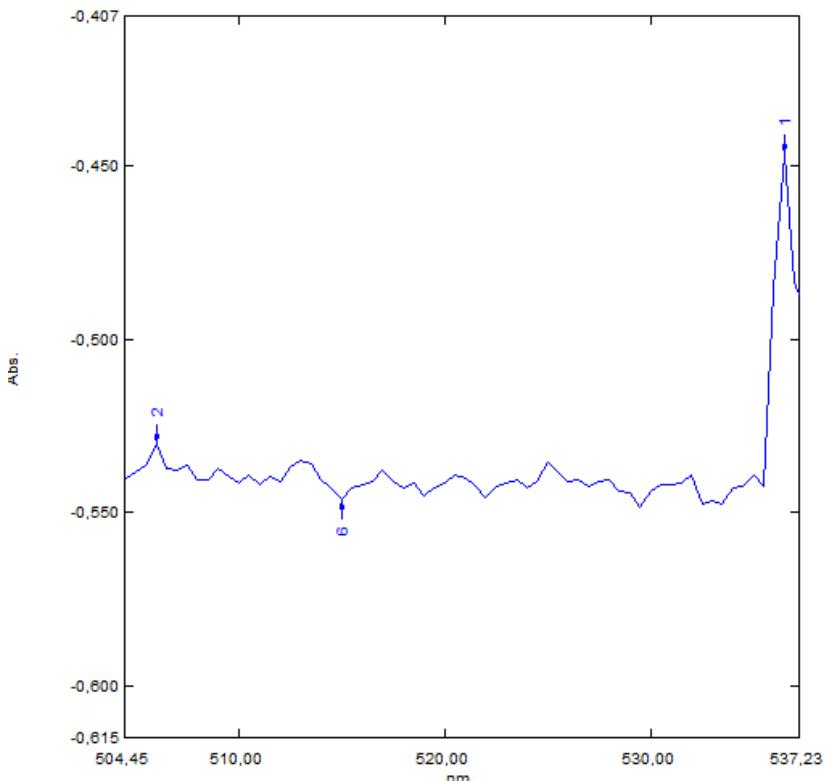
Coeficientes						
Coeficientes não padronizados		Coeficientes padronizados		T	Sig.	Estatísticas de colinearidade
B	Modelo padrão	Beta			Tolerância	VIF
(Constante)	<u>611,87</u>	105,15		5,82	0	
Concentração	<u>4500,33</u>	247,84	0,98	18,16	0	1,00

249
 250 A curva analítica proposta demonstrou ser precisa (significância= 0) para os valores de concentração
 251 encontrados com base no teste estatístico dos coeficientes (angular ≠ zero e linear) da equação da reta. A
 252 definição da faixa de trabalho começa pela seleção de uma faixa preliminar onde é possível identificar o
 253 crescimento linear da medida do sinal em relação à concentração, a faixa de trabalho deve estar dentro do
 254 intervalo de aplicação previsto para o ensaio, e a concentração provável das amostras será o valor mais próximo
 255 ao valor exato de concentração dentro de um erro padrão calculado estatisticamente para a análise.

256 A validação da equação é sustentada pela significância do teste, indicando que os dados seguem uma
 257 distribuição linear com um coeficiente angular diferente de zero, o que implica em um crescimento linear da
 258 reta. Isso reforça a confiabilidade da relação entre a concentração da substância analisada e o sinal de
 259 absorbância medido conforme corrobora as descrições do autor De Brito et al., (2021).

260 Foi realizada a varredura das soluções de teste preparadas para os trabalhos de avaliação da ARSA,
 261 essas soluções apresentaram-se dentro das características para leitura na faixa de comprimento de onda roxa
 262 (500 a 520 nm) referente a colorimetria da solução, apresentando dois picos em intervalo de comprimentos de
 263 onda de 504,45 nm a 537,23 nm. De acordo com o descrito por Kovacs (2015), a leitura analítica da ARSA
 264 deve ser realizada em 515 nm, sendo essa definida como padrão no presente trabalho para a utilização em
 265 caprinos. Na Fig 4, temos a representação da varredura realizada nas soluções de análise utilizadas para
 266 aferição do comprimento de onda a ser estabelecido para método de análise da ARSA em caprinos.

267 **Figura 4.** Varredura das soluções padrão de análise.



268
 269 Para padronização do material analítico, foram testados tanto o soro quanto o plasma sanguíneo dos
 270 animais. Entretanto, os dados coletados a partir da avaliação do material soro não atenderam aos pressupostos
 271 de homoscedasticidade, levando a decisão de descartar esses dados. A escolha foi então direcionada para
 272 trabalhar com os valores homogêneos obtidos na avaliação do plasma sanguíneo das unidades experimentais.
 273 Essa decisão fundamentada nas constatações de Bezerra Junior (2015), que relatou a presença da ARSA no
 274 plasma seminal de caprinos. A referência a esse estudo reforça a escolha em focar no plasma sanguíneo para a
 275 padronização da técnica, possivelmente devido à uniformidade dos resultados nesse contexto específico.

276 Na Tab 4, são apresentados os valores médios encontrados para ARSA em cada uma das concentrações
 277 molares do reagente, os dados não diferem entre os tratamentos 0,200 mM, 0,400 mM e 800 mM
 278 respectivamente, porém nas leituras de absorbância do tratamento 0,800 mM evidenciamos um maior desvio
 279 padrão nas leituras do espectrofotômetro. A concentração média de Arylsulfatase A encontrada no plasma
 280 sanguíneo dos bodes foi (0,064 mM) média avaliada nas concentrações molares (tratamento) testadas no

281 presente estudo, onde é válida a curva analítica proposta. Não foram encontradas diferenças pelo teste F
 282 ($P>0,05$) para os parâmetros avaliados.

283 **Tabela 4-** Valores médio de ARSA presentes no plasma sanguíneo de bodes da raça Saanen, avaliados em três
 284 concentrações molares do reagente 4- Nitrocatechol.

Tratamentos (mM)	Valores ARSA (mM)
0,800	0,0544 a
0,400	0,0643 a
0,200	0,0630 a

285 De acordo com o teste F, as medias não podem ser consideradas diferentes.

286 A análise do teste de normalidade dos resíduos para os dados brutos não atendeu aos pressupostos da
 287 distribuição normal ($P < 0,05$), sendo necessária a transformação dos dados por meio da extração das suas
 288 raízes (Y transformada: $y^{0.5}$), obtendo-se assim significância para $P= 0,146$. Por sua vez, por meio do teste
 289 de Bartlett, com os dados transformados o pressuposto de homogeneidade das variâncias também foi atendido
 290 ($P= 0,346$). Na Tab. 5, são apresentados os dados obtidos da análise de variância.

291 **Tabela 5.** Análise de variância ANAVA das variáveis estudadas no presente trabalho.

	GL	SQ	QM	F	P r > Fc	CV
Tratamento	2	0,004	0,002	0,741	0,482	
Resíduos	51	0,152	0,003			22,16
Total	53	0,156				

292 Y TRANSFORMADA: $y^{**0.5}$

293 Considerando a avaliação do erro padrão durante as leituras espectrofotométrica para a construção da
 294 curva analítica do reagente 4- Nitrocatechol, foi identificado um menor erro associado ao tratamento com a
 295 concentração de 0,400 mM na faixa de absorbância entre 2100 e 2300 nm. Nessa faixa o erro padrão é menor,
 296 indicando maior precisão nas medições. Também é válido relatar que a faixa de concentração de 0,200 pode
 297 ser utilizada, uma vez que ela está dentro da faixa analítica e a equação para o cálculo da concentração dentro
 298 da curva analítica apresenta um maior valor de R^2 . Isso implica que a relação entre as concentrações e os sinais
 299 de absorbância é melhor explicada nessa faixa, o que pode resultar em estimativas de concentração confiáveis
 300 e precisas.

301 Conclusão

302 Pode-se concluir que a curva analítica proposta atende os parâmetros avaliados e está em acordo com
 303 as normas propostas no manual do Inmetro e trabalhos desenvolvidos com essa técnica. Desta forma, a curva
 304 analítica desenvolvida será utilizada para análise de ARSA e cálculo da concentração molar da enzima por
 305 especificidade do reagente padrão 4-nitrocatecol substrato sulfato (p-NCS). Utilizando a faixa de leitura de
 306 515 nm onde foram realizadas as leituras específicas do estudo, mostrando-se ainda esse como uma alternativa

307 analítica rápida e eficiente para trabalhos que procuram estabelecer o perfil de ARSA em rebanhos caprinos
308 após a padronização do teste.

309 Há uma propensão a redução do tempo de análise, indo desta forma ao encontro dos princípios da
310 química verde. A proposta de um método diagnóstico rápido torna-se interessante para a rotina de análises
311 relacionadas a quantificação enzimática e avaliação da CAE, visando a obtenção de novos testes padronizados.

312 Sobre a avaliação das concentrações molares conclui-se que em 0,200 mM e 0,400 mM pode-se usar
313 sem restrições. Na concentração 0,800 mM mesmo não havendo diferença estatística entre as concentrações
314 avaliadas, pode não estar atendendo aos pressupostos pela lei de Lambert & Beer que excluem leituras de
315 concentração maiores que o platô da curva analítica, para análise por espectrofotometria, o limite da
316 concentração para o qual a lei é válida é 0,560 mM.

317 **Referências Bibliográficas**

318 ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; PIRES, P. C. In: congresso brasileiro de medicina veterinária, 25.;
319 congresso de medicina veterinária do cone sul, 2.; CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA
320 VETERINÁRIA, 13., 1997, Gramado, RS. "A integração científica da medicina veterinária no Cone Sul":
321 anais. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997. p. 119. Resumo IMU-005.

322 AMARANTE JUNIOR, OZELITO POSSIDÔNIO et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão.
323 Cad. Pesq., São Luís, v. 12, n. 1/2, p. 116-131, 2001.

324 AZEVEDO, D.A.A., PINHEIRO, R.R., SANTOS, V.W.S., DAMASCENO, E.M., et al. 2019. Comparação de
325 testes sorológicos e molecular para diagnóstico da artrite encefalite caprina e avaliação clínica da glândula
326 mamária de caprinos leiteiros infectados. *Acta Scientiae Veterinariae*. 47: e 1668. 2019

327 BEZERRA JÚNIOR, R. Q; ELOY, A. M. X; PERREIRA, E. P. et al. Avaliação das
328 metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados. **ActaScientiae**
329 **Veterinariae**, 43:1258, 2015.

330 BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein
331 utilizing the principle of protein-dye binding. *Bioquímica Analítica* 72: 248-254. 1976

332 COMPRI-NARDY, M.; STELLA, M.B.; OLIVEIRA, C. Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica,
333 **Guanabara Koogan**, 200 págs, (2009),.

334 INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 08, Abril 2020.

335 KOVACS, Z.; TRIPON, R.; NEMES, N. E.; BALOGH S. V.; TILINCA, M.; MARTHA O. F. Z. Arylsulfatase
336 A: An Important Metabolic Factor in Pathophysiology of Different Diseases. *Acta Medica*
337 *Marisiensis*;61(3):233-235. 2015.

338 KICH & BÖCKEL <https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao> Macapá, v. 7, n. 3, p. 61-69, set./dez. 2017.
339 ISSN 2179-1902.

- 340 MAPA (Redação dada pelo(a) Portaria) 495/2010/SDA/MAPA, n. 5, p. 807, 2010.
- 341 ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria Uv-
- 342 Vis. Química Nova. v. 27, 2004.
- 343 SILVA, A. de P.; ALVES, M. C. C. Como Iniciar a Validação de Métodos Analíticos. ENQUALAB, Rede
- 344 Metrológica do Estado de São Paulo, 2006.

CAPÍTULO II

Validação do teste enzimático em cabras leiteiras, soro positivas ou negativas para Artrite Encefalite Viral Caprina

Artigo a ser encaminhado ao Periódico: *Semina-Ciências Agrárias*
(ISSN 1679-0359)
Qualis CAPES A4

Validação do teste enzimático em cabras leiteiras, soro positivas ou negativas para Artrite Encefalite Viral Caprina

Validation of enzyme testing in sample Validation of the enzyme test in dairy goats, serum blood positive or negative for Caprine Viral Encephalitis Arthritis

6 Jader Forquim Prates^{1*}; Zenaide Sousa Olímpio¹; Natiely Milly Ramos Gomes²; Ana
7 Milena César Lima², Ângela Maria Xavier Eloy²; Raymundo Rizaldo Pinheiro²; Francisco Selmo Fernandes
8 Alves².

⁹ ¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral, Ceará,
¹⁰ Brasil.

¹¹ ²Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPCO), Departamento de Sanidade Animal, Sobral, Ceará, Brasil.

12

Artigo a ser submetido ao periódico Semina- Ciências Agrárias

14 Highlights

15 Estabelecimento do perfil de Arylsulfatase A (ARSA) em caprinos através do teste enzimático;
16 Concentração média em teste padronizado para caprinos;
17 A concentração média de Arylsulfatase ARSA nos animais foi (0,074 mM).

19 **Resumo**

O objetivo deste estudo foi aplicar o teste enzimático de Arylsulfatase A como uma alternativa para diagnóstico da CAE. O estudo foi conduzido no laboratório de Biologia Molecular e Proteômica da Embrapa Caprinos e Ovinos, entre os meses de agosto a outubro de 2022. Foram testadas em alíquotas duplicata de plasma sanguíneo de cabras leiteiras, totalizando 56 fêmeas das raças Saanen (n=17); (Peso $57,3 \pm 7,14$ kg, CV 12,40), (Idade $5,34 \pm 2,19$, CV 41,00), (ECC $2,59 \pm 0,45$, CV 17,6%) e Anglo Nubiana (n=17) (Peso $56,40 \pm 10,70$ kg, CV 19,00), (Idade $5,11 \pm 1,89$, CV 37,10), (ECC $2,98 \pm 0,50$, CV 16,8). Os animais foram testados previamente para CAE por Western Blootting e classificados como positivos ou negativos, e as amostras oriundas desses animais submetidas a teste enzimático de Arylsulfatase A. Não foram encontradas diferenças ($P<0,05$) para os parâmetros de concentração mM de ARSA avaliados nos grupos experimentais positivo ou negativo para CAE. A concentração média de Arylsulfatase nos animais foi (0,074 mM) para ambos os grupos, os percentuais analisados nos grupos positivo e negativo, acima da média foram 62.07% (n= 18/29) e 46.15% (n=12/26) respectivamente. Para os percentuais da distribuição nos grupos positivos e negativos com valores abaixo da média os valores foram 37,93% (n=11/29) e 53,85% (n=14/26). Conclui- se com esse estudo que os dados podem ser considerados validos e pioneiros para se estabelecer o perfil de Arylsulfatase A (ARSA) em caprinos leiteiros com média de concentração para os lotes positivo e negativo de 0,074 mM.

35 **Palavras chaves:** Nitrocatechol, Bodes, Concentração Molar, espectrofotômetro

36 **Abstract**

37 The objective of this study was to apply the enzymatic test of Arylsulfatase A as an alternative for the diagnosis
38 of CAE. The study was conducted at the Molecular Biology and Proteomics laboratory at Embrapa Caprinos
39 e Ovinos, between August and October 2022. Duplicate aliquots of blood plasma from dairy goats were tested,
40 totaling 56 female Saanen breeds (n=17).; (Weight 57.3 ± 7.14 kg, CV 12.40), (Age 5.34 ± 2.19 , CV 41.00),
41 (ECC 2.59 ± 0.45 , CV 17.6%) and Anglo Nubian (n=17) (Weight 56.40 ± 10.70 kg, CV 19.00), (Age $5.11 \pm$
42 1.89, CV 37.10), (ECC 2.98 ± 0.50 , CV 16.8). The animals were previously tested for CAE by Western
43 Blotting and classified as positive or negative, and the samples from these animals were submitted to an
44 enzymatic test of Arylsulfatase A. The criterion adopted to define the best range for the regression equation was
45 a smaller standard deviation in relation to absorbance obtained for each molar concentration range. No
46 differences ($P<0.05$) were found for the evaluated parameters. The average concentration of Arylsulfatase in
47 the animals was (74.00 nmol) for both groups, the percentage of positive animals above the average was % of
48 the total batch under study 124, 72 kg and 118.96 kg respectively for T Control and T15 %. Through the
49 equation $y= 4500.333x +611.867$, $R^2= 0.962$, CV= 5.62, Standard Deviation = 135.75, it was defined through
50 the mathematical transformation of the equation ($X= Y- 611.87/ 4500.33$ to express the mM concentration of
51 Arylsulfatase in dairy goats

52 **Keywords:** Nitrocatechol, Goats, Molar Concentration, spectrophotometer

53 *Corresponding author - Tel.: + 55 32 999259990

54 E-mail address: jader.forquimprates@yahoo.com.br

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79

80 **Introdução**

81 A infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina viral (CAEV) está presente na maioria dos rebanhos
82 leiteiros sendo mais evidente e causando maior impacto em rebanhos de alta produção, ocorrendo de modo
83 mais brando e raro em raças nativas de sistemas extensivos, havendo sempre o risco de que esses tenham
84 contato com caprinos exóticos criados sob condições sanitárias desconhecidas e sem informações referentes
85 as ocorrências zoosanitárias que afetam a transmissividade e ocorrência da enfermidade (Galiza et.al, 2020).

86 Os diagnósticos imunológicos mais usados na CAE dependem da presença de anticorpos séricos para
87 este vírus (Pinheiro et al., 2010). A persistência desta infecção no rebanho ocorre porque o vírus pode se manter
88 sem causar sintomatologia e resposta imunológica humoral satisfatória para detecção da doença pelos testes
89 usuais.

90 Os testes sorológicos mais utilizados para diagnóstico da CAE são Imunodifusão em Gel de Agarose
91 (IDGA), Elisa e Western Blooting (WB), sendo o primeiro de menor sensibilidade para detecção de animais
92 positivos (Rodrigues et al., 2014), apresentando maior ocorrência de resultado falso negativo. O teste WB,
93 apresenta maior sensibilidade, sendo um processo que é mais oneroso e complexo em sua realização, passando
94 pelas etapas de eletroforese e posterior confecção das membranas de diagnóstico por meio da transferência
95 passiva por 72 horas entre o gel de eletroforese e a membrana teste de celulose.

96 O estabelecimento do perfil de Arylsulfatase A (ARSA) em caprinos através do teste enzimático com
97 avaliação por espectrofotometria, surge promissoramente como alternativa viável quando comparada a
98 ferramentas de diagnóstico convencionais. Com a identificação da enzima em eletroforese 2DE, que não
99 permitem a identificação do diagnóstico rápido, porém nesse modelo já tem sido encontrados avanços como a
100 identificação da própria Arylsulfatase (Bezerra- Junior, 2015; Galiza, 2016).

101 Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a concentração molar de ARSA em cabras leiteiras
102 positivos e negativos para CAE testados por WB.

103 **Material e Métodos**

104 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob registro no
105 protocolo de nº 006/2020.

106 Os animais selecionados para a pesquisa foram obtidos da fazenda experimental Três Lagoas -
107 Embrapa Caprinos e Ovinos e as análises diagnósticas foram executadas no laboratório de biologia molecular
108 e proteômica da mesma instituição, localizada em Sobral – CE, na região Norte do Estado do Ceará, clima
109 semiárido, temperatura média anual de 28°C com médias mínima e máxima, de 22°C e 35°C. Região está
110 situada a 111 metros de altitude, 3°45'0,5" S e 40°20'45,8" W. O experimento foi realizado nos períodos de
111 janeiro a março de 2023.

112 As unidades experimentais foram compostas da avaliação de alíquotas de plasma de sangue de 56
113 animais (30 animais positivos e 26 negativos), perfazendo um total de 112 avaliações em duplicata.

114 As amostras de sangue foram obtidas por meio de veni-punção jugular, utilizando-se tubos vacuotainer
115 com anticoagulante de sódio heparina. Foram coletados cerca de 10 mL de sangue de cada animal. As amostras
116 foram centrifugadas a 2000g, durante 10 minutos em temperatura de 4 °C em centrifuga refrigerada. Em
117 seguida, o plasma sanguíneo dos animais foi obtido e armazenado em tubos tipo eppendorf a -20 °C até a
118 realização dos testes de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e Western Blooting (WB).

119 Foi realizada a produção de antígeno para os testes de imunodiagnóstico (IDGA e WB). Esta etapa é
120 necessária previamente para realização dos testes de IDGA e WB, onde há a produção de antígeno proveniente
121 de cultivo celular e inoculação viral por meio da cepa padrão do vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).

122 Foram testadas em concentração molar padronizada de 0,4 mM do reagente 4- Nitrocatechol (SIGMA-
123 ALDRICH^(R)) com pureza mínima 96%, sendo realizado a aplicação da técnica conforme descreve-se a seguir:

124 O método de dosagem enzimática promove uma reação de hidrólise ou dissolução em meio ácido (ph=5,0) por um período de quatro horas da enzima ARSA em 4-nitrocatechol substrato sulfato (p-NCS).

126 Preparo de soluções:

127 Solução A:

128 Prepara se uma solução de ácido acético A 1 molar em água destilada Milliq;

129 Solução B:

130 Prepara se uma solução de 34,0 g de acetato de sódio ou 20,5g se for acetato de sódio anidro em 250
131 mL de água destilada Milliq, adicionar 111,5 mg de pirofosfato inorgânico; e 50,0g cloreto de potássio
132 constituindo a solução C.

133 Solução C:

134 Prepara-se uma solução composta em percentuais aproximados de 30:70 volume/volume, composta
135 de solução A com a solução B formando a solução C denominada tampão, com pH ajustado para 5,0 excelente
136 para ativação da ARSA.

137 Preparo da solução de análise:

138 Pesar 62 mg de 4-nitrocatechol substrato sulfato (p-NCS), diluindo em volume na solução C para
139 concentração de 0,4 mM, obtendo todos os reagentes necessários para análise.

140 Preparo da análise:

141 As amostras de plasma foram descongeladas em banho maria e mantidas em refrigeração procedendo
142 com o preparo em tubos de ensaio das amostras sondas, controles e branco do espectrofotômetro.

143 Preparo da amostra sonda:

144 Para a amostra sonda de cada animal, adicionou-se 0,24 ml do plasma sanguíneos em 1,20 ml da
145 solução de análise e estes foram incubados durante 4 horas à 37°C usando estufa de ambiente controlado
146 BOD[®].

147 No final da incubação adicionou-se 1,20 mL de hidróxido de sódio 1,25 N (Normal) para parada das
148 reações das amostras sonda, a fim de interromper a hidrolisão do ARSA no substrato e promover o efeito de
149 coloração roxa característica da análise, faixa de leitura (500 a 520 nm).

150 Preparo da amostra controle:

151 Os controles para esta análise foram realizados através da leitura sem incubação em tempo não superior
152 a 30 minutos, sendo contabilizados assim contabilizados dois compostos preparados em tubos de ensaio
153 separadamente para um mesmo animal, seguindo as mesmas condições de preparo.

154 No final do preparo sem incubação adicionou-se 1,20 mL de hidróxido de sódio 1,25 molar (Normal)
155 para parada das reações das amostras controle, a fim de interromper a hidrolisão da ARSA no substrato. Em
156 atempo inferior a 30 minuto.

157 Mensuração da concentração molar de ARSA:

158 A concentração molar das sondas foi medida em relação a subtração da concentração molar obtida nas
159 amostras controles de cada unidade experimental. Usamos o espectrofotômetro Biodrop® com UV-visível em
160 comprimento de onda de 515 nm conforme descrito por (Kovacs et. al, 2013).

161 Os cálculos para unidade de medida utilizada para a concentração do substrato ARSA p-NCS foi
162 ml/moL/4h. Seguindo o modelo: $C = A - B$

163 Onde:

164 C: é a concentração de ARSA

165 A: é a concentração molar medida na amostra sonda, analisada na curva analítica do espectrofotômetro
166 após 4h de incubação.

167 B: é a concentração molar medida amostra controle, analisada na curva analítica do espectrofotômetro
168 em tempo inferior a 30 minutos;

169 Observação: Ambas amostras são de confeccionadas do plasma sanguíneo de um mesmo animal e as
170 leitura realizadas em tempos diferentes.

171 Os critérios de validação obedeceram aos parâmetros de validação de técnicas laboratoriais e foram
172 observados em todas as etapas das análises realizadas na confecção do teste enzimático (Inmetro, 2020). Essas
173 principais etapas avaliaram: a especificidade/seletividade, a linearidade, a sensibilidade, a exatidão, a precisão
174 (repetitividade, precisão intermediária e reproduzibilidade), e robustez.

175 Foram consideradas as normas contidas no manual para avaliação proposto por (Amarante et al, 2001)
176 algumas variáveis, nas quais a sensibilidade do teste foi avaliada pela capacidade do método em distinguir,
177 com um nível determinado de confiança duas concentrações próximas para a leitura de uma mesma amostra
178 de um único animal.

179 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente causalizado (DIC), com dois grupos
 180 experimentais, sendo um o grupo controle, composto pelos animais testados negativos para CAE por testes de
 181 IDGA e WB e o grupo desafio formado pelos animais testados positivos.

182 Foram utilizadas 60 repetições para o grupo de animais positivos e 52 para o grupo de animais
 183 negativos, conforme o modelo estatístico $Y_{ij} = M + G_i + \epsilon_{ij}$, em que M = média geral; G_i = efeito do teste, ϵ_{ij}
 184 = erro aleatório associado às observações. Utilizando os pacotes estatísticos básicos da plataforma R, foram
 185 realizados os testes de Shapiro-Wilks e Bartlett, a fim de serem verificados os pressupostos de normalidade e
 186 homogeneidade, respectivamente.

187 E usando a mesma ferramenta R, os ensaios foram comparados usando o teste F, através da Análise de
 188 Variância ANAVA, e seguido do teste de Tukey das médias.

189 Resultados e Discussão

190 A concentração média de Arylsulfatase ARSA nos animais foi (0,074 mM) para ambos os grupos. Na
 191 Tab. 1 está expresso os dados em concentração dos grupos positivo e negativo para CAE. Não houve diferença
 192 estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos com relação aos valores médios de Arylsulfatase A (ARSA) em
 193 caprinos leiteiros positivos e negativos para CAE.

194 **Tabela 1.** Teste de médias da concentração de ARSA nos grupos avaliados pelo teste enzimático realizado por
 195 espectrofotometria após padronização para avaliação no plasma sanguíneo de caprinos leiteiros

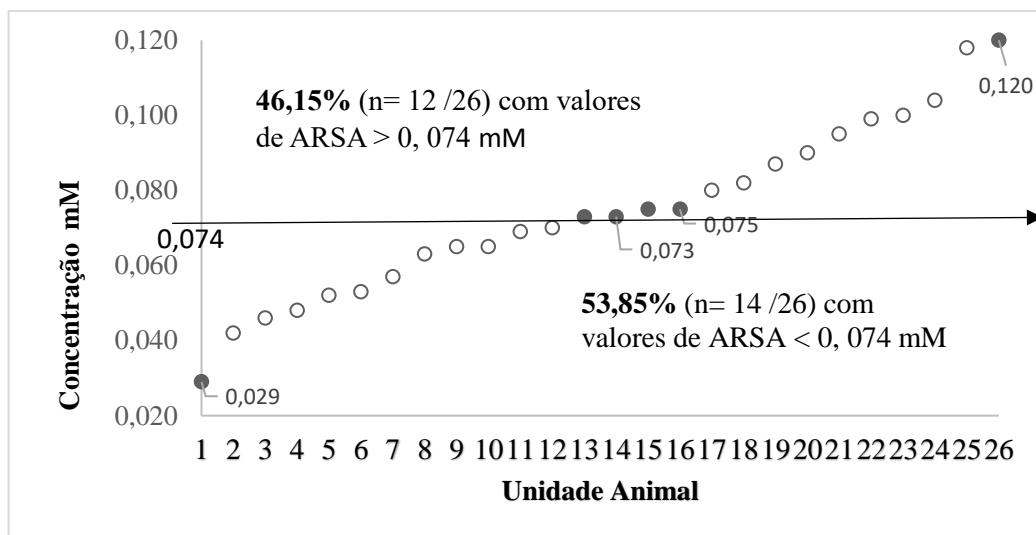
Tratamentos	Valores médios de ARSA	
	(mM)	CV (%)
Positivo	0,07410 a	36,27
Negativo	0,07420 a	

196 * Médias seguidas de letras iguais de acordo com o teste de medias, não podem ser consideradas diferentes
 197 entre si.

198 Não houve diferença estatística entre as concentrações molares médias encontradas nos grupos de
 199 animais avaliados (Positivo ou Negativo), podendo essa condição sugerir que a concentração média em teste
 200 padronizado para caprinos se aproxime dos valores médios encontrados no presente trabalho. Em análises
 201 humanas de ARSA, Lagranha, (2008) relata valores médios 0,0239 mM +/- 0,002 mM em fibroblastos
 202 humanos normais. Laboratórios de teste de ARSA utilizam como parâmetros para resultado normal do teste
 203 valores de 0,032 a 0,130 mM de 4-nitrocatecol/ml/4 horas, com valores médios > 0,062mM/h/mg como valor
 204 normal em humanos para ARSA.

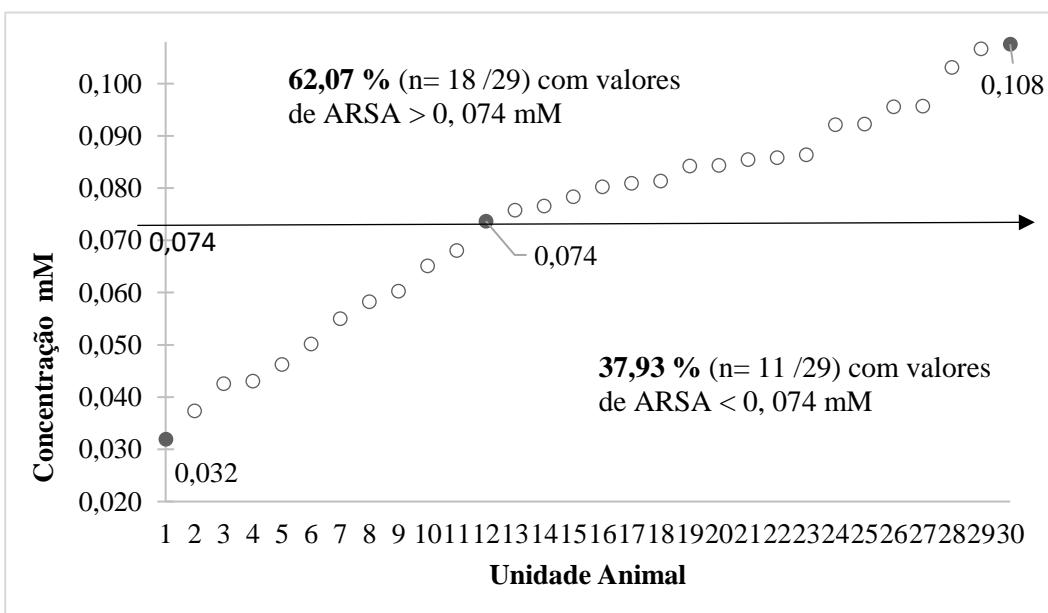
205 Os dados de distribuição dos animais em seus respectivos grupos, expressam percentuais com relações
 206 quando analisados os grupos positivo e negativo, sendo acima da média 62.07 % (n= 18/29) e 46.15%
 207 (n=12/26), respectivamente. Na Fig. 1, observamos que os animais do grupo negativo para CAE cujos valores
 208 médios de referência maiores e menores foram respectivamente (0,029 Mmol) vs (0,120 Mmol), sendo esses
 209 os primeiros valores determinados em caprinos leiteiros soro negativos para a CAE.

210 **Figura 1.** Dispersão média da ARSA em animais negativos para CAE.



211
 212
 213 Com relação aos animais positivos para CAE os valores médios menores e maiores foram
 214 respectivamente (32,00 nmol) vs (108,00 nmol), assim sendo esses valores os primeiros a serem encontrados
 215 em caprinos leiteiros soro positivos para a CAE. Na Fig. 2, observa se que há uma inversão em percentuais
 216 para distribuição nos grupos positivos e negativos com valores abaixo da média representando 37,93%
 217 (n=11/29) e 53,85% (n=14/26) números de animais na distribuição gráfica.

218 **Figura 2.** Dispersão média da ARSA em animais positivos para CAE.



219

220 Não foram encontradas diferenças ($P = 0,98523$) para as concentrações médias de ARSA avaliados
 221 entre os grupos positivos e negativos, porém a distribuição percentual observada nas figuras 1 e 2 denotam
 222 indicativo de que possam as distribuições de animais com ARSA acima de 0,074 mM ser indicativo de que em
 223 animais negativos para CAE e com ARSA maior que 0,074 mM possam se caracterizar como animais em
 224 estado clínico de latência da doença conforme vem sendo relatado em alguns trabalhos (Pugh, 2004; Paula et
 225 al., 2008b; Blacklaws, 2012). Surgindo assim indícios de que os trabalhos com a avaliação da ARSA venham
 226 a ser realizados sequencialmente em um mesmo rebanho ao longo de períodos estabelecidos, avaliando se em
 227 algum momento esses animais virão a se confirmar positivos por testes moleculares ou imunodiagnóstico.

228 Pode ser observado nas análises dos resíduos o atendimento as propostas de validação dos métodos
 229 analíticos propostos reforçados também pelos pressupostos de homogeneidade e distribuição normal dos dados
 230 (Natilena, 2003; Inmetro 2020). Na Tab. 2, encontram-se os dados da análise de variância das variáveis
 231 avaliadas para concentração molar de Arylsulfatase A (ARSA) em fêmeas caprinas leiteiras.

232 **Tabela 2.** Análise de variância dos dados de concentração de ARSA.

	GL	SQ	QM	F	Pr > Fc
Tratamento	1	0,000	0,00000025	0,00034441	0,985
Resíduos	110	0,080	0,00072353		
Total	111	0,080	0,00000025		

233 Considerando a análise do teste de normalidade dos resíduos para os dados brutos atendeu aos
 234 pressupostos de distribuição normal dos resíduos (P -valor = 0,2755581) e que há uma homogeneidade das
 235 variâncias (P -valor = 0,7471). A confiabilidade para validação do teste estaria sendo atendida conforme os
 236 pressupostos para validação dos métodos analíticos descrito na literatura (Streck et al., 2011; Inmetro, 2020).

237 Em suma, os resultados desse estudo servirão para estabelecer parâmetros para a avaliação enzimática
 238 de ARSA em caprinos leiteiros, colaborando assim para estabelecimento de uma técnica padronizada para a
 239 análise por espectrofotometria que com o aumento das análises realizadas colabora para o crescimento dos
 240 parâmetros de robustez, precisão e exatidão da técnica.

242 Conclusão

243 Conclui- se com esse estudo que os dados podem ser considerados válidos e pioneiros para se
 244 estabelecer o perfil de Arylsulfatase A (ARSA) em caprinos leiteiros com média de concentração para os lotes
 245 positivo e negativo de 0,074 mM, bem como serve para demonstrar um indicativo sobre o comportamento e
 246 distribuição de animais positivos e negativos para CAE.

247 Uma possível sugestão a ser estudada é a avaliação cronológica de animais de lote contemporâneo a
 248 partir do nascimento e que venham a ser testados periodicamente para CAE por WB e IDGA, a fim de que se
 249 estabeleça a concentração plasmática de ARSA em animais no momento da detecção de positividade para CAE
 250 por testes usuais.

251 **Referências Bibliográficas**

- 252 AMARANTE JUNIOR, OZELITO POSSIDÔNIO et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão.
253 Cad. Pesq., São Luís, v. 12, n. 1/2, p. 116-131, 2001.
- 254
- 255 BEZERRA JUNIOR, R.Q. PINHEIRO, R. R.; EGITO, A. S.; PINHEIRO, A. A. Artriteencefalite caprina viral
256 (CAEV). Sobral: EMBRAPA-CNPC. (EMBRAPACNPC. Comunicado Técnico, 19). 1989.
- 257 NATILENA et al. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão, 2003. 15
- 258
- 259 CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e
260 Maedi-Visna): revisão e perspectivas. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.21, p.87-97, 2001.
- 261
- 262 STRAUB O. C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. Comparative
263 Immunology Microbiology & Infectious Diseases, v. 27, 2004,p. 1-5.
- 264
- 265 WASINGER, V.C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*.
266 Electrophoresis, de Arylsulfatase A encontrados nas alíquotas de plasma 16:1090-1094, 1995.
- 267
- 268 ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A.;SANTOS,
269 D. O. Detecção do DNA pro-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista**
270 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 101-106, 1999.
- 271
- 272 BEZERRA JÚNIOR, R. Q; ELOY, A. M. X; PERREIRA, E. P. et al. Avaliação das
273 metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados. **ActaScientiae**
274 **Veterinariae**, 43:1258, 2015.
- 275 LARA, M. C. C. S. H. **Artrite-encefalite dos Caprinos - Aspectos clínicos e epidemiológicos**. 2002. 247
276 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, FMVZ-
277 USP, São Paulo.
- 278
- 279 LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Possibility of vertical transmission of
280 Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
281 **Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 553 - 555, 2005.
- 282
- 283 BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, G.; TORSTEINSPOTTIR, S.; WATT, N. J.; DEANDRES,D.; KLEIN,
284 D.; HARKISS, G. D. Transmission of small ruminant lentivirose. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 199-
285 208, 2004.
- 286

- 287 PAULA, N. R. O. **Parâmetros Clínicos, Hematológicos, Sorológicos e Reprodutivos em Reprodutores**
288 **Natural e Experimentalmente Infectados com CAEV.** 2008. 193 p. Tese (Doutorado em Ciências
289 Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza
290
291 PUGH, D. C. **Clínica de ovinos e caprinos.** São Paulo: Roca, 2004. 513p.
292
293 Streck, L., Santos, K. S. C. R. D., Fernandes-Pedrosa, M. D. F., Silva-Júnior, A. A. D., & Oliveira, A. G. D.
294 (2011). Validação de método analítico por espectrofotometria UV para sistema emulsionado lipídico contendo
295 benznidazol. *Química Nova*, 34, 1459-1463.
296

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização desse estudo foi possível testar a metodologia diagnóstica enzimática de identificação da Arylsulfatase A (ARSA), encontrando os primeiros valores médios de referência para esse teste diagnóstico em caprinos (0,064 mM em bodes e 0,074 em cabras) porém, para diagnóstico da infecção pela CAE, em caprinos leiteiros, é necessária a realização de mais estudos que venham a conferir robustez da técnica com o aumento do número de análises realizadas com esse sentido.

O teste pode ser considerado válido, como teste enzimático de Arylsulfatase A para caprinos leiteiros, porém ainda não há robustez, precisão e exatidão suficientes para os dados que possam inferir, nesse momento, a indicação do teste para o diagnóstico direto da CAE, podendo ser sugerido como um teste de triagem para a detecção de alterações no processo inflamatório que gera sulfatides e aumento dos níveis séricos da ARSA.

Futuramente o teste pode ser avaliado através da realização de mais estudos em um rebanho homogêneo de mesma idade e com soro conversão conhecida em um momento inicial para infecção por CAE, avaliando nesse momento de soro conversão, qual seria o padrão de Arylsulfatase A em caprinos positivos e em caprinos negativos que se randomize o risco de ter a doença em estado de latência.

7. ANEXOS

ANEXO A

Técnica Embrapa de Determinação da Concentração de Arysulfatase A (ARSA) em caprinos

DESCRIÇÃO

É um método de dosagem enzimática que promove uma reação de hidrólise ou dissolução em meio ácido (pH= 5,0) por um período de quatro horas da enzima ARSA em 4-nitrocatechol substrato sulfato (p-NCS).

PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução A:

Prepara se uma solução de ácido acético A 1 molar em água destilada Milliq;

Solução B:

Prepara se uma solução de 34,0 g de acetato de sódio ou 20,5g se for acetato de sódio anidro em 250 mL de água destilada Milliq, adicionar 111,5 mg de pirofosfato inorgânico; e 50,0g cloreto de potássio constituindo a solução C.

Solução C (solução tampão):

Prepara-se uma solução composta em percentuais aproximados de 30:70 volume/volume, composta de solução A com a solução B formando a solução C denominada tampão, com pH ajustado para 5,0 excelente para ativação da ARSA.

Preparo da solução de análise:

Pesar 62 mg de 4-nitrocatechol substrato sulfato (p-NCS), diluindo em volume na solução C para concentração de 0,4 mM, obtendo todos os reagentes necessários para análise.

Preparo da análise:

As amostras de plasma foram descongeladas em banho maria e mantidas em refrigeração procedendo com o preparo em tubos de ensaio das amostras sondas, controles e branco do espectrofotômetro.

Preparo da amostra sonda:

Para a amostra sonda de cada animal, adicionou-se 0,24 ml do plasma sanguíneos em 1,2 ml da solução de análise e estes foram incubados durante 4 horas à 37°C usando estufa de ambiente controlado BOD®.

No final da incubação adicionou-se 1,2 mL de hidróxido de sódio 1,25 N (Normal) para parada das reações das amostras sonda, a fim de interromper a hidrolisão do ARSA no substrato e promover o efeito de coloração roxa característica da análise, faixa de leitura (500 a 520 nm).

Preparo da amostra controle:

Os controles para esta análise foram realizados através da leitura sem incubação em tempo não superior a 30 minutos, sendo contabilizados assim contabilizados dois compostos preparados em tubos de ensaio separadamente para um mesmo animal, seguindo as mesmas condições de preparo.

No final do preparo sem incubação adicionou-se 1,2 mL de hidróxido de sódio 1,25 N (Normal) para parada das reações das amostras controle, a fim de interromper a hidrolisão da ARSA no substrato. Em atempo inferior a 30 minuto.

Mensuração da concentração molar de ARSA:

A concentração molar das sondas foi medida em relação a subtração da concentração molar obtida nas amostras controles de cada unidade experimental. Usamos o espectrofotômetro Biodrop® com UV-visível em comprimento de onda de 515 nm conforme descrito por (Kovacs et. al, 2013).

Os cálculos para unidade de medida utilizada para a concentração do substrato ARSA p-NCS foi ml/moL/4h. Seguindo o modelo: $C = A - B$

Onde: C- é a concentração de ARSA, A- é a concentração molar medida na amostra sonda, analisada na curva analítica do espectrofotômetro após 4h de incubação e B- é a concentração molar medida amostra controle, analisada na curva analítica do espectrofotômetro em tempo inferior a 30 minutos;

Observação: Ambas amostras são de confeccionadas do plasma sanguíneo de um mesmo animal e as leitura realizadas em tempos diferentes.

Os critérios de boas práticas laboratoriais devem seguir os parâmetros contidos no manual (Inmetro, 2020) de validação de técnicas laboratoriais aos quais foram observados em todas as etapas das análises realizadas na confecção do presente teste enzimático.

ANEXO B

Certificado CAEUA- Para uso de animais em pesquisa



Caprinos e Ovinos

Comissão de Ética no Uso de Animais –
CEUA / CNPC

CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EMPESQUISA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos – CEUA-CNPC – certifica que

o projeto intitulado “*Inteligência epidemiológica das principais enfermidades infecciosas da caprinocultura leiteira dos territórios Cariri Paraibano e Sertão Pernambucano e da ovinocultura e da caprinocultura de corte na Bacia do Jacuípe na Bahia*”, protocolo nº 006/2020, sob a responsabilidade de Raymundo Rizaldo Pinheiro – que envolve a produção, manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos (CEUA/CNPC), em reunião realizada no dia 14 de outubro de 2020.

Espécie Animal	Raça / linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				MACHOS	FÊMEAS	SUBTOTAL
Caprino	Diferentes raças	A partir de um ano	Variável qto. A raça, sexo e idade			2000
Ovino	Diferentes raças	A partir de um ano	Variável qto. A raça, sexo e idade			1000
				TOTAL:		3000
Vigência do projeto		Início: 26/10/2020 Término: 31/12/2022				

Origem dos animais	<ul style="list-style-type: none"> - 50 propriedades caprinas leiteiras distribuídas no Cariri Paraibano (PB) e Sertão pernambucano (PE); - 50 propriedades de ovinos e 50 propriedades de caprinos de corte na Bacia do Jacuípe, Bahia.
---------------------------	--

Sobral, CE 23 de outubro de 2020.



Dra. Alice
Andrioli Pinheiro
Coordenadora da
CEUA-CNPC

*Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária Centro Nacional de
Pesquisa de Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e
Abastecimento Fazenda Três Lagoas,
Estrada Sobral-Groaíras, Km 4, CEP
62010-970 Sobral – CE*

*Telefone (88) 3112.7400 Fax
(88) 3112.7455*

www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos

ANEXO C

Normas para publicação revista

SEMINA- CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Publicação de: Universidade Estadual Londrina- PR

Área: Ciências Agrárias

Versão impressa ISSN: 1676-546X

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente traduzidos para o inglês.

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores (ou equivalente. Se for o caso, solicitar autorização a este Comitê Editorial, informando o nome da empresa, CNPJ e justificativa):

American Journal Experts

Editage

<https://www.researchsquare.com/researchers/editing>

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

<https://www.traduzoo.com/>

O autor principal deverá anexar no sistema o **documento comprobatório** - dessa correção na página de submissão em **“Docs. Sup.”****OBSERVAÇÕES:**

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com

manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

- 2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).
- 3) O autor deverá informar se utilizou IA generativa para escrever este manuscrito. Generative AI não é um autor. Essas ferramentas devem ser usadas apenas para melhorar a linguagem e a legibilidade, com cautela. Se você usou IA generativa ou tecnologia assistida por IA, inclua a declaração de uso de IA como documento suplementar. Esta declaração será publicada no PDF.

NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação;
- b) Não tenha sido realizado o cadastro completo de todos os autores nos metadados de submissão;
Exemplo: Nome completo; Instituição/Afiliação; País;
- Resumo da Biografia/Titulação/função
- c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;
- d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar “Docs. Sup.” no ato da submissão;
- e) Que não tenham sido aprovados pelo Comitê de Ética Animal ou Humana (se for o caso).
- f) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: Aprovação do Comitê de Ética Animal ou Humana (se for o caso), gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)
- g) Não constem no artigo original: título, 3 à 5 pontos (Highlights), resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

h) Deve ser incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR a indicação de três possíveis revisores doutores para o manuscrito com NOME, INSTITUIÇÃO, e E-MAIL.

i) Manuscritos que contenham mais de dez autores.

RESTRICÇÃO POR ÁREA:

PARA A ÁREA DE AGRONOMIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) Os experimentos com cultura in vitro sejam limitados ao melhoramento dos protocolos já padronizados ou que não forneçam novas informações na área;
- b) Os experimentos de campo não incluam dados de pelo menos dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;
- c) Os experimentos se refiram apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos, abióticos ou estresses fisiológicos;
- d) Envolvam apenas bioensaios (screening) de eficácia de métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças de plantas, exceto se contiverem contribuição importante sobre mecanismos de ação numa perspectiva de fronteira do conhecimento;
- e) O objetivo seja limitado a registrar a ocorrência de espécies de pragas ou patógenos ou associações entre hospedeiros em novas localidades dentro de regiões geográficas onde eles já sejam conhecidos. Registros de espécies ou associações conhecidas só serão considerados em novas zonas ecológicas. Os registros de distribuição devem se basear em ecossistemas, e não em fronteiras políticas.

PARA A ÁREA DE ZOOTECNIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- As referências bibliográficas sejam muito antigas.

Somente serão aceitas referências antigas em Material e Métodos. Não utilizar resumos simples ou expandidos e trabalhos em anais de eventos como referências. Teses, dissertações e monografias somente serão aceitas dos últimos três anos, se não tiverem sido publicados como artigos científicos em periódico.

- Não tenham realizados análises estatísticas adequadas.

- Não incluam dados do período completo de produção em experimentos em avicultura (frangos de corte e poedeiras).

- Experimento de campo ou laboratorial apresentem resultados de baixo impacto científico.

- Apresentem levantamentos locais (cidade, região, abatedouro específico, granja, etc.) de dados de manejo, alimentação, saúde, entre outros, de baixo impacto científico.

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

FIGURAS: Em APA, deve-se utilizar apenas tabelas e figuras. Sendo consideradas como figuras: gráficos, fotografias, mapas, organogramas e retratos. A identificação das figuras deve aparecer na **parte inferior**, precedida da palavra designativa, seguida de seu número de ordem de ocorrência no texto

TABELA: O título de tabela precisa ser breve, claro e explicativo. Ele deve ser colocado **acima da tabela**, no canto superior esquerdo, e logo abaixo da palavra Tabela (com a inicial maiúscula), acompanhada do número que a designa.

OBS. Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras **não forem do autor**.

PREPARAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; **3 à 5 pontos principais (Highlights)**; Resumo com Palavras-

chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. **Material e Métodos...** *Áreas de estudo...1. Área rural 2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, NotaPrévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. TÍTULO DO TRABALHO: acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. ADICIONAR 3 à 5 PONTOS PRINCIPAIS (Highlights): Consiste de 3 à 5 pontos principais do artigo que permite ao leitor uma visão dos principais resultados do manuscrito. Cada "Highlight" deve conter no máximo 85 caracteres incluindo espaçamentos.

3. RESUMO E PALAVRAS-CHAVE: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

4. INTRODUÇÃO

Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não

deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

7. CONCLUSÕES

Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

8. AGRADECIMENTOS

As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências
Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Deverão ser inseridas no final do artigo, um em cada página, após as referências. Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: Deverão ser inseridas no final do artigo, um em cada página, após as referências. As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

- a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha^{-1} .
Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha .

- d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹ ou gL⁻¹.
- e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

9. CITAÇÕES

Informações não contempladas nestas diretrizes, consultar o Manual APA 7^a ed. Ou Apostila da Biblioteca Central UEL

Quando nas citações, os autores estiverem fora dos parênteses, utilizar sempre “e” (português); “and” (inglês) e “y” (espanhol); para separar o penúltimo do último autor citado. O “&” é inserido sempre entre o penúltimo e último autor quando citados entre parênteses e nas referências.

Citação:

Dois Autores

Almeida e Parisi (2020, p. 379) ou (Almeida & Parisi, 2020, pp. 372-373)

Três ou mais autores

Lopes et al. (2021) ou (Lopes et al., 2021).

Exemplo: modelo de citação com um, seis ou mais autores

Figura 1

Estilo de citação no texto

Tipo de Citação	1^a citação fora do parêntese	Citações subsequentes	1^a citação dentro do parênteses	Citações subsequentes
----------------------------	--	----------------------------------	---	----------------------------------

1-2 autores	Minosso e Toso (2019)	Minosso e Toso (2019)	(Minosso & Toso, 2019)	(Minosso & Toso, 2019)
3 ou mais autores	Werner et al.(2017)	Werner et al.(2017)	(Werner et al.,2017)	(Werner et al.,2017)
Autor entidade / individual	Instituto Brasileiro de Ciência e Tecnologia (IBICT) (2018)	IBICT (2018)	(Instituto Brasileiro de Ciência e	(IBICT, 2018)
			Tecnologia [IBICT], 2018)	
Organização sem abreviatura	Simply Cats (2019)	Simply Cats (2019)	(Simply Cats, 2019)	(Simply Cats, 2019)

Citação direta com supressão de parte do texto: Use reticências com cada ponto separado por espaço para indicar que o texto foi suprimido. Quando a supressão for entre duas frases, utilize quatro pontos separados por espaço.

Exemplo:

“Ao centrar-se sobre esses aspectos, da forma como o fazem, os textos privilegiam uma determinada visão de profissional, . . . calcada na análise ocupacional, e que carece de individualidade, singularidade e vida.” (Ferretti, 1997, p. 58).

“O novo conhecimento começa sempre com o indivíduo. Tornar o conhecimento pessoal disponível para outros é a atividade central da empresa criadora de conhecimento.” (Nonaka, pp. 41-42)

Para incluir um acréscimo ou explicação na citação, use **colchetes**. **Exemplo:**

“They are studying, from an evolutionary perspective, to what extent [children’s] play is a luxury that can be dispensed with when there are too many other competing claims on the growing brain.....” (Hening, 2008, p. 40).

Diversos documentos do mesmo autor, publicados num mesmo ano

Exemplo: (Porter, 1999a, 1999b, 1999c)

Citação de um mesmo autor com várias datas de publicação

Para citação do mesmo autor com várias datas de publicação, segue-se a ordem cronológica crescente.

Exemplo: Segundo Porter (1986, 1991, 1999, 2000)

Citação de diversos autores com o mesmo sobrenome

Devem ser incluídas as iniciais do primeiro autor em todas as citações do texto, mesmo que o ano de publicação seja diferente.

Exemplo: R. O. Silva (2010) e P. A. Silva (2016) afirmam que.....

10. REFERÊNCIAS:

Informações não contempladas nestas diretrizes, consultar o Manual APA 7^a ed. Ou Apostila da Biblioteca Central UEL

Deverão ser listadas em ordem alfabética no final do artigo. Ter a segunda linha da referência recuada na quarta letra e alinhadas à esquerda.

OBS: TODAS AS REFERÊNCIAS DEVERÃO CONSTAR O NÚMERO DO DOI QUANDO HOUVER.

Nas referências indique até **20 autores** separando o penúltimo autor com & antes do nome do autor final. Quando houver **21 ou mais autores**, inclua os 19 primeiros e insira reticências, em seguida inclua o último autor.

Exemplo 20 autores:

Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N.,
Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P.,
Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N.,
Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., & Sobrenome, P. P.

Exemplo 21 ou mais autores

Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N.,
Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P.,
Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N.,
Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., Sobrenome, P. P., Sobrenome, N., ... Sobrenome, P.

Exemplos de Referências:

Artigos:

Berndt, T. J. (2002). Friendship quality and social development. *Current Directions in Psychological Science*, 11, 7-10.

Adair, J. G., & Vohra, N. (2003). The explosion of knowledge, references, and citations: Psychology's unique response to a crisis *American Psychologist*, 58(1), 15–23. doi: 10.1037/0003-066X.58.1.15

Artigos Eletrônicos:

Santos, C. P., & Fernandes, D. H. von der (2007). A recuperação de serviços e seu efeito na confiança e lealdade do cliente. *RAC- Eletrônica*, 1(3), 35-51. <http://anpad.org.br/periodicos/base>

Livros

Kashdan, T., & Biswas-Diener, R. (2014). *The upside of your dark side*. Hudson Street Press.

Capítulo de Livros

Nonaka, I. (2008). A empresa criadora de conhecimento. In H. Takeuchi, & I. Nonaka (Orgs.), *Gestão do conhecimento* (Cap. 2, pp. 39-53). Bookman

Capítulo de livro (eletrônico)

Shuhua, L. (2007). The Night of Midautumn Festival. In J. S. M. Lau & H. Goldblatt (Eds.), *The Columbia Anthology of Modern Chinese Literatur* (pp. 95-102). Columbia University Press.
<https://www.worldcat.org/title/columbia-anthology-of-modern-chinese-literature/oclc/>

Anais/Proceedings

Leite, B. M. B. (2012, Setembro 3-6). Mezinhas Antigas e Modernas: a invenção da Triaga Brasílica pelos Jesuítas do Colégio da Bahia no Período Colonial. In Sociedade Brasileira de História da Ciência, *Anais eletrônicos [Anais]*. 13º Seminário Nacional de História da Ciência e da Tecnologia, São Paulo, Brasil.

Tese e dissertação

Leon, M. E. (1998). *Uma análise de redes de cooperação das pequenas e médias empresas do setor das telecomunicações* [Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil].

Ficht, N. (2020). *A informação e sua representação conceitual no domínio da arquivologia e da biblioteconomia no Brasil* [Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina]. Biblioteca Digital. <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000233096>

Documentos da Internet

Organização Pan-Americana da Saúde. (2020, Dezembro 9). *OMS revela principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo entre 2000 e 2019*. <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-revela-principais-causas-morte-e-incapacidade-em-todo-mundo-entre-2000-e>

Ricardo, A. (2021, Dezembro 14). *Cansaço mental? Saiba o que fazer para o seu cérebro relaxar*. Metrópoles. <https://www.metropoles.com/saude/cansaco-mental-saiba-o-que-fazer-para-o-seu-cerebro-relaxar>

Leis, decretos, portarias e documentos governamentais

Lei n. 11.638, de 28 de setembro de 2007. Altera e revoga dispositivos da Lei n. 6.404, de 15 de dezembro de 1976, e da Lei n. 6.385, de 7 de dezembro de 1976, e estende às sociedades de grande porte disposições relativas à elaboração e divulgação de demonstrações financeiras. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2007/lei/l11638.htm

Decreto Lei nº 238/98 de 1 de Agosto. *Diário da República nº 176/98 – I Série A*. Ministério do Ambiente. Lisboa.

Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. (1998). Brasília. http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/Constituicao/Constitui%A7ao.htm

Portaria nº 809/90 de 10 de Setembro. *Diário da República nº 209/90 – I Série*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, da Saúde e do Ambiente e Recursos Naturais.

Ministério da Saúde (BR). (2004). *Sistema de monitoramento de indicadores Programa Nacional de DST e Aids*.<http://www.aids.gov.br/9>

A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologias completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a sequência - introdução, metodologia, resultados e discussão (podem ser incluídas tabelas e figuras), conclusão e referências bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Somente serão aceitos manuscritos de revisão bibliográfica mediante convite oficial e por escrito de um membro do comitê editorial da Revista. Os autores proponentes deverão ter artigos publicados e pesquisas que comprovem a expertise na área da revisão.

No caso de envio espontâneo, a revisão não passará pelo processo de avaliação e será imediatamente arquivada.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Desenvolvimento do tema proposto (com

subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas. Deve envolver temas relevantes e inovadores dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os autores somente poderão apresentar artigos de interesse da revista.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "*Ad hoc*" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.
2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias>).
4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.
5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
6. Incluir o ORCID de todos os autores aprovados para publicação. O identificador ORCID pode ser obtido no [registro ORCID](#). Você deve aceitar os padrões para apresentação de iD ORCID e incluir a URL completa (por exemplo: <http://orcid.org/0000-0002-1825-0097>).

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".

2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO.

3. Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão.

Utilize o botão "incluir autor"

1. No passo seguinte preencher os metadados em inglês.

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: titulo em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

1. A **identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilada revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação Cega por Pares](#).
2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New Roman de tamanho 11;

1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.
2. **Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como documento suplementar “Docs. Sup.”**

Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Artigos

Artigos originais e relevantes com no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Comunicações

Artigos originais e relevantes, contendo no máximo 12 páginas, incluindo referências bibliográficas (limitadas a 16 citações), no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura.

Declaração de Direito Autoral

Os Direitos Autorais para artigos publicados são de direito da revista. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. Nesses casos, os artigos, depois de adequados, deverão ser submetidos a nova apreciação.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.