

DETERMINAÇÃO DE CORPOS CETÔNICOS NA URINA COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE CETOSE SUBCLÍNICA BOVINA E RELAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO DO LEITE¹

(Urinary ketone bodies determination as a tool for fast diagnosis of bovine subclinical ketosis and their relation with milk composition)

CAMPOS, R.¹; GONZÁLEZ, F.¹; COLDEBELLA, A.²; LACERDA, L.²

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

²EMBRAPA - Suínos e Aves (Concórdia, SC).

RESUMO – Nas primeiras semanas de lactação as vacas de alta produção apresentam severas mudanças metabólicas, em virtude do déficit energético derivado do baixo consumo de matéria seca e da alta produção, constituindo fator predisponente para a cetose. As perdas econômicas ocasionadas pela cetose subclínica não têm sido adequadamente avaliadas. O presente trabalho teve por objetivo relacionar a presença de corpos cetônicos na urina com os níveis plasmáticos de beta-hidroxibutirato (BHB) e o conteúdo de sólidos totais no leite. Foram utilizadas 140 vacas multíparas da raça Holandesa de cinco rebanhos com produção intensiva nas condições do Sul do Brasil. Os animais foram amostrados nas semanas 2, 5, 8 e 11 de lactação. Em cada período foram coletadas amostras de urina, amostras de sangue para a quantificação de BHB e amostras de leite para a determinação de sólidos totais. Na urina foram aplicadas quatro tiras reativas para a determinação de corpos cetônicos pelo método do nitroprussiato de sódio e foi determinado o pH. A proporção de vacas positivas a cetonúria foi de 11,2%. Valores de BHB acima de 1,2 mmol/L (ponto de corte para cetose) estiveram presentes em 12,4% das vacas. Concluiu-se que a cetose subclínica pode ser monitorada através tiras reagentes de corpos cetônicos na urina. Não foi encontrada correlação entre os sólidos totais no leite e o estado de cetose do animal.

Palavras-chave: cetose, corpos cetônicos, pós-parto, urina,

ABSTRACT – In early lactation, dairy cows high-yielding production suffer a variety of metabolic changes derived from energy deficiency, due to poor dry matter ingestion and high milk production, which are factors that predispose to ketosis. The main objective of the present paper was to relate the presence of urine ketone bodies with beta-hydroxybutyrate serum levels and total solids in milk. One hundred and forty multiparous Holstein-Friesian dairy cows high-yielding production belonging to five commercial dairy herds in semi-intensive production systems of southern Brazil were used. Sampling was done at 2, 5, 8 and 11 post-calving weeks. In each period samples of urine, blood and milk were obtained for determination of ketone bodies, beta hydroxybutyrate and total solids, respectively. Four different strips for testing ketone bodies in urine by sodium nitroprussiate method were used. Also, urinary pH was measured. The proportion of cows positive to ketone bodies in urine was 11,2%. BHB values above 1,2 mmol/L (cut-off point for ketosis) were present in 12,4% of the cows. In conclusion, the subclinical ketosis in dairy cows may be diagnosed through the use of strips for urine ketone bodies. No relation between ketone bodies and milk components were found in the cow.

Key-words: ketosis, ketone bodies, postpartum, urine.

¹Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq, Contrato 470897-2003.

Introdução

A cetose é um transtorno comum nos rebanhos leiteiros, definida como uma desordem do metabolismo de carboidratos e das gorduras e caracterizada pelo incremento de corpos cetônicos no sangue (GEISHAUSER *et al.*, 1998). Sua principal causa é um desbalanço energético, denominado Balanço Energético Negativo (BEN). Apresenta-se nas primeiras semanas pós-parto (ENJALBERT *et al.*, 2001) e atinge principalmente animais de alta produção e elevada condição corporal ao parto.

A cetose faz parte do grupo de enfermidades metabólicas ou da produção, junto com a hipocalcemia, a síndrome de fígado gorduroso, o deslocamento de abomaso, a retenção de placenta e a acidose ruminal (MOORE e ISLHER, 1997; HERDT, 2000; OVERTON e WALDRON, 2004). Alguns autores estimam que a prevalência da cetose em bovinos leiteiros poderia estar entre 8-34% (GEISHAUSER *et al.*, 1998; DUFFIELD, 2000).

A cetose é classificada como clínica ou subclínica e como primária ou secundária segundo a origem, os sinais clínicos, a prevalência e o curso da doença (GEISHAUSER *et al.*, 1998). Acredita-se que as perdas econômicas ocasionadas pela cetose subclínica excedam às perdas ocasionadas pela cetose clínica (DUFFIELD, 2000). O período de maior risco de apresentação pode variar entre as duas primeiras semanas pós-parto até a nona semana, dependendo de: fatores individuais (genética, adaptação metabólica), da produção durante a primeira fase da lactação, o manejo alimentar, o consumo de matéria seca, a condição corporal ao parto e o momento do pico de lactação (DUFFIELD, 2000). O diagnóstico laboratorial da cetose é baseado na determinação de corpos cetônicos no sangue, na urina ou no leite. Na cetose, o beta-hidroxiacetato (BHA), principal corpo cetônico, apresenta níveis mais elevados no sangue, embora, o limite como valor diagnóstico ("cut-off point"), ainda seja controverso devido aos diferentes valores que a literatura informa. Valores inferiores a 1.0 mmol/L são aceitos como normais, valores entre 1-3 mmol/L indicariam cetose subclínica (GEISHAUSER *et al.*, 1998). No entanto, LAGO *et al.* (2004) informam de possíveis casos de cetose com valores de BHA abaixo de 1,4 mmol/L, valor usado como diagnóstico pela maioria de autores (ENJALBERT *et al.*, 2001). O acetoacetato apresenta elevada instabilidade

reativa, já que se descompõe em acetona e dióxido de carbono. A alta volatilidade da acetona a torna pouco útil na rotina diagnóstica (DUFFIELD, 2000).

Diversos efeitos negativos sobre a produção são ocasionados pela própria cetose ou pelas seqüelas que dela se derivam (GEISHAUSER *et al.*, 1997; HERDT, 2000; OETZEL, 2003; CORASSIN, 2004). Por outro lado, a cetose ocasiona diminuição direta da produção de leite e mudanças na composição do mesmo. A porcentagem de gordura pode aparecer aumentada em casos de cetose subclínica (DUFFIELD, 2000). Esta associação entre gordura no leite e cetose, pode ser devida à maior disponibilidade de BHB e ácidos graxos para síntese de gordura na glândula mamária, provenientes da β -oxidação na lipólise do tecido adiposo. No entanto, a queda nos valores de proteína láctea pode ser devida ao desbalance energético que afeta a síntese de proteína bacteriana (REIST *et al.*, 2002).

O presente trabalho teve por objetivo relacionar a presença de corpos cetônicos na urina com os níveis plasmáticos de beta-hidroxiacetato e observar a associação destes com o conteúdo de sólidos totais no leite, visando avaliar a possível influência da cetose sobre a composição do leite.

Materiais e Métodos

Para o presente trabalho foram utilizadas 140 vacas multíparas da raça Holandesa pertencentes a cinco rebanhos comerciais com sistema de produção intensivo e produções médias acima de 25 kg/dia. A base da alimentação foi pastagem Tifton (*Cynodon nemfluesis*), silagem de sorgo e de milho, concentrado e suplemento mineral. O cálculo nutricional da ração foi conferido mediante o programa *Spartan Ration Evaluator* (Michigan State University). Os animais foram amostrados nas semanas 2, 5, 8 e 11 de lactação. Em cada período e cada rebanho, foram coletadas amostras de urina de sete vacas, mediante indução da micção por massagem perineal, em recipientes estéreis. As análises na urina foram: determinação digital de pH (OrionÒ, Brasil), densidade por refratometria (Carl Zeiss JenaÒ, Germany) e avaliação de corpos cetônicos em três fitas reagentes (MTK: Machery

und Nagel, Germany, KDT: Roche Diagnostic, Germany e MTX: Bayer Corp, USA), e em tabletes reativos. (ACT: WDT, Germany).

Foram coletadas amostras de sangue mediante venipunção coccígea em sistema vacutainer e tubos sem anticoagulante. A amostra foi transportada sob refrigeração até o laboratório onde, por centrifugação (2500 rpm por 15 minutos) foi obtido soro e congelado a -20°C até o momento da determinação de beta-hidroxibutirato (BHB) mediante ensaio enzimático ultra-violeta (Randox, UK). Tanto as amostras de urina como as de sangue foram colhidas após a ordenha da manhã. As amostras do leite foram coletadas na ordenha da tarde diretamente dos copos coletores da ordenhadeira, conservadas com bromopol (2-bromo, 2-nitro-1,3 propanediol) e remetidas ao Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros (Universidade de Passo Fundo), onde mediante técnica no infra-vermelho próximo (NIRS), em aparelho automatizado (Bentley Instruments, EUA), foram analisados os componentes do leite: gordura, proteína, lactose e sólidos totais. A contagem de células somáticas (CCS) foi feita através de citometria de fluxo (Bentley Instruments, EUA). Mediante análise enzimática colorimétrica, foi determinada a concentração de uréia no leite. A análise estatística incluiu os procedimentos CORR e ANOVA do programa SAS (2001).

Resultados e Discussão

Nos ruminantes, é possível encontrar normalmente, em especial algumas horas depois da refeição, níveis aumentados de corpos cetônicos, entre os quais os mais abundantes são o acetoacetato e o beta-hidroxibutirato. A correlação desses metabólitos no sangue e na urina é alta (GEISHAUSER *et al.*, 1998; DUFFIELD, 2000) o que facilita a sua avaliação. O aumento de corpos cetônicos é diretamente proporcional à mudança associada com a mobilização de tecido adiposo decorrente de insuficiente aporte de energia na ração ou de depressão da ingestão de matéria seca (MOORE e ISHLER, 1997; DUFFIELD, 2000), situação que é comum desde o início da lactação até o pico de produção nos rebanhos leiteiros de alta produção. No presente trabalho encontrou-se que os maiores valores de BHB foram na 8ª semana, concordando com o pico da lactação. Na TABELA 1 apresentam-se os valores médios de BHB e os principais indicadores de qualidade do leite bem como a produção média de leite. Na análise de variância não foi achado efeito significativo do período sobre as variáveis relacionadas com a composição do leite.

TABELA 1 – MÉDIA, ERRO PADRÃO E NÍVEL DESCRITIVO DE PROBABILIDADE DO TESTE F(p) DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE PERÍODO SOBRE A COMPOSIÇÃO DO LEITE, OS PRINCIPAIS INDICADORES DE QUALIDADE DO LEITE E OS VALORES SÉRICOS DE BHB EM VACAS DE ALTA PRODUÇÃO NO PLANALTO MEDIO DO RIO GRANDE DO SUL DURANTE 2003-2004.

Componente	Semana de Lactação				
	2	5	8	11	p
Gordura (g%)	3,62 ± 0,10	3,77 ± 0,12	3,59 ± 0,09	3,55 ± 0,09	0,4445
Proteína (g%)	2,95 ± 0,04	2,84 ± 0,04	2,86 ± 0,05	2,91 ± 0,04	0,2892
Lactose (g%)	4,56 ± 0,03	4,56 ± 0,04	4,58 ± 0,05	4,65 ± 0,03	0,2745
STOTAL ¹ (g%)	11,66 ± 0,13	11,57 ± 0,14	11,47 ± 0,12	11,58 ± 0,12	0,8049
SNG ² (g%)	8,03 ± 0,10	7,79 ± 0,11	7,88 ± 0,10	8,03 ± 0,11	0,2940
IPG ³	0,84 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,3492
NUL ⁴	3,49 ± 0,28	3,74 ± 0,30	3,26 ± 0,34	3,42 ± 0,39	0,7923
Produção ⁵	32,6 ± 1,3	34,8 ± 2,11	34,13 ± 1,65	29,85 ± 1,58	0,1808
CCS ⁶	296 ± 70,18	521 ± 139,7	271 ± 90,34	411 ± 114,0	0,3223
BHB ⁷	0,58 ± 0,04	0,74 ± 0,07	0,78 ± 0,06	0,69 ± 0,06	0,0620

¹STOTAL= Sólidos Totais, ²SNG= Sólidos Não Gordurosos, ³IPG= Índice Proteína Gordura, ⁴NUL= Nitrogênio Uréico no Leite, em mmol/l, ⁵Produção= Média individual diária em (L), ⁶CCS=Contagem de Células Somáticas em (10³ células/mL), ⁷BHB= Beta hidroxibutirato em (mmol/L).

Os resultados médios de BHB encontrados estão abaixo dos níveis considerados como indicadores de cetose. Os valores de BHB são considerados normais quando seu valor é inferior a 1,0 mmol/L (KANEKO, 1997; GEISHAUSER *et al.*, 1998). Segundo DUFFIELD (2000) o nível individual de BHB e a expressão de sinais evidentes de cetose são muito variáveis. No entanto, os valores mais elevados correspondem às semanas 5 e 8 onde igualmente apresentaram-se as maiores produções do leite. Coerente com que no leite pode acontecer um aumento dos níveis de gordura, quando existe mobilização de tecido adiposo, as percentagens de gordura na 5ª semana são as mais elevadas, o qual pode estar refletindo a presença de precursores para a síntese de gordura como compensação gliconeogénica no balance energético negativo. GEISHAUSER *et al.* (2000) incluíram dentro de seu estudo a relação entre CCS e a positividade aos testes de cetose. No presente trabalho encontrou-se, que a maior contagem de CCS esteve na 5ª semana, quando os valores de BHB estiveram acima da média dos quatro períodos analisados. No mesmo período foi detectado o maior valor de uréia no leite (3,74 mmol/L), embora os valores encontrados estejam dentro dos níveis aceitos como referência para vacas leiteiras de alta produção, os quais estão no intervalo de 3,5 até 5,8 mmol/L (KANEKO, 1997; JONKER *et al.*, 1998). Estes achados poderiam estar mostrando um efeito negativo do BEN, sobre a composição do leite (aumento da gordura e diminuição do índice proteína/gordura ou IPG) e sobre a saúde da glândula mamária identificado com o aumento da contagem das CCS.

As fitas reagentes para o diagnóstico de cetose usadas no experimento, têm como princípio ativo o nitroprussiato de sódio, que em presença de corpos cetônicos em meio saturado por amônia muda a cor original em proporção ao nível de corpos cetônicos. Assim, as fitas podem ser usadas tanto na urina como no leite (GEISHAUSER *et al.*, 1998; GEISHAUSER *et al.*, 2000). A sua sensibilidade, capacidade para indicar casos positivos de cetose, e a especificidade, proporção dos casos

negativos, dependem do nível de corpos cetônicos excretados pelo animal, o que constitui a maior dificuldade no uso rotineiro das fitas na avaliação da cetose. Em casos nos quais os valores de acetoacetato excretado na urina não sejam elevados, a fita perde sensibilidade. De forma normal, a urina não contém metil-cetona nem acetoacetato. Por outra parte, a presença de L-Dopa e de ácido fenil pirúvico não presentes em forma normal, pode gerar falsos positivos a corpos cetônicos quando são determinados na urina (DUNLAP *et al.*, 2000). Estas duas razões, ausência de corpos cetônicos na urina e a quase nula presença de substâncias que alterem a prova, fazem do teste de corpos cetônicos em urina um meio de diagnóstico confiável e específico.

No presente experimento encontrou-se 11,22% de animais positivos a corpos cetônicos na urina. CORASSIN (2004) observou uma prevalência de 17,5% para cetose, em trabalho efetuado em similares condições no Brasil. No entanto, na presente pesquisa só 6,5% dos animais apresentaram valores séricos de BHB superiores a 1,2 mmol/L, e 12,45% mostraram valores acima de 1,0 mmol/L. Dos animais positivos à prova das fitas, 2,8% apresentaram níveis séricos de BHB entre 0,834 até 1,0 mmol/L, valor bem superior ao 0,41 mmol/L sugerido por KANEKO (1997) como valor normal. Isto pode estar indicando um valor inferior de ponto de corte ("cut-off point") para definir animais positivos à cetose dentro das condições dos rebanhos estudados. A percentagem de animais positivos na prova das fitas coloca em evidência a prevalência da cetose, fato que está dentro dos níveis epidemiológicos informados internacionalmente (DUFFIELD, 2000; ENJALBERT *et al.*, 2001; OETZEL, 2003; CORASSIN, 2004).

Na TABELA 2 são apresentados os coeficientes de correlação linear de Pearson entre o BHB e as fitas indicadoras de corpos cetônicos em urina. As informações apresentam clara evidência da especificidade da prova e permitem a seleção de qualquer uma das quatro fitas testadas para o diagnóstico de cetose subclínica, uma vez, que entre elas foi determinada correlação altamente significativa.

TABELA 2 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE QUATRO TIRAS REAGENTES PARA A DETECÇÃO DE CORPOS CETÔNICOS NA URINA E A CONCENTRAÇÃO DE BETA-HIDROXIBUTIRATO SÉRICO (BHB) NAS PRIMEIRAS SEMANAS DE LACTAÇÃO DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA NO PLANALTO MEDIO DO RIO GRANDE DO SUL DURANTE O PERÍODO DE 2003-2004.

	MTX	MTK	KDT	ACT	BHB
MTX	1				
MTK	0,960**	1			
KDT	0,897**	0,920**	1		
ACT	0,778**	0,832**	0,856**	1	
BHB	0,408**	0,425**	0,419**	0,357*	1

** (P<0,0001); * (P<0,0002).

As fitas MTX, MTK e KDT mostraram um valor maior na correlação entre elas, do que os tabletes ACT. Em forma prática, o uso das fitas oferece vantagens sobre os tabletes pela rapidez do teste e a leitura mais confiável. O uso das fitas é suficiente na avaliação da cetose, passando a escolha da fita para aspectos, como, custo e oferta no mercado.

Os valores de pH da urina foram $8,35 \pm 0,3$; $8,20 \pm 0,24$; $8,26 \pm 0,12$ e $8,23 \pm 0,23$ para as semanas 2, 5, 8 e 11 respectivamente. O valor de pH urinário corresponde ao esperado para bovinos com dieta de alto conteúdo de fibra (BOUDA *et al.*, 2000). As análises estatísticas não mostraram relação entre o pH e os valores de BHB, nem com as fitas reagentes. Assim a determinação do pH pode ser dispensada dentro dos procedimentos diagnósticos de cetose subclínica.

Devido a que as quatro fitas possuem alta correlação foi selecionada uma delas (MTX) para ser incluída dentro de uma análise de correlação dos corpos cetônicos na urina e os valores séricos de BHB sobre os componentes dos sólidos totais do leite, na hipótese de que eles poderiam, em caso de cetose, induzir alterações no leite. Não foi observada correlação significativa para nenhum dos parâmetros avaliados. O comportamento da resposta foi similar tanto para a prova na urina como nos valores séricos de BHB. Ainda que diferentes autores descrevem a possibilidade de alterações na composição do leite causada pela cetose (MOTTRAM, 1997; DUFFIELD, 2000; HERDT, 2000) não são apresentados trabalhos específicos que documentem essa hipótese.

Conclusões

Foi achada uma prevalência de 11,22% de positividade a corpos cetônicos na urina. Embora, este trabalho não seja um estudo epidemiológico apresenta uma situação latente de cetose subclínica nas vacas leiteiras de alta produção. O estudo demonstra que a cetose subclínica pode ser monitorada mediante uma rápida e econômica prova de campo utilizando tiras reagentes de detecção de corpos cetônicos na urina. A correlação entre os resultados das tiras e os níveis séricos de beta-hidroxibutirato é moderada. Ainda sendo observadas algumas modificações na composição do leite (aumento de gordura, CCS e queda na relação proteína:gordura), os resultados não são suficientes para demonstrar o efeito da presença dos corpos cetônicos sobre os diferentes componentes do leite nas condições deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BOUDA, J.G.; QUIROZ-ROCHA, G.F.; GONZÁLEZ, F.D. Importância da coleta e análise de líquido ruminal e urina. In: GONZÁLEZ, F.D.; BATISTA BORGES, J.; CECIM, M. (Ed.). **Uso de provas de campo e laboratório em doenças metabólicas e ruminais em bovinos**. Porto Alegre, 2000. p. 13-16.
- CORASSIN, C.H. **Determinação e avaliação de fatores que afetam a produtividade de vacas leiteiras: Aspectos sanitários e reprodutivos**. Piracicaba, 2004. 113p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- DUFFIELD, T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, n. 16, p. 231-254, 2000.
- DUNLAP, T.F.; KOHN, R.A.; DAHL, G.E.; VARNER, M.; ERDMAN, R.A. The impact of somatotropin, milking frequency, and photoperiod on dairy farm nutrient flows. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 83, p. 968-973, 2000.
- ENJALBERT, F.; NICOT, M.C.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 84, p. 583-589, 2001.
- GEISHAUSER, T.; LESLIE, K.E.; TENHAG, J.; BASHIRI, A. Evaluation of eight cow-side ketone test in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 83, p. 296-299, 2000.
- GEISHAUSER, T.; LESLIE, K.E.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T. Evaluation of eighth cow-side test for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 81, p. 438-443, 1998.
- GEISHAUSER, T.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.; EDGE V. An Evaluation of milk ketone test for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 80, p. 3188-3192, 1997.
- HERDT, T.H. Ruminant adaptations to negative energy balance: influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, n. 16, p. 215-230, 2000.
- JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 81, p. 2681-2692, 1998.
- KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1997. 975 p.
- LAGO, E.P.; COSTA, A.P.D.; PIRES, A.V.; SUSIN, I.; FARÍAS, V.P.; DO LAGO, L.A. Parâmetros Metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Science**, Niterói, n. 11, p. 98-103, 2004.
- MOORE, D.A.; ISLHER, V. Managing dairy cows during the transition period: focus on ketosis. **Veterinary Medicine**, v. 92, p.1061-1072, Dec. 1997.
- MOTTRAM, T. Automatic monitoring of the health and metabolic status of dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, n. 48, p. 209-217, 1997.
- OETZEL, G.R. Ketosis and hepatic lipoidosis in dairy herd. In: ANNUAL CONFERENCE AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS, 36., 2003, Columbus. **Proceedings**. Columbus, 2003. p. 1-19.
- VERTON, T.R.; WALDRON, M.R. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 87, p. E105, 2004.
- REIST, M.; ERDIN, D.K.; VONEUW, D.; TSCHÜMPERLIN, K.M.; LEUENBERGER, H.; CHILLIARD, Y.; HAMMON, H.M.; MOREL, C.; PHILIPONA, C.; ZBINDEN, Y.; KUENZI, N.; BLUM, J. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 85, p. 3314-3327, 2002.
- SAS Institute. **SAS? User's Guide**: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2001. 285p.

Recebido para publicação: 12/05/2005

Aprovado: 11/10/2005