

**ALINE NAIME RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO COMPLEXO CROMO-EDTA E DA CREATININA COMO  
INDICADORES DE VOLUME URINÁRIO EM BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Edenio Detmann

Coorientadora: Luciana Navajas Rennó

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696a  
2019  
Rodrigues, Aline Naime, 1994-  
Avaliação do complexo cromo-EDTA e da creatinina como  
indicadores de volume urinário em bovinos / Aline Naime  
Rodrigues. – Viçosa, MG, 2019.  
45f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Edenio Detmann.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.28-34.

1. Bovinos. 2. Cromo. 3. EDTA. 4. Creatinina. 5. Urina.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

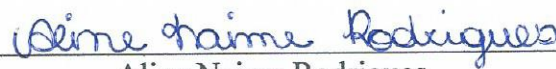
CDD 22 ed. 636.2

**ALINE NAIME RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO COMPLEXO CROMO-EDTA E DA CREATININA COMO  
INDICADORES DE VOLUME URINÁRIO EM BOVINOS**

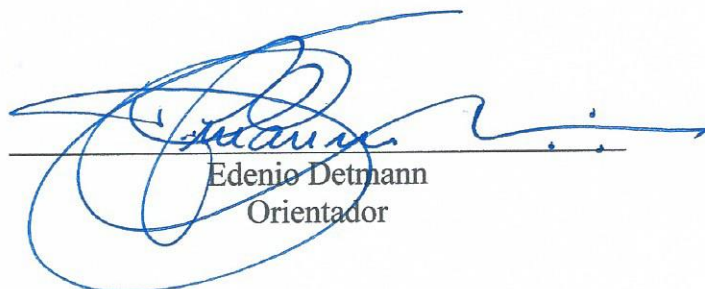
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de agosto de 2019



Aline Naime Rodrigues

Autora



Edenio Detmann

Orientador

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Edmar Naime Rodrigues e Selma G. da Silva N. Rodrigues, por serem meu alicerce e exemplo de perseverança, carinho e amor.

Aos meus irmãos Juninho e Bruna. Com vocês sei que nunca estarei sozinha.

Às minhas tias, Edmaura, Elaine e Eleni, por todo apoio, compreensão e presenças constantes em minha vida.

Ao Tadeu Eder, por toda paciência, carinho e apoio incondicional.

Aos amigos Cris Luana, Cris Viol, Érica, Jarbas, João Paulo, Larissa, Malber e Thaís, por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Às estagiárias Alice, Laís e Sábata, que tanto me ajudaram durante todo o experimento.

À amiga de vida e de república Larissa, pelas conversas e risadas.

Aos funcionários do Laboratório de Animais, Jojô, Zezé, Mauro e Chicão, pela importante ajuda na realização deste experimento.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Monteiro, Matheus e Mário, pela ajuda na realização das análises laboratoriais.

À professora Luciana, pela execução da cirurgia dos animais e também pela ajuda durante as coletas.

Ao meu orientador Edenio Detmann, pelos constantes ensinamentos e pela confiança a mim depositada para realização deste trabalho. Agradeço a quem admiro por ser exemplo de honestidade, competência e profissionalismo.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, pelos ensinamentos transmitidos, competência, dedicação e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pelo apoio e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq, INCT-Ciência Animal, FAPEMIG e CAPES por proverem recursos para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Aline Naime Rodrigues, filha de Edmar Naime Rodrigues e Selma Guimarães da Silva Naime Rodrigues, nasceu no dia 3 de março de 1994, em Pará de Minas, Minas Gerais.

Em março de 2012 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso de graduação em Zootecnia em janeiro de 2017.

Em julho de 2017 iniciou o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em 30 de agosto de 2019.

## RESUMO

RODRIGUES, Aline Naime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Avaliação do complexo cromo-EDTA e da creatinina como indicadores de volume urinário em bovinos.** Orientador: Edenio Detmann. Coorientadora: Luciana Navajas Rennó.

A creatinina e o complexo Cr-EDTA infundido via intravenosa foram comparados como indicadores de estimação do volume urinário em novilhas Nelore alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. Foram utilizadas dez fêmeas Nelore ( $392 \pm 24$  kg) organizadas em delineamento em crossover com duas dietas e dois períodos experimentais. O experimento foi analisado por intermédio de modelo incluindo o efeito fixo de dieta e os efeitos aleatórios de animal e período experimental. Os componentes de variância foram estimados por intermédio do método da máxima verossimilhança residual. Foram avaliadas dietas de relação volumoso:concentrado: 90:10 e 50:50, com base na matéria seca. O consumo voluntário diferiu ( $P < 0,01$ ) entre as dietas, sendo maior com a elevação do nível de concentrado. Verificou-se aumento ( $P < 0,01$ ) no consumo de matéria orgânica digerida com a redução na participação do volumoso na dieta. As concentrações urinárias de creatinina e cromo nas coletas totais de urina, não variaram em função da dieta ( $P > 0,31$ ), dias de coleta ( $P > 0,08$ ) ou apresentaram interação entre esses fatores ( $P > 0,55$ ). O aumento no volume urinário levou à maior diluição do indicador no total de urina produzido, uma vez que as concentrações urinárias de cromo e creatinina foram forte e negativamente ( $P < 0,01$ ) correlacionadas com o volume urinário. Além disso, verificou-se correlação forte e positiva ( $P < 0,01$ ) entre as concentrações urinárias dos indicadores. A excreção de creatinina apresentou valor constante de  $18,36 \pm 1,37$  mg/kg de peso corporal e não apresentou variação em função da dieta ( $P > 0,07$ ), dias de coleta ( $P > 0,64$ ) ou interação entre esses fatores ( $P > 0,63$ ). A recuperação de cromo urinário não foi afetada pela dieta ( $P > 0,95$ ), dia de coleta ( $P > 0,71$ ) ou sua interação ( $P > 0,41$ ). O valor médio de recuperação obtido foi de 1,37 mg/mg. A avaliação das amostras *spot* evidenciou não haver influência de dieta ( $P > 0,46$ ) ou interação entre dieta e horário de coleta ( $P > 0,07$ ) sobre a concentração urinária de ambos indicadores. Contudo, para ambos os indicadores foi verificada diferença quanto ao momento de amostragem ( $P < 0,01$ ). Devido à alta correlação entre os indicadores, as menores ( $P < 0,05$ ) concentrações urinárias para ambos foram verificadas às 6h00. Nenhuma variação foi detectada na concentração sanguínea de cromo ( $P > 0,32$ ) ao longo do dia. Tanto a creatinina como o cromo produziram estimativas acuradas do volume urinário ( $P > 0,33$ ). Contudo, maior exatidão foi verificada para a creatinina. A menor exatidão constituiu a maior limitação do cromo;

entretanto, uma limitação inerente à creatinina comparada ao cromo foi sua menor precisão. A avaliação hepática da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase não evidenciou variação ( $P>0,76$ ) de sua atividade ao longo do experimento. Tanto a creatinina como o complexo cromo-EDTA produzem estimativas de volume urinário similares ao obtido com a coleta total de urina em bovinos. Contudo, a despeito da maior precisão das estimativas obtidas com o cromo, os valores obtidos com a creatinina exibem menores vícios e são, portanto, mais exatos. A partir dessa assertiva, considerando-se o custo e as dificuldades de manejo na utilização do cromo-EDTA, a creatinina mostra-se indicador mais viável para estimação do volume urinário em bovinos.

Palavras-chave: Creatinina. Cromo. Volume urinário. Bovinos.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Aline Naime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Evaluation of chromium-EDTA complex and creatinine as markers for urinary volume in cattle.** Advisor: Edenio Detmann. Co-Advisor: Luciana Navajas Rennó.

Creatinine and the intravenously infused Cr-EDTA complex were compared as markers for urinary volume estimation in Nelore heifers fed diets containing different concentrate levels. Ten Nelore females ( $392 \pm 24$  kg) organized according a crossover design with two diets and two experimental periods were used. The experiment was analyzed using a model including the fixed effect of diet and the random effects of animal and experimental period. The variance components were estimated using the residual maximum likelihood method. Diets of forage-to-concentrate ratio of 90:10 and 50:50 on dry matter basis were evaluated. Voluntary intake differed ( $P < 0.01$ ) between diets, being higher as the concentrate level increased. The intake of digested organic matter increased ( $P < 0.01$ ) as the dietary concentrate increased. Urinary creatinine and chromium concentrations in total urine samples did not vary according to diet ( $P > 0.31$ ), collection days ( $P > 0.08$ ) or show interaction between these factors ( $P > 0.55$ ). The increase in urinary volume led to a higher dilution of the markers in the total urine output, as urinary chromium and creatinine concentrations were strongly and negatively ( $P < 0.01$ ) correlated with urinary volume. In addition, there was a strong and positive correlation ( $P < 0.01$ ) between the urinary concentrations of the markers. Creatinine excretion had a constant value of  $18.36 \pm 1.37$  mg/kg body weight and did not vary according to diet ( $P > 0.07$ ), collection days ( $P > 0.64$ ) or interaction between these factors ( $P > 0.63$ ). Urinary chromium recovery was not affected by diet ( $P > 0.95$ ), collection day ( $P > 0.71$ ) or its interaction ( $P > 0.41$ ). The average recovery obtained in this study was 1.37 mg/mg. The evaluation of urinary spot samples showed no influence of diet ( $P > 0.46$ ) or interaction between diet and collection time ( $P > 0.07$ ) on the urinary concentration of both markers. However, for markers there was difference according to the moment of sampling ( $P < 0.01$ ). Due to the high correlation between the markers, the lowest ( $P < 0.05$ ) urinary concentrations for both were verified at 6h00. No variation was detected in blood chromium concentration ( $P > 0.32$ ) along day. Both creatinine and chromium produced accurate estimates of urinary volume ( $P > 0.33$ ). However, greater accuracy was observed for creatinine. The lower accuracy was the major limitation of chromium; however, an inherent limitation of creatinine compared to chromium was its lower precision. The hepatic evaluation

of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase enzyme showed no variation ( $P>0.76$ ) of its activity throughout the experiment. Both creatinine and chromium-EDTA complex produce urinary volume estimates similar to those obtained from total urine collection in cattle. However, despite the higher precision of the estimates obtained with chromium, the values obtained with creatinine exhibit lower bias and are more accurate. From this assertion, considering the higher cost and management constraints in the use of chromium-EDTA, creatinine is the most viable marker for urinary volume estimation in cattle.

Keywords: Creatinine. Chromium. Urinary volume. Cattle.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28

## INTRODUÇÃO

O conhecimento do volume urinário excretado por bovinos é importante para obtenção de estimativas de síntese microbiana ruminal e da excreção e eficiência de utilização do nitrogênio (Hennessy e Nolan, 1988; Chen e Gomes, 1992; Menezes et al., 2016). No que diz respeito aos métodos usualmente empregados para acessar o volume de urina excretado, tem se utilizado o método de coleta total ou empregando-se indicadores internos ou externos. No entanto, a coleta total apresenta limitações por ser um método laborioso e não ser facilmente aplicável em condições de produção, notadamente sob pastejo. Além disso, os cateteres para coletas em fêmeas e os funis coletores para coletas em machos acarretam em desconforto ao animal, o que pode modificar seu comportamento natural de micção. Assim, métodos de estimação com a utilização de indicadores internos e externos têm sido empregados como alternativas à coleta total.

O indicador interno mais utilizado é a creatinina, metabólito formado no músculo a partir da degradação da molécula de creatina-fosfato por intermédio de reação não enzimática de remoção de água (Nelson e Cox, 2000). Essa degradação ocorre diariamente em taxas relativamente constantes, em torno de 2% do total de creatina (González e Scheffer, 2003). Dessa forma, a excreção de creatinina é proporcional à massa muscular sendo, portanto, relacionada ao peso corporal do animal (Chizzotti et al., 2008; Costa e Silva et al., 2012). Nesse contexto, a partir de uma ou mais amostras pontuais de urina (amostra *spot*), na(s) qual(is) será mensurada a concentração de creatinina, é possível se estimar o volume urinário por intermédio da razão entre a excreção total, obtida com base no peso corporal, e a concentração urinária. Trabalho conduzidos em condições tropicais e não tropicais permitem evidenciar que a

creatinina constitui indicador acurado para estimação da produção urinária, não sendo afetada por dias de coleta, momentos de coleta dentro de dias, condição sexual, energia da dieta ou suplementação com compostos nitrogenados (Barbosa et al., 2006; Broderick e Reynal, 2009; Silva Jr. et al., 2018, Tebbe e Weiss, 2018; Lee et al., 2019).

Por outro lado, em se tratando de indicadores externos, tem-se como principal opção a infusão endovenosa de sais de lítio (Bowen et al., 2009) ou de cromo complexado com ácido etileno diamino tetra-acético (Cr-EDTA; Downes e McDonald, 1964; Bowen et al., 2009). A quantificação do volume urinário em ruminantes por intermédio da administração intravenosa desses indicadores externos requer o conhecimento de sua recuperação urinária e da sua variação diurna na excreção.

O sulfato de lítio quando usado como indicador de volume urinário apresentou baixa recuperação na urina mesmo após seis dias de infusão intravenosa, com influência da qualidade da dieta (46% em feno de baixa de qualidade e 73% em feno de alfafa). Esta baixa recuperação deve-se à transferência do lítio do plasma para o rúmen via saliva, fato suportado pela alta concentração de lítio nas fezes dos animais (17% e 11% do total de lítio infundido diariamente para feno de baixa qualidade e feno de alfafa, respectivamente; Bowen et al., 2009). Desse modo, o lítio constitui indicador de volume urinário ineficaz por apresentar viés elevado e variável em sua recuperação urinária.

Trabalhos no qual o complexo Cr-EDTA foi utilizado como indicador por via endovenosa permitem evidenciar recuperações superiores a 90% do cromo infundido, sendo essa considerada constante entre animais, tanto em ovinos (Downes e McDonald, 1964) como em bovinos (Bowen et al., 2009). A recuperação incompleta do cromo infundido parece estar associada à excreção do cromo nas fezes, a qual representa, em média, 2 a 5% do indicador infundido (Bowen et al., 2009), ou à possível ligação do cromo à albumina (Fogh-Andersen, 1980). No entanto, coletas *spot* de urina em curtos intervalos (2-3 horas) deveriam ser adotadas,

pois há alta variação na concentração urinária de cromo ao longo do dia (Bowen et al., 2009), o que pode constituir uma desvantagem em relação ao uso da creatinina para estimação do volume urinário. Além desse aspecto, o uso de cateter inserido via intravenosa para infusão do indicador e a necessidade de uma bomba peristáltica acoplada aos animais pode causar desconforto, além de constituir fator complicador de manejo a nível de campo, principalmente com animais em pastejo. Assim, embora o Cr-EDTA possa apresentar potencial como indicador de volume urinário, algumas questões ainda precisam ser melhor elucidadas como o seu uso em diferentes dietas ou em um grupo de animais com alta variação de peso corporal, além de relevarem-se questões associadas a uma possível intoxicação por cromo (NRC, 1997).

Um dos pontos contrastantes entre o uso de indicadores externos e a creatinina reside sobre os métodos analíticos utilizados para avaliação de sua concentração urinária. A creatinina é normalmente avaliada por métodos simples, de baixo custo e rotineiros em laboratórios. Por outro lado, indicadores externos metálicos, como o cromo, demandam o uso de técnicas instrumentais de maior custo e menor acesso, como a espectrofotometria de absorção atômica.

No entanto, trabalhos comparativos entre a creatinina e o Cr-EDTA como indicadores para estimação do volume urinário, considerando-se sua exatidão, precisão e sensibilidade (i.e., capacidade de detecção de diferenças entre diferentes situações experimentais) não foram encontrados na literatura consultada.

Assim, estabeleceu-se como hipótese nesse estudo que a creatinina e o complexo Cr-EDTA possuem exatidão, precisão e sensibilidades similares como indicadores para estimação do volume urinário em bovinos. Objetivou-se com este trabalho comparar a creatinina e o complexo Cr-EDTA infundido via intravenosa como indicadores para estimação do volume urinário em bovinos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Foram utilizadas dez fêmeas Nelore com idade média inicial de 54 meses e peso corporal de  $392 \pm 24$  kg. Os animais foram alocados em baias individuais ( $2 \times 5$  m) cobertas, com piso de concreto, dispostas com comedouro e acesso irrestrito a água e mistura mineral completa (80 g/kg de fósforo). Os procedimentos de manejo e as coletas realizadas nos animais foram conduzidos mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV; protocolo 0112/2018).

Os animais foram alimentados com duas diferentes dietas visando contrastar diferentes concentrações energéticas, sendo essas variáveis no tocante à relação volumoso:concentrado: 90:10 e 50:50, com base na matéria seca (MS). Em ambas as dietas o volumoso utilizado foi a silagem de milho. O concentrado foi composto por farelo de soja e milho grão, sendo a proporção dos ingredientes no concentrado estabelecida visando à obtenção da concentração de 120 g de proteína bruta (PB) por kg de MS total da dieta (Tabela 1). O fornecimento da dieta aos animais foi realizado individualmente todos os dias às 6h00 e às 18h00. O consumo da dieta foi *ad libitum*, proporcionando-se sobras de aproximadamente 100 g por kg de material ofertado.

O experimento foi conduzido conforme um delineamento em *cross-over* (Cochran e Cox, 1957), com dez animais, duas dietas (tratamentos) e dois períodos experimentais com 26 dias cada. No primeiro período cinco animais receberam cada uma das dietas, havendo inversão das mesmas no segundo período experimental. Os primeiros 14 dias de cada período foram

destinados à adaptação dos animais às dietas (Machado et al., 2016). As mensurações foram realizadas do 15º ao 26º dia de cada período.

No 10º dia de cada período experimental procedeu-se à implantação de cateteres (cateter venoso central multilúmen, 14G x 30 cm, Intra Venoseld, Alemanha) nos animais. Os cateteres foram introduzidos cerca de 30 cm no interior da veia jugular. Estes foram lavados com solução de heparina sódica (200 UI/mL) visando evitar sua obstrução com sangue coagulado. No 11º dia às 06h00 procedeu-se à infusão de solução salina (NaCl, 9 g/L) na taxa de 5 mL/h por 24 horas utilizando-se bomba multiseringas programável (BS-9000/6 Multi-phaser, Braintree Scientific Inc, Braintree, MA, EUA). Esse procedimento visou à calibração da bomba e adaptação dos animais ao procedimento. A partir das 6h00 do 12º dia até as 24h00 do 18º dia, a solução de Cr-EDTA foi infundida continuamente em taxa similar à previamente descrita.

A solução de Cr-EDTA foi preparada segundo descrições de Binnerts et al. (1968). Após o preparo, o pH final da solução foi ajustado para 7,0 por intermédio da adição de aproximadamente 22 g/L de hidróxido de sódio (NaOH). A aferição da concentração de cromo na solução foi realizada segundo procedimentos descritos por Rocha et al. (2015). Foram infundidos, aproximadamente, 262,3±0,20 e 255,1±0,07 mg de cromo por dia, no primeiro e no segundo período, respectivamente.

Do 15º ao 17º dias foram realizadas coletas totais de urina. Essas tiveram início às 6h00 e ao final de cada período de 24 horas o volume total de urina foi mensurado. A urina foi coletada através de sonda de Foley de duas vias (nº 26, Rush Amber, Kamuting, Malásia) introduzida na uretra dos animais e acoplada a uma mangueira de polietileno que direcionava a urina a reservatórios de polietileno mantidos em gelo dentro de caixas de isopor. Após a mensuração do volume, duas amostras de 50 mL foram tomadas. A primeira dessas foi armazenada em frasco de polietileno e congelada (-20°C). A segunda alíquota foi diluída na proporção 1:4 em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,036 N previamente ao congelamento (Valadares et al., 1999). As

alíquotas foram utilizadas para posterior quantificação das concentrações de cromo e de creatinina, respectivamente.

No 18º dia de cada período experimental foram realizadas coletas pontuais (*spot*) de urina e de sangue em quatro horários ao longo do dia: 6h00, 12h00, 18h00 e 24h00. A urina foi obtida por estimulação da vulva. Duas alíquotas em cada horário de coleta foram tratadas como previamente descrito para os procedimentos de coleta total. O sangue foi coletado na veia jugular oposta à que foi realizada a infusão do complexo Cr-EDTA utilizando tubos com vácuo e gel acelerador de coagulação (BD Vacutainer®, SST II Advance) e tubos com vácuo e inibidor de coagulação (BD Vacutainer® K2) para avaliação das concentrações séricas e plasmáticas de cromo, respectivamente. As amostras sanguíneas foram mantidas a -20°C. Ainda no 18º dia de cada período realizou-se coleta total de fezes para aferição da excreção fecal de cromo. A mesma iniciou-se às 6h00 e ao final do período de 24 horas as fezes foram pesadas e homogeneizadas manualmente. Uma alíquota de 50 g/kg foi coletada e seca em estufa com circulação forçada de ar (55°C).

Do 19º ao 25º dias de cada período experimental foram avaliados o consumo e a digestibilidade total. Para isso foram coletadas amostras dos alimentos fornecidos do 19º ao 24º dias e de sobras do 20º ao 25º dias. Coleta total de fezes foi realizada no 20º, 22º e 24º dias de cada período. As amostras foram secas conforme descrito anteriormente e compostas por animal em cada período experimental com base no peso seco ao ar.

No dia imediatamente anterior ao início do experimento e nos dias finais de ambos os períodos experimentais, os animais foram submetidos a biópsias hepáticas (Herdt, 2013) para aferição de uma possível intoxicação por cromo. As amostras foram mantidas em ultra freezer (-80°C) até o momento das análises.

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram processadas em moinho de facas com peneira de porosidade de 1 mm e avaliadas quanto aos teores de MS (método INCT-CA G-

003/1), matéria orgânica (MO; método INCT-CA M-001/1) e de PB (método INCT-CA N-001/1) de acordo com métodos normatizados pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (Detmann et al., 2012); e fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) adaptando-se os procedimentos descritos por Barbosa et al. (2015).

A quantificação da concentração de cromo nas amostras de fezes, plasma, soro e urina foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (Avanta  $\Sigma$ , GBC Sientific, Braeside, Victoria, Austrália) segundo procedimento proposto por Rocha et al. (2015). A quantificação da concentração urinária de creatinina foi realizada por intermédio de método enzimático-colorimétrico (Bioclin® K067) em analisador bioquímico automático (BS200E, Mindray, China).

As amostras hepáticas, após descongelamento, foram analisadas quanto à atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. Todos os procedimentos de preparo de amostras, reações e avaliação espectrofotométrica foram conduzidos segundo método colorimétrico Abcam ab185440.

A recuperação de cromo nas amostras totais de urina (para cada dia de avaliação) foi calculada pela razão entre o total de cromo excretado e a sua infusão diária. Nas mesmas amostras, a excreção diária de creatinina foi computada relativamente ao peso corporal médio dos animais em cada período experimental.

A partir das amostras *spot* de urina procedeu-se à estimação do volume urinário a partir das equações:

$$V_{cr} = \frac{D \times R}{[Cr]} \quad (1);$$

$$V_{cre} = \frac{PC \times E}{[Cre]} \quad (2);$$

em que:  $V_{cr}$  e  $V_{cre}$  = volume urinário (L/d) estimados a partir do cromo e da creatinina, respectivamente; D = dose de cromo infundida (mg/d); R = recuperação urinária do cromo

(mg/mg); [Cr] = concentração de cromo na urina (mg/L); PC = peso corporal médio (kg); E = excreção diária de creatinina (mg/kg PC); e [Cre] = concentração de creatinina na urina (mg/L).

O experimento foi analisado por intermédio de modelo incluindo o efeito fixo de dieta e os efeitos aleatórios de animal e período experimental. Os componentes de variância foram estimados por intermédio do método da máxima verossimilhança residual. Para melhor interpretação dos componentes de variância em relação aos diferentes indicadores, os mesmos foram padronizados em função dos valores médios por intermédio da equação:

$$s_p = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2}}{\bar{Y}} \quad (3);$$

em que:  $s_p$  = desvio-padrão padronizado em relação à média;  $\hat{\sigma}^2$  = estimativa do componente de variância;  $\bar{Y}$  = valor médio da variável resposta.

As avaliações do volume urinário; da concentração, excreção e recuperação de cromo; da concentração e excreção de creatinina ao longo dos dias de coleta total; da atividade hepática da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, assim como o padrão de flutuação da concentração sanguínea de cromo e das concentrações de cromo e creatinina nas amostras *spot*, foram interpretadas como medidas repetidas no tempo. A escolha da melhor estrutura de (co)variâncias da matriz residual foi definida segundo o critério de informação de Akaike com correção.

A comparação entre valores observados de coleta total de urina (média dos três dias de avaliação) e preditos por intermédio de ambos os indicadores nas amostras *spot* foi realizado pelo ajustamento de regressão linear simples, sendo os valores preditos considerados como variável independente e os valores observados como variável dependente. Nesse caso, as seguintes hipóteses estatísticas foram avaliadas:

$$H_0 : \beta_0 = 0 \text{ vs. } H_a : \beta_0 \neq 0 \quad (4a);$$

$$H_0 : \beta_1 = 1 \text{ vs. } H_a : \beta_1 \neq 1 \quad (4b);$$

em que  $\beta_0$  e  $\beta_1$  correspondem ao intercepto e inclinação, respectivamente.

Previamente ao ajustamento dos modelos de regressão, os dados foram ajustados para a variação aleatória de animal e período experimental. Os valores preditos e observados foram considerados similares para o caso de não rejeição de ambas as hipóteses de nulidade descritas na equação (4). Adicionalmente, o quadrado médio do erro de predição (QMEP) para ambos os indicadores foi decomposto e interpretado segundo proposições de Bibby e Toutenburg (1977).

Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do procedimento MIXED do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 9.4) adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como esperado, o consumo voluntário diferiu ( $P < 0,01$ ) entre as dietas, sendo maior com a elevação do nível de concentrado (Tabela 2). O impacto simultâneo das dietas sobre os coeficientes de digestibilidade, juntamente com a redução na participação do volumoso na dieta, propiciaram maior ( $P < 0,01$ ) consumo de MO digerida (MOD) para a dieta com 50% de concentrados. A MOD associa-se diretamente à concentração de energia digestível da dieta (Van Soest, 1994). Assim, as duas dietas estabelecidas nesse estudo propiciaram cenários de alimentação energética distintos, podendo ser usadas para representar alimentação de bovinos em diferentes condições de produção.

Todas as variáveis mensuradas como medidas repetidas no tempo apresentaram melhor ajustamento do modelo aos dados por intermédio de matriz de conformação em simetria composta. Nesse sentido, as principais características a serem ressaltadas são: a homogeneidade de variância residual entre as diferentes medidas e a presença de correlação intraclasse constante (Kaps e Lamberson, 2004). A primeira característica figura de forma positiva, uma vez que seria indesejada variabilidade heterogênea entre dias de coletas, o que poderia dificultar o estabelecimento de protocolos de amostragem ou a precisão das medidas. No segundo caso, a constância na correlação intraclasse representa diretamente uma constância na correlação entre as medidas tomadas no mesmo animal.

Tanto o volume urinário como as concentrações urinárias de creatinina e cromo nas coletas totais de urina não variaram em função da dieta ( $P > 0,31$ ), dias de coleta ( $P > 0,08$ ) ou apresentaram interação entre esses fatores ( $P > 0,55$ ; Tabela 3).

Para serem considerados aptos para uso como indicadores, as substâncias avaliadas devem demonstrar sensibilidade em relação à variação natural da variável-resposta a ser mensurada. Nesse sentido, considerando-se fixas a infusão de cromo e a produção muscular de creatinina, o aumento no volume urinário deve levar à maior diluição do indicador no total de urina produzido. Esse comportamento foi verificado no presente estudo, uma vez que as concentrações urinárias de cromo e creatinina foram forte e negativamente ( $P < 0,01$ ; Tabela 4) correlacionadas com o volume urinário; indicando, previamente, sua sensibilidade frente a variações no volume urinário. Destaca-se que verificou-se correlação forte e positiva ( $P < 0,01$ ) entre as concentrações urinárias dos indicadores.

Para garantir a sensibilidade e a precisão das estimativas, os indicadores devem ser capazes de estimar adequadamente a variabilidade entre os animais, mas, simultaneamente, manter o erro experimental em patamares similares ao obtido com a mensuração urinária total. Em termos de variação residual, a concentração urinária dos indicadores comportou-se de forma similar à excreção urinária total, indicando a manutenção da precisão experimental para o caso de sua utilização (Figura 1a). Contudo, ambos apresentaram menor variabilidade entre animais comparados à coleta total. Isso representa, diretamente, uma perda na capacidade de discriminação entre animais, o que pode ser indesejável em termos de diferenciação quando as condições experimentais (e.g., dietas) distintas. Isso parece ser justificável pelo fato de as correlações entre concentração urinária e volume urinário serem fortes (Tabela 4), porém não perfeitas (e.g.,  $r = -1$ ). A correlação intraclasse (i.e., entre medidas tomadas no mesmo animal) foi mais forte para o cromo em comparação com o volume urinário e a concentração urinária de creatinina (Figura 1a). Esse comportamento resulta do fato de o cromo constituir indicador externo, com infusão controlada, ao passo que o volume urinário e a produção de creatinina serem resultantes de processos biológicos, com maior número de interferências ou variações não passíveis de controle experimental.

A excreção de creatinina em relação ao PC dos animais não variou em função da dieta ( $P>0,07$ ), dias de coleta ( $P>0,64$ ) ou apresentou interação entre esses fatores ( $P>0,63$ ; Tabela 5). Esse comportamento corrobora o observado em outros estudos (Albin e Clanton, 1966; Barbosa et al., 2006; Silva Jr. et al., 2018). Análise adicional, indicou não haver variação na excreção de creatinina em função do PC dos animais ( $P>0,85$ ), observando-se valor constante de  $18,36\pm 1,37$  mg/kg PC. Esse valor médio foi inferior aos relatados por outros autores em condições tropicais (Chizzotti et al., 2006; Rennó et al., 2008). Uma provável explicação para esse comportamento pode ser a ocorrência de ganho compensatório nos animais. Apesar de alimentados com dietas com níveis baixos ou moderados de concentrado e apresentarem consumo médio baixo comparados a animais em situação de produção (média de 15,1 e 18,5 g MS/kg PC para as dietas com 10% e 50% de concentrados, respectivamente), os animais apresentaram ganho médio de  $42,2\pm 5,4$  kg durante o período experimental. A manutenção de animais em condições de subalimentação pode alterar o *clearance* renal de creatinina (Keenan e Allardyce, 1986), implicando redução das concentrações sanguíneas de creatinina durante o período de ganho compensatório (Hornick et al., 1998). Assim, com menor concentração plasmática seria possível obter-se excreção urinária de creatinina reduzida durante períodos de ganho compensatório.

A recuperação de cromo urinário não foi afetada pela dieta ( $P>0,95$ ), dia de coleta ( $P>0,71$ ) ou sua interação ( $P>0,41$ ; Tabela 5). Esse comportamento constitui característica positiva que habilita o uso do cromo como indicador do volume urinário. Contudo, o valor médio de recuperação obtido nesse trabalho foi de 1,37 mg/mg, o que diverge dos valores obtidos por Downes e McDonald (1964) e Bowen et al. (2009), os quais reportaram recuperações urinárias de cromo próximas a 0,9 mg/mg em ovinos e bovinos, respectivamente. Bowen et al. (2009) relataram que parte do cromo não recuperado na urina foi eliminado pelas

fezes dos animais (2-5%). Contudo, neste experimento, não se detectou presença de cromo fecal (dados não mostrados).

Estimativas de recuperação acima de 1,0 indicam que há mais cromo urinário do que infundido no sangue, o que pode parecer contraditório em primeira instância. Contudo, diversos autores relataram a possibilidade de reabsorção tubular do cromo infundido (Heath et al., 1968; Bröchner-Mortensen et al., 1969; Ditzel et al., 1972). O redirecionamento de parte do cromo infundido para a corrente sanguínea pode causar alteração do *clearance* absoluto de cromo na medida em que o processo de infusão continua a ocorrer, o que poderia causar aumento na excreção de cromo urinário. Isso seria uma provável causa para a recuperação superior a 1,0 observada neste estudo. A comprovação dessa hipótese poderia ser realizada com aferição das concentrações de cromo sanguíneas ao longo dos dias de infusão, o que, devido à não antecipação, não foi planejada e executada neste estudo.

A excreção diária de creatinina e a recuperação de cromo constituem os valores base para a estimação do volume urinário a partir de amostragem pontual da urina (Equações 1 e 2). Avaliação das variabilidades de ambas as características apontou precisão similar para ambos os indicadores, uma vez que produziram padrão similar de variação residual (Figura 1b). Contudo, em termos de variabilidade entre animais, verificou-se menor sensibilidade para o cromo em relação à creatinina. As correlações intraclasse para ambos indicadores foram fracas e próximas de zero, o que condiz com o fato de tanto a quantidade de cromo infundida, como a quantidade de creatinina produzida no tecido muscular, serem consideradas constantes.

A avaliação das amostras *spot* evidenciou não haver influência de dieta ( $P > 0,46$ ) ou interação entre dieta e horário de coleta ( $P > 0,07$ ) sobre a concentração urinária de ambos indicadores (Tabela 6). Contudo, para ambos foi verificada diferença quanto ao momento de amostragem ( $P < 0,01$ ). Devido à alta correlação entre os indicadores (Tabela 4), as menores ( $P < 0,05$ ; Tabela 6) concentrações urinárias foram verificadas às 6h00 para ambos.

A variação diária na concentração urinária de creatinina foi verificada por diversos autores (De Groot e Aafjes, 1960; Kertz et al., 1970; George et al., 2006; Lee et al., 2019). A principal causa para essa flutuação parece estar relacionada com flutuações no volume urinário liberado ao longo do dia, o qual exerce diferenças no padrão de diluição da creatinina e também no cromo. Destaca-se que nenhuma variação foi detectada na concentração sanguínea de cromo ( $P > 0,32$ ) ao longo do dia. Isso indica que a quantidade de cromo circulante para filtração renal foi estável ao longo de um dia (Tabela 7), o que poderia ser também o comportamento da creatinina. Assim, parece pouco provável que flutuações na concentração urinária advenham de flutuações sanguíneas dos indicadores. Shingfield e Offer (1998) e Misselbrook et al. (2016) verificaram maior volume urinário nas primeiras micções da manhã, o que pode estar relacionado a um maior consumo de água durante a madrugada (Shingfield e Offer, 1998) ou à retenção de urina nesse período devido ao descanso dos animais. Considerando uma produção constante de creatinina ao longo do dia (De Groot e Aafjes, 1960) e a infusão constante de cromo, seria provável a maior diluição dos indicadores no período da manhã (Tabela 6).

A despeito da variação na concentração de creatinina, a relação entre derivados de purina e creatinina tende a ser constante ao longo do dia (Silva Jr. et al., 2018), o que não comprometeria a estimativa da produção microbiana. Contudo, estimativas do volume urinário poderiam ser comprometidas devido à flutuação na concentração dos indicadores (Tabela 6), o que dificulta o estabelecimento de um protocolo adequado de amostragem *spot* (Lee et al., 2019). O número de pontos de amostragem nesse trabalho não deve ser considerado suficiente para o estudo adequado de protocolos de amostragem. Dessa forma, para verificação da exatidão e precisão das estimativas de volume urinário empregou-se a média de concentração urinária de todas as amostras *spot* obtidas. Para esse procedimento, utilizou-se os valores médios de excreção de creatinina e de recuperação de cromo urinário obtidos por intermédio das coletas totais de urina.

Tanto a creatinina como o cromo produziram estimativas acuradas do volume urinário ( $P > 0,33$ ; Tabela 8; Figura 2). Contudo, maior proximidade numérica de 0 e 1 para o intercepto e inclinação da função ajustada foi verificada para a creatinina. Esse comportamento refletiu em menor erro médio de predição e QMEP para esse indicador (Tabela 8). A decomposição do QMEP indicou menores vícios e, conseqüentemente, maior exatidão para a utilização da creatinina como indicador do volume urinário. A menor exatidão constitui a maior limitação do cromo, cujos vícios médio e sistemático perfizeram 53,3 e 14,9% do QMEP. Uma limitação inerente à creatinina comparada ao cromo foi sua menor precisão, uma vez que seus erros aleatórios, em termos absolutos, foram, aproximadamente, 58% daqueles observados com a creatinina. Há duas possíveis causas para esse comportamento. Primeiro, como destacado anteriormente, a dosagem de cromo foi fixa, uma vez que constitui indicador externo, ao passo que não há controle experimental sobre a produção de creatinina. Segundo, como relatado por outros autores, há variação na produção de creatinina por unidade de peso corporal entre os animais (Shingfield e Offer, 2008; Lee et al., 2019). Diferenças na composição corporal entre animais podem ser responsáveis por essa maior variação aleatória, uma vez que a produção de creatinina é proporcional não ao peso em si, mas sim à massa muscular (Costa e Silva et al., 2014).

A proposição de substitutos para o cromo como indicador em estudos de digestão tem sido sugerida devido a prováveis efeitos tóxicos e/ou carcinogênicos (Myers et al., 2004). Embora o cromo usado como indicador neste estudo esteja em sua valência +3, considerada de baixa toxicidade (NRC, 1997), procedeu-se à avaliação de possíveis efeitos tóxicos do mesmo. Um excesso de cromo em suas formas mais tóxicas (+5 ou +6) pode levar à redução do consumo de oxigênio mitocondrial causado pela inibição da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, a qual supre a cadeia respiratória com NADH (Ryberg e Alexander, 1990). Contudo, a avaliação hepática dessa enzima não evidenciou variação ( $P > 0,76$ ) da atividade ao longo do experimento

(Figura 3). Esse comportamento concorda com as descrições de Stacy e Thorburn (1966), os quais não relataram alterações hepáticas ou renais por intermédio da injeção endovenosa do complexo Cr-EDTA em ratos.

## **CONCLUSÃO**

Tanto a creatinina como o complexo cromo-EDTA produzem estimativas de volume urinário similares ao obtido com a coleta total de urina em bovinos. Contudo, a despeito da maior precisão das estimativas obtidas com o cromo, os valores obtidos com a creatinina exibem menores vícios e são, portanto, mais exatos. A partir dessa assertiva, considerando-se o custo e as dificuldades de manejo na utilização do cromo-EDTA, a creatinina mostra-se indicador mais viável para estimação do volume urinário em bovinos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIN, R.C.; CLANTON, C. Factors contributing to the variation in urinary creatinine and creatinine-nitrogen ratios in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.25, p.107-112, 1966.

BARBOSA, A.M.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; VÉRAS, R.M.L.; LEÃO, M.I.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MARCONDES M.I.; SOUZA, M.A. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes proteicas sobre a excreção de creatinina, de ureia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.870-877, 2006.

BARBOSA, M.M.; DETMANN, E.; ROCHA, G.C.; FRANCO, M.O.; VALADARES FILHO, S.C. Evaluation of laboratory procedures to quantify the neutral detergent fiber content in forage, concentrate, and ruminant feces. **Journal of AOAC International**, v.98, p.883-889, 2015.

BIBBY, J.; TOUTENBURG, H. **Prediction and improved estimation in linear models**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 188p.

BINNERTS, W.T.; VANT KLOOSTER, A.T.; FRENS A.M. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. **Veterinary Record**, v.82, p.470, 1968.

BOWEN, M.K.; POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Recovery of intravenously infused chromium EDTA and lithium sulphate in the urine of cattle and their use as markers to measure urine volume. **Animal**, v.3, p.548-556, 2009.

BRÖCHNER-MORTENSEN, J.; GIESE, J.; ROSSING, N. Renal inulin clearance versus total plasma clearance of <sup>51</sup>Cr-EDTA. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 23, p.301-305, 1969.

BRODERICK, G.A.; REYNAL, S.M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows<sup>1</sup>. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2822-2834, 2009.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives-an overview of the technical details**. Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992. 21p.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; CAMPOS, J.M.S.; MARCONDES, M.I.; FONSECA, M.A. Consumo, digestibilidade e excreção de ureia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1813-1821, 2006.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; TEDESCHI, L.O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v.113, p.218-225, 2008.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental Designs**. 2 ed. Bombay: Asia Publishing House, 1957. 611p.

COSTA E SILVA, L.F.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, M.L.; ROTTA, P.P.; PRADOS, L.F.; VALADARES, R.F.D.; ZANETTI, D.; BRAGA, J.M.S. Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.807-810, 2012.

COSTA E SILVA, L.F.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, M.L.; ROTTA, P.P.; ZANETTI, D.; VALADARES, R.D.F.; DETMANN, E. Models to predict muscle tissue and crude protein in beef cattle. **Livestock Science**, v.160, p.186-193, 2014.

DE GROOT, T.; AAFJES, J.H. On the constancy of creatinine excretion in the urine of the dairy cow. **British Veterinary Journal**, v.116, p.409-418, 1960.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.

DITZEL, J.; VESTERGAARD, P.; BRINKLØV, M. Glomerular filtration rate determined by <sup>51</sup>Cr-EDTA-complex: a practical method based upon the plasma disappearance curve determined from four plasma samples. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v.6, p.166-170, 1972.

DOWNES, A.M.; McDONALD, I.W. The chromium-51 complex of ethylenediamine tetraacetic acid as a soluble rumen marker. **British Journal of Nutrition**, v.18, p.153-162, 1964.

FOGH-ANDERSEN, N. Binding of the chromium-ethylenediaminetetraacetic acid complex (Cr-EDTA) to human albumin. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.40, p.805-808, 1980.

GEORGE, S.K.; DIPU, M.T.; MEHRA, U.R.; VERMA, A.K.; SINGH, P. Influence of level of feed intake on concentration of purine derivatives in urinary spot samples and microbial

nitrogen supply in crossbred bulls. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.19, p.1291-1297, 2006.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica metabólica e nutricional. In: González, F.H.D., Campos, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p.73-89.

HEATH, D.; KNAPP, M.; WALKER, W.C. Comparison between inulin and <sup>51</sup>Cr-labelled edetic acid for the measurement of glomerular filtration-rate. **The Lancet**, v.292, p.1110-1112, 1968.

HENNESSY, D.W.; NOLAN, J.V. Nitrogen kinetics in cattle fed a mature subtropical grass hay with and without protein meal supplementation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.1135-1150, 1988.

HERDT, T.H. **Liver biopsy procedure in cattle**. Lansing: Diagnostic Center for Population e Animal Health, 2013. 3p.

HORNICK, J.L.; Van EENAEME, C.; DIEZ, M.; MINET, V.; ISTASSE, L. Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian Blue bulls: II. Plasma metabolites and hormones. **Journal of Animal Science**, v.76, p.260-271, 1998.

KAPS, M.; LAMBERSON, W. **Biostatistics for Animal Science**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2004. 445p.

KEENAN, D.M.; ALLARDYCE, C.J. Changes in plasma creatinine levels of sheep during submaintenance feeding. **Australian Veterinary Journal**, v.63, p.29-30, 1986.

KERTZ, A.F.; PREWITT, L.R.; LANE, A.G.; CAMPBELL, J.R. Effect of dietary protein intake on creatinine excretion and the creatinine-nitrogen ratio in bovine urine. **Journal of Animal Science**, v.30, p.278-282, 1970.

LEE, C.; MORRIS, D.L.; DIETER, P.A. Validating and optimizing spot sampling of urine to estimate urine output with creatinine as a marker in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.236-245, 2019.

MACHADO, M.G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C.; BENTO, C.B.; MARCONDES, M.I.; ASSUNÇÃO, A.S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.222, p.132-148, 2016.

MENEZES, A.C.B.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, L.C.; PACHECO, M.V.C.; PEREIRA, J.M.V.; ROTTA, P.P.; ZANETTI D.; DETMANN, E.; SILVA, F.A.S.; GODOI, L.A.; RENNÓ, L.N. Does a reduction in dietary crude protein content affect performance, nutrient requirements, nitrogen losses, and methane emissions in finishing Nelore bulls? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.223, p.239-249, 2016.

MISSELBROOK, T.; FLEMING, H.; CAMP, V.; UMSTATTER, C.; DUTHIE, C.A.; NICOLL, L.; WATERHOUSE, T. Automated monitoring of urination events from grazing cattle. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.230, p.191-198, 2016.

MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V.; HESS, B.W. A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. **Journal of Animal Science**, v.82, p.179-183, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **The role of chromium in animal nutrition.**

Washington, DC: National Academies Press, 1997. 80p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: principles of biochemistry.** 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152p.

RENNÓ, L.N.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; LEÃO, M.I.; VALADARES, R.F.D.; RENNO, F.P.; PAIXÃO, M.L. Níveis de ureia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: parâmetros ruminais, ureia plasmática e excreções de ureia e creatinina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.556-562, 2008.

ROCHA, G.C.; PALMA, M.N.N.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Evaluation of acid digestion techniques to estimate chromium contents in cattle feces. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, p.92-95, 2015.

RYBERG, D.; ALEXANDER, J. Mechanisms of chromium toxicity in mitochondria. **Chemico-Biological Interactions**, v.75, p.141-151, 1990.

SHINGFIELD, K.J.; OFFER, N.W. Evaluation of the spot urine sampling technique to assess urinary purine derivative excretion in lactating dairy cows. **Animal Science**, v.66, p.557-568, 1998.

SILVA JR., J.M.; RENNO, L.N.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; MENEZES, G.C.C.; MARTINS, T.S.; PAULA, R.M.; RODRIGUES, J.P.P.; MARCONDES, M.I. Evaluation of collection days and times to estimate urinary excretion of purine derivatives and nitrogen compounds in grazing Nelore cattle. **Livestock Science**, v.217, p.85-91, 2018.

STACY, B.D.; THORBURN, G.D. Chromium-51 ethylenediaminetetraacetate for estimation of glomerular filtration rate. **Science**, v.152, p.1076-1077, 1966.

TEBBE, A.W.; WEISS, W.P. Evaluation of creatinine as a urine marker and factors affecting urinary excretion of magnesium by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.5020-5032, 2018.

VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C.; CLAYTON, M.K. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2686-2696, 1999.

Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

Tabela 1 - Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) na silagem de milho e nos concentrados

Item	Silagem de milho	Concentrado 90:10	Concentrado 50:50
MS <sup>1</sup>	271,5	874,8	874,0
MO <sup>2</sup>	928,3	976,4	956,1
PB <sup>2</sup>	84,3	265,4	157,4
FDNcp <sup>2</sup>	486,0	107,8	109,5

<sup>1</sup> g/kg de matéria natural. <sup>2</sup> g/kg de matéria seca.

Tabela 2 - Consumo voluntário e digestibilidade total em novilhas Nelore alimentadas com dietas com diferentes relações volumoso concentrado

Item <sup>2</sup>	Dieta <sup>1</sup>		EPM	Valor-P
	90:10	50:50		
Consumo voluntário (kg/dia)				
MS	6,25	7,58	0,369	0,003
MO	5,85	7,19	0,334	0,001
PB	0,63	0,94	0,038	<0,001
FDNcp	2,86	2,03	0,251	<0,001
MOD	4,43	5,74	0,312	0,002
Digestibilidade total (g/g)				
MO	0,758	0,794	0,013	0,061
PB	0,644	0,706	0,026	0,027
FDNcp	0,678	0,578	0,025	0,019

<sup>1</sup> 90:10 e 50:50, relação volumoso:concentrado com base na matéria seca da dieta. <sup>2</sup> MS, matéria seca; MO, matéria orgânica; PB, proteína bruta; FDNcp, fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; MOD, MO digerida.

Tabela 3 - Volume urinário e concentrações urinárias de creatinina e cromo em novilhas Nelore alimentadas com dietas com diferentes relações volumoso concentrado em função dos dias de coleta

Dieta	Dias de coleta	Variável		
		Volume urinário (L/d)	Concentração de creatinina (mg/dL)	Concentração de cromo (mg/L)
	1º	6,18	134,6	72,2
90:10	2º	6,53	136,0	63,6
	3º	7,02	130,4	63,9
	1º	6,43	136,8	62,5
50:50	2º	7,13	128,9	60,9
	3º	7,23	121,8	54,6
	EPM	1,14	26,03	11,00
Média Geral		6,75	131,4	62,9
Valor P				
Dieta (D)		0,574	0,742	0,317
Dia (Di)		0,146	0,535	0,086
D × Di		0,873	0,796	0,553

Tabela 4 - Correlações de Pearson entre o volume urinário e concentrações urinárias de creatinina e de cromo em novilhas Nelore alimentadas com dietas com diferentes relações volumoso concentrado

Variável	Variável <sup>1</sup>	
	Concentração de creatinina	Concentração de cromo
Correlações de Pearson		
Volume urinário	-0,726	-0,808
Concentração de creatinina	---	0,747
Correlações de Pearson Parciais <sup>2</sup>		
Volume urinário	-0,649	-0,592
Concentração de creatinina	---	0,782

<sup>1</sup> Todos os valores de correlação são diferentes de zero ( $P < 0,001$ ). <sup>2</sup> Correlações ajustadas para os efeitos de tratamento, animal, período e dia de coleta.

Tabela 5 – Excreção de creatinina e recuperação urinária de cromo em novilhas Nelore alimentadas com dietas com diferentes relações volumoso concentrado em função dos dias de coleta

Dieta	Dias de coleta	Variável	
		Excreção de creatinina	Recuperação de cromo
		(mg/kg PV)	(mg/mg)
90:10	1º	16,58	1,40
	2º	17,25	1,28
	3º	18,71	1,42
50:50	1º	19,24	1,38
	2º	19,17	1,39
	3º	19,21	1,33
EPM		1,724	0,082
Média Geral		18,36	1,37
Valor P			
Dieta (D)		0,072	0,958
Dia (Di)		0,644	0,711
D × Di		0,639	0,415

Tabela 6 - Concentrações urinárias de creatinina e de cromo em novilhas Nelore alimentadas com dietas com diferentes relações volumoso concentrado em função dos horários de coleta de urina (amostras *spot*)

Horário de coleta	Concentrações <sup>1</sup>	
	Creatinina (mg/dL)	Cromo (mg/L)
6h00	88,7c	36,1c
12h00	122,3b	53,9b
18h00	144,8ab	50,3bc
24h00	160,1a	72,3a
EPM	14,41	7,59
Média Geral	129,0	53,2
Valor P		
Dieta (D)	0,466	0,733
Horário (H)	<0,001	<0,001
D × H	0,591	0,072

<sup>1</sup> Médias na coluna, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste DMS de Fisher (P<0,05).

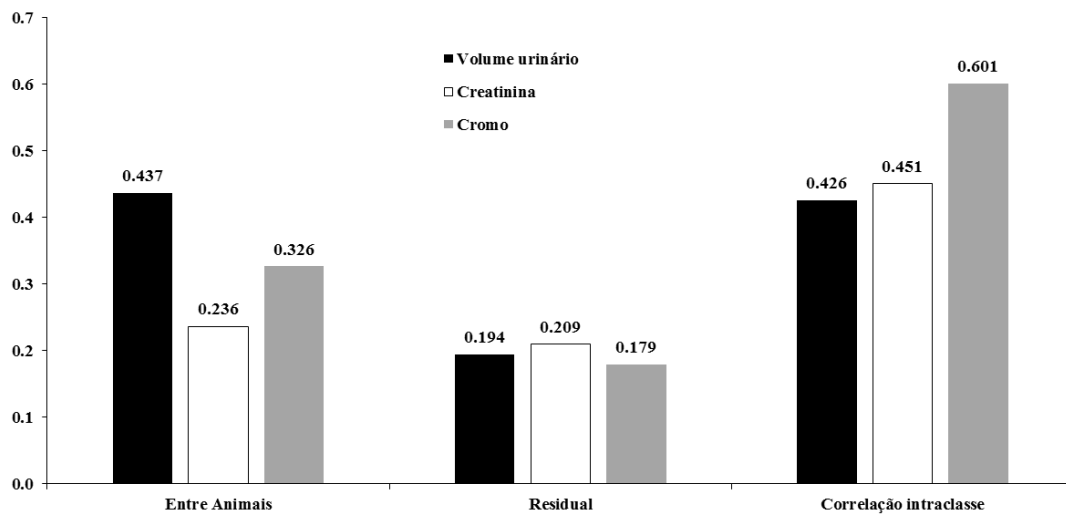
Tabela 7 - Concentrações de cromo no plasma e soro de novilhas Nelore alimentadas com dietas com diferentes relações volumoso concentrado em função dos horários de coleta de sangue

Horário de coleta	Concentrações	
	Plasma (mg/L)	Soro (mg/L)
6h00	0,47	0,90
12h00	0,46	0,84
18h00	0,41	0,68
24h00	0,47	0,74
Média	0,45	0,80
EPM	0,29	0,15
Valor P		
Dieta (D)	0,326	0,522
Horário (H)	0,990	0,704
D × H	0,484	0,336

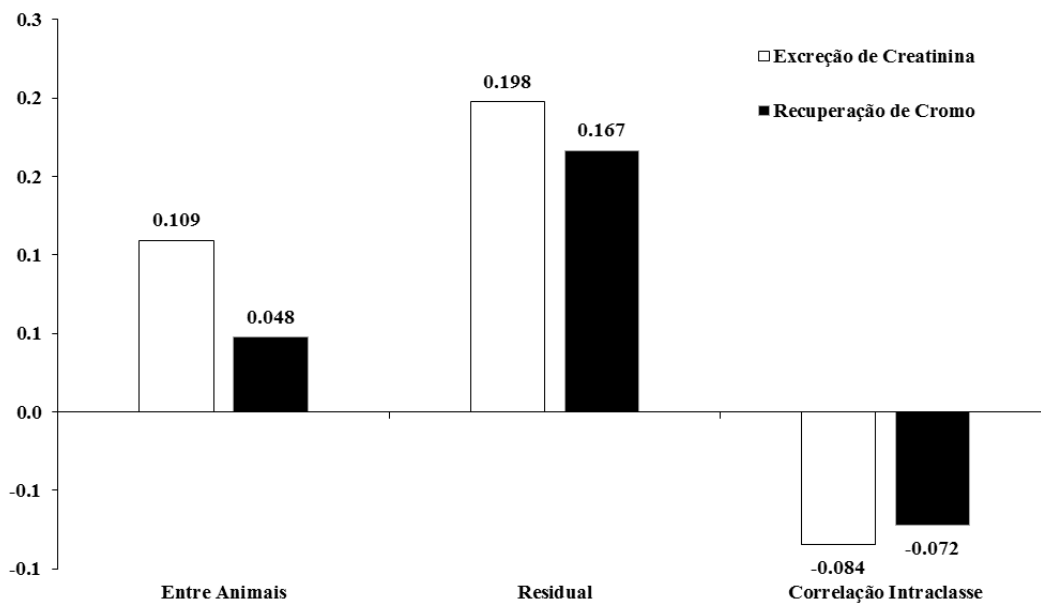
Tabela 8 - Estatísticas de avaliação dos valores estimados de volume urinário (L/d) a partir de amostras *spot* em novilhas Nelore alimentadas com dietas com diferentes relações volumoso concentrado em função dos indicadores creatinina e cromo

Estatística	Indicador	
	Creatinina	Cromo
Média	6,34	7,44
Intercepto	0,190±1,348	0,561±1,446
Valor P ( $\beta_0 = 0$ )	0,911	0,764
Inclinação	1,035±0,192	0,833±0,162
Valor P ( $\beta_1 = 1$ )	0,860	0,333
$r^2$	0,903	0,920
Erro médio de predição	-0,41	0,68
QMEP <sup>1</sup>	0,648	0,873
Viés médio	0,169 (26,0%)	0,466 (53,3%)
Viés sistemático	0,005 (0,8%)	0,130 (14,9%)
Erros aleatórios	0,474 (73,2%)	0,278 (31,8%)

<sup>1</sup> QMEP, quadrado médio do erro de predição.

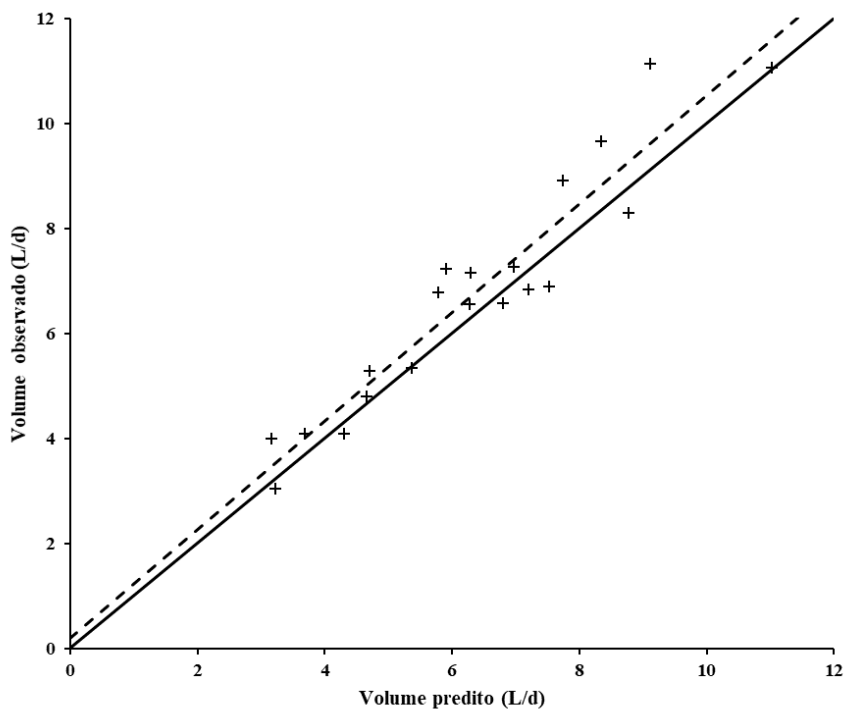


(a)

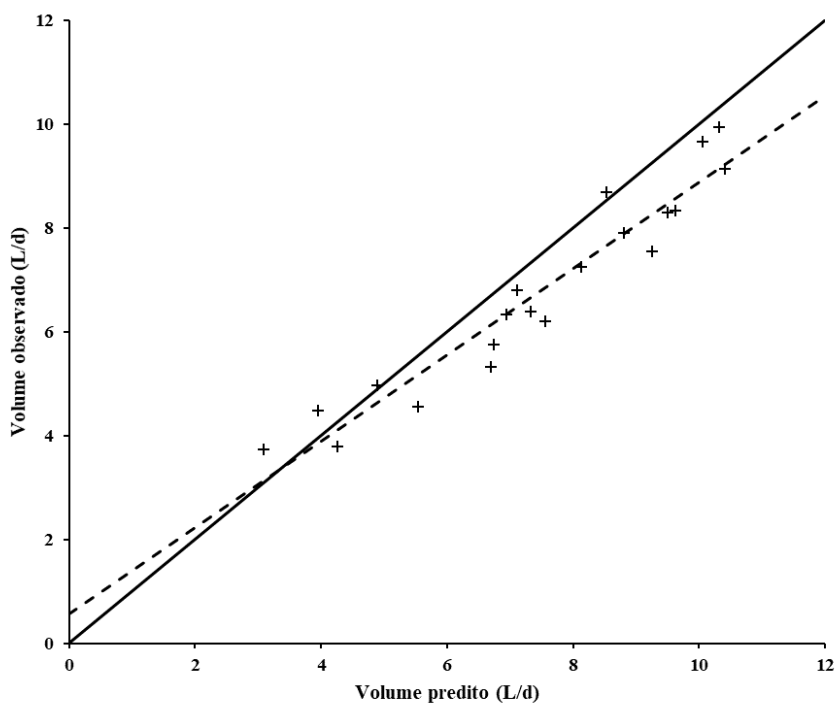


(b)

Figura 1 – Desvios-padrão padronizados residual e entre animais e correlação intraclasse (correlação entre medidas tomadas nos diferentes dias de coleta) para: a – excreção urinárias e concentrações urinárias de creatinina e de cromo; e b – excreção urinária de creatinina e recuperação urinária de cromo.



(a)



(b)

Figura 2 - Relação entre valores de volume urinário (L/d) observados e preditos por intermédio dos indicadores creatinina (a) e cromo (b) em novilhas Nelore [a linha contínua representa a relação de igualdade ( $Y = X$ ); a linha tracejada representa a relação de mínimos quadrados; os dados foram ajustados para os efeitos aleatórios de animal e período experimental; para detalhes sobre as equações, favor consultar a Tabela 8].

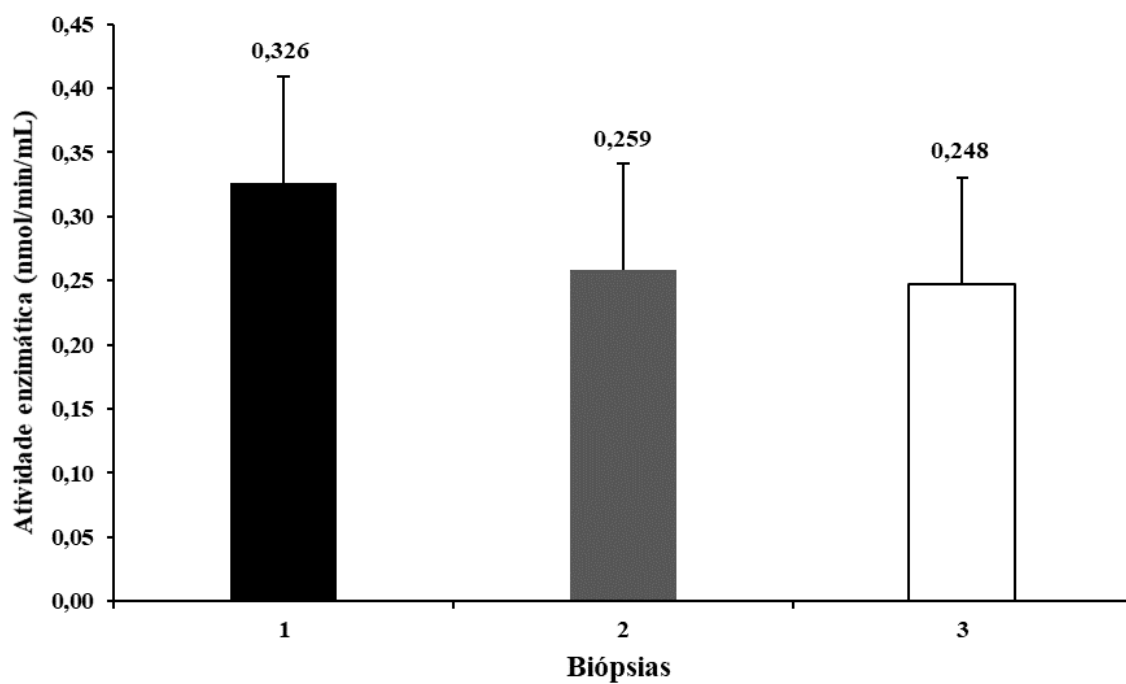


Figura 3 - Atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase no fígado de novilhas Nelore em diferentes biópsias realizadas ao longo do experimento (1, início do experimento; 2, final do primeiro período experimental; 3, final do segundo período experimental;  $P = 0,767$ ).