

JARBAS MIGUEL DA SILVA JÚNIOR

**EXCREÇÃO URINÁRIA DE DERIVADOS DE PURINAS E DE COMPOSTOS
NITROGENADOS EM NOVILHAS NELORE EM PASTEJO E
RECUPERAÇÃO DA CREATININA NA URINA DE BOVINOS EM FUNÇÃO
DO ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

S586e
2018

Silva Júnior, Jarbas Miguel de, 1987-

Excreção urinária de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas Nelore em pastejo e recuperação da creatinina na urina de bovinos em função do armazenamento da amostra / Jarbas Miguel de Silva Júnior. – Viçosa, MG, 2018. xiii, 56 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luciana Navajas Rennó.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Nelore (Bovino). 2. Creatina - Conservação.
3. Nitrogênio. 4. Urina - Análise. 5. Creatina -Excreção.
6. Purinas. I. Universidade Federal de Viçosa. Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

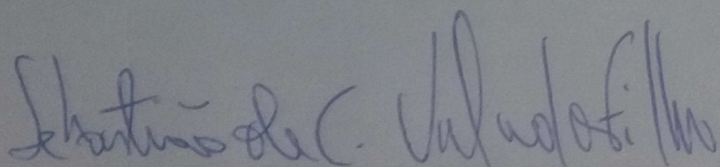
CDD 22. ed. 636.213

JARBAS MIGUEL DA SILVA JÚNIOR

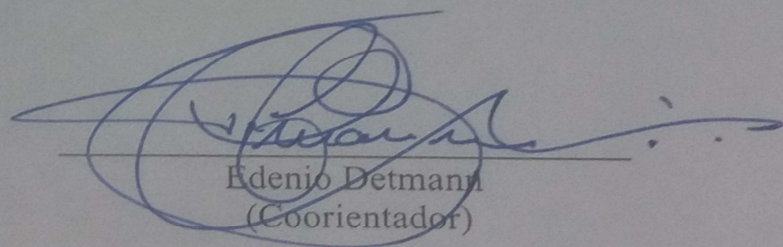
**EXCREÇÃO URINÁRIA DE DERIVADOS DE PURINAS E DE COMPOSTOS
NITROGENADOS EM NOVILHAS NELORE EM PASTEJO E
RECUPERAÇÃO DA CREATININA NA URINA DE BOVINOS EM FUNÇÃO
DO ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA**

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

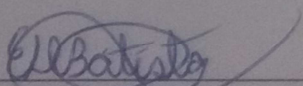
APROVADA: 18 de junho de 2018.



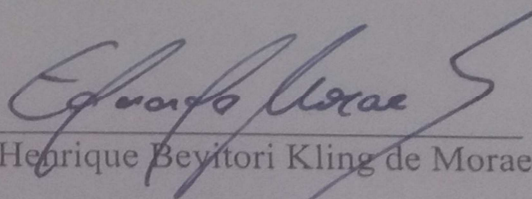
Sebastião de Campos Valadares Filho
(Coorientador)



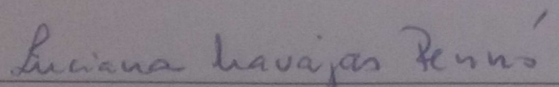
Edenio Detmann
(Coorientador)



Erick Darlisson Batista



Eduardo Henrique Beyitori Kling de Moraes



Luciana Navajas Rennó
(Orientadora)

Dedicatória

Dedico a minha família e amigos pelo apoio incondicional, permitindo assim que esse trajeto fosse possível e agradável de ser feito.

Cada experiência é uma situação onde o fim é desconhecido, indeterminado, algo que pode falhar. A indeterminação é parte da emoção.

Filme: O experimento de Milgram (2015)

Viver em paz não é viver sem problema, sem encrenca, sem dificuldade. Viver em paz é viver com a certeza de que não está vivendo de forma morna!

Mario Sergio Cortella

Agradecimentos

À Deus, o cara sabe o que faz, a gente que não entende. Valeu cara.

A mim mesmo pela dedicação, coragem, força, paciência, não foi um caminho fácil, mas valeu a pena.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa por tornar possível a realização deste curso/sonho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, INCT-Ciência Animal e FAPEMIG pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A minhas novilhas dos Jogos Mortais o Retorno das Drags: Alaska Thunderfuck, Nina Flowers, Detox, Bianca Del Rio e Adore Delano.

À Professora Luciana Rennó, por todo o seu cuidado, carinho, atenção, paciência (muita paciência), ensinamentos e orientação durante esse percurso que se iniciou no Mestrado e agora desemboca no Doutorado, sei que não fui um aluno fácil, mas é o que tem pra hoje.

Ao Professor Sebastião Valadares pelo comprometimento com a minha formação como coorientador.

Aos Professores Edenio, Mario Paulino, João Paulo (Pós Doc/Professor UNIFESPA), Erick e Eduardo pela ajuda na construção dessa Tese.

Aos colegas de Pós, Sidnei (Magal), Jessiquinha, João Paulo, Aline (Alinão), Felipe (Peão), Victor, Leandro, Cris, Larissa, Camila, Bruno (Bruninho), Matheus (Brother), entre tantos outros.

Aos amigos que a Pós me deu, Diego (gnomo de jardim), Laura, Lays, Paloma, Marcelo Grossi, Vanessa (Sara), Mariele (Marizão), Fabiana Lana, Stefanie (Luxus), Claudia Sampaio.

Aos funcionários do DZO, especialmente a Fernanda, Tijojo, Plinio, Mario, Natanael (Pum).

A meus pais, Terezinha e Jarbas, meu porto seguro, meu exemplo de pessoas batalhadoras, guerreiras, fonte de amor... enfim, muito obrigado.

A meus irmãos, Ailton, Adriano, Antônio, Adeilton e principalmente Adriana.

As minhas sobrinhas, Lorena, Jarbinhas, Ana Laura, Isadora, Anntony, Elisa e Alana, vocês não têm ideia do o quanto alegram meus dias.

Aos meus amigos que Viçosa trouxe, especialmente a Daniel Gualhano, Matheus Braga, Beatriz, Fernanda Hertel, Juliana (carioca), Tom.

Os meus grandes amigos que esse Doutorado me agraciou, Maristela (Maritche), Pollyanna (Polly), Carlos (Cabeção/Brocador), Gabriel (Miga).

As amigas de Garanhuns, Kessia e Amanda, sei o quão chato ficou nossa depressão coletiva com a distância, mas vocês foram fundamentais nesse processo.

Ao grupo de amigos que surgiu na Graduação, Geison, Xarlina (Charllynny) e Heraldo.

Ao grupo de amigos FM no zap, Gercino (Sandy), Mauricio (MauMau), Victor (Vita), João (Jão), valeu caras, valeu mesmo.

À família Capivara: Debora (ex-esposa), filhxs (Carla e Wando), netxs (Winder e Andreia), vocês foram demais.

A academia Mais Fit, nunca pensei em dizer isso, mas puxar ferro e fazer atividade física faz um bem danado. Recomendo.

Enfim, de A à Z, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse projeto.

Biografia

JARBAS MIGUEL DA SILVA JÚNIOR, filho de Terezinha Pereira Reges da Silva e Jarbas Miguel da Silva, nasceu em Garanhuns/PE em 22 de dezembro de 1987.

Em 2006 ingressou no curso de Bacharelado em Zootecnia da Unidade Acadêmica de Garanhuns da UFRPE, entre 2009 e 2010 realizou mobilidade acadêmica com a Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso em novembro de 2012.

Em novembro de 2012 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia da UFV, concentrando seus estudos na área de Produção e Nutrição de Ruminantes, tendo defendido Dissertação em julho de 2014.

Em agosto de 2014 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia da UFV, concentrando seus estudos na área de Produção e Nutrição de Ruminantes, tendo defendido Tese em junho de 2018.

Sumário

Resumo	vii
Abstract.....	xi
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	10
Capítulo 1: Pode uma única amostra <i>spot</i> de urina obtida no pasto ser usada para estimar a excreção de derivados de purinas e compostos nitrogenados?.....	16
Resumo	16
Introdução.....	17
Material e métodos	18
Animais, tratamentos e desenho experimental.....	18
Coletas de amostras	19
Análises laboratoriais	21
Cálculos.....	22
Análise estatística	23
Resultado e discussão	24
Conclusão	41
Referências bibliográficas	42
Capítulo 2: Recuperação de creatinina na urina de bovinos em função do tempo e da temperatura de armazenamento	47
Resumo	47
Introdução.....	48
Material e métodos	49
Resultados e discussão	50
Conclusão	54
Referências bibliográficas	55

Resumo

SILVA JÚNIOR, Jarbas Miguel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2018. **Excreção urinária de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas Nelore em pastejo e recuperação da creatinina na urina de bovinos em função do armazenamento da amostra.** Orientadora: Luciana Navajas Rennó. Coorientadores: Sebastião de Campos Valadares Filho e Edenio Detmann.

O presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de avaliar a excreção de creatinina para validação da coleta *spot* de urina, bem como as excreções de derivados de purinas (DP) e compostos nitrogenados (CN) e suas relações com a creatinina em novilhas Nelore suplementadas a pasto (Capítulo 1); objetivou-se também avaliar a recuperação da creatinina em função do tempo e de diferentes temperaturas de armazenamento (Capítulo 2). O experimento referente ao Capítulo 1, foi conduzido no setor de gado de corte da Universidade Federal de Viçosa/MG, utilizando-se cinco novilhas Nelore com peso corporal (PC) médio de 400 ± 15 kg, distribuídas em quadrado latino 5x5. Os cinco tratamentos experimentais se basearam na suplementação proteico-energética (concentrado com 22% de proteína bruta na matéria seca (MS), fornecido às 12h), baseada no PC (0, 3, 6, 9 e 12 g/kg PC (PC0, PC3, PC6, PC9 e PC12, respectivamente)). Os animais receberam sal mineral *ad libitum*. Cada período experimental teve duração de 16 dias, sendo 12 de adaptação à dieta e quatro de coleta. A coleta total de urina e amostral de fezes, foi realizada em três dias, nos horários das 0h00-4h00, 4h00-8h00, 8h00-12h00, 12h00-16h00, 16h00-20h00 e 20h00-24h00. A coleta de *spot* de urina, foi realizada a cada 4 horas, assim como as coletas de líquido ruminal e sangue nos horários das 0, 4, 8, 12, 16, 20 horas. Para a coleta total de urina, utilizou-se sonda de Folley nº26, acoplada a mangueira de polietileno que conduziu a urina até uma bolsa coletora de urina por sistema fechado, que foi esvaziada a cada quatro horas. A amostragem da urina coletada foi realizada a cada 4 horas, nos mesmos horários descritos para a coleta de sangue, medindo-se o volume e retirando-se duas amostras, uma diluída com solução H₂SO₄ 0,036N e outra não diluída. Para determinação da excreção fecal, utilizou-se o dióxido de titânio, fornecido na quantidade total diária de 15g, entre os dias 8º e 16º de cada período. Para estimativa do consumo de pasto, utilizou-se a fibra indigestível em detergente neutro (FDNi) como indicador interno. Realizou-se coleta de pasto pela técnica do quadrado para determinação da MS potencialmente digestível (MSpd) no terceiro dia de cada período experimental. Nos dias 13º e 16º de cada período, realizou-se simulação de pastejo para estimar a composição do pasto ingerido. Nas amostras de urina foram determinadas as

concentrações de creatinina, nitrogênio total urinário (NU), ureia (NUreia), ácido úrico (AU) e alantoína (AL). Para análise estatística utilizou-se o programa estatístico Proc Mixed do SAS 9.4. A avaliação da adequação da melhor forma de coleta de urina foi realizada utilizando a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição (QMEP) entre as amostras de urina obtidas por meio da coleta *spot*. O experimento, referente ao Capítulo 2, foi realizado no Departamento de Zootecnia da UFV. Foram utilizadas urina de vinte e cinco animais, dez provenientes da raça Nelore e quinze da raça Holandesa. As urinas (10 de Nelore e 10 de Holandês) foram diluídas em solução de H₂SO₄ 0,036N, fracionadas e conservadas em temperatura ambiente, resfriadas (4°C) e congeladas (-20°C e a -40°C), analisadas em diferentes dias após a coleta (1, 3, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 dias). Imediatamente após a coleta, a urina foi diluída e seu pH corrigido para valor inferior a 3, e a urina foi analisada, dando origem ao valor de creatinina, resultado utilizado como valor de referência da concentração de creatinina na amostra. Este valor referência, foi utilizado como divisor dos valores de creatinina obtidos nos dias da análise, por amostra, obtendo-se o valor de creatinina relativa, o que permite a observação do aumento ou diminuição da concentração de creatinina ao longo do tempo. Para avaliar a conversão de creatina em creatinina na urina de bovinos, utilizou-se urina proveniente de cinco bovinos da raça Holandesa. Estas urinas também foram diluídas e tiveram seu pH corrigido para valor inferior a 3. Para avaliar o efeito da adição de creatina na urina, adicionou-se solução de creatina (concentrações de 20, 40 e 60 mg/dL) nos eppendorf contendo urina diluída. Estas urinas foram analisadas em diferentes dias após a coleta (1, 3, 7, 15, 30 e 45 dias), sendo armazenadas nas mesmas temperaturas descritas anteriormente. No capítulo 1 observou-se efeito linear positivo (P=0,001) sobre o consumo de MS total devido ao aumento nas quantidades de suplemento fornecido aos animais, porém observou-se efeito quadrático (P=0,018) sobre a ingestão de MS proveniente do pasto. A ingestão de N diferiu entre os tratamentos (P<0,05), causado pelo aumento na ingestão de suplemento, o que possibilitou aumento (P=0,001) na ingestão de CN. O fornecimento de suplementação possibilitou efeito sobre a concentração de N amoniacal ruminal (P<0,05). A concentração de N uréico no soro (NUS) foi afetada (P<0,05) pelo fornecimento de concentrado no período de 24 horas, porém o tratamento PC0 não apresentou variação na concentração de NUS (P>0,05), em função da ausência de suplementação. A excreção de creatinina diária foi de 23,01 ± 0,19 (22,82 – 23,2) mg/kgPC. As excreções de AL, AU e DP, em mmol, foram influenciadas linearmente pelos tratamentos (P=0,002; P=0,004; P=0,003, respectivamente). A síntese de nitrogênio

microbiano (NM) foi influenciada, assim como as excreções de DP, linearmente ($P=0,001$) pelos tratamentos. As relações entre AL, AU e DP com a creatinina, não foram influenciadas pelos dias de coleta, períodos de coleta, tratamentos e suas interações ($P>0,05$), apresentando média de relações de 1,36 para AL:creatinina, 0,121 para AU:creatinina e 1,48 para PD:creatinina. Além do efeito de tratamento sobre a excreção de NU e NUrea, a excreção de CN na urina foi influenciada ($P<0,05$) também pelos períodos de coleta. As relações NU:creatinina e NUreia:creatinina na urina não apresentaram efeito ($P>0,05$) de tratamento, dias e períodos de coleta. A avaliação comparativa da excreção de creatinina observada nas amostras obtidas a partir da coleta total de urina, a cada 4 horas por 3 dias, com as amostras *spot* de urina obtidas em momentos pontuais (às 12, 16, 20, 0, 4 e 8 horas), demonstrou não haver diferença ($P>0,05$) entre as duas formas de coleta estudadas. A observação das relações AL:creatinina e AU:creatinina, nos métodos de coleta avaliados neste estudo, possibilitou a observação de que não houve variação ($P>0,05$) entre as amostras obtidas na forma de coleta total ou *spot* de urina. Na análise das relações NU:creatinina e NUreia:creatinina, observou-se que os horários das amostras obtidas às 4, 8, 12, 16 e 20 horas, foram similares ($P>0,05$) independentemente do método de amostragem. Entretanto, no horário da meia noite (amostragem 20h00-24h00, coleta total/0 hora, coleta *spot* de urina), observou-se variação na excreção de NU (inclinação, $P=0,03$) e de NUreia (inclinação, $P=0,01$; e intercepto, $P=0,03$), indicando que coletas *spot* de urina realizadas neste horário, não representariam a excreção de CN ao longo do período de 24 horas. Concluiu-se que a excreção de creatinina é constante em 24h e estima adequadamente o volume urinário em bovinos mantidos em pastejo; e que uma única amostra *spot* de urina obtida no pasto, em qualquer horário do dia, pode ser usada para estimar a excreção de derivados de purinas. Para a estimativa da excreção de CN na urina são necessárias duas amostras *spot* de urina, uma quatro horas antes e outra quatro após a suplementação, em bovinos em pastejo. Os principais resultados do capítulo 2 foram que, a recuperação da creatinina foi constante ($P>0,05$) até o décimo quinto dia de armazenamento, independente da temperatura utilizada. A partir do 30º dia de armazenamento houve efeito de tempo e/ou temperatura ($P<0,05$) na recuperação de creatinina na urina de bovinos. As amostras armazenadas em temperatura ambiente e a 4°C apresentaram aumento na concentração da creatinina relativa com o passar dos dias ($P<0,05$). As amostras congeladas (-20°C e a -40°C) mantiveram a recuperação constante ($P>0,05$). A adição de creatina na urina causou aumento ($P<0,05$) nas concentrações de creatinina nas amostras armazenadas a

temperatura ambiente e em refrigeração, a partir de 30 dias de armazenamento. Nas amostras armazenadas em temperaturas de congelamento, não houve alteração na concentração de creatinina ($P>0,05$). Amostras de urina podem ser armazenadas em qualquer temperatura estudada até quinze dias após a coleta para determinação da concentração de creatinina. Amostras que necessitem tempos de armazenamentos superiores a quinze dias devem ser congeladas a -20°C ou -40°C .

Abstract

SILVA JÚNIOR, Jarbas Miguel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2018. **Urinary excretion of purine derivatives and nitrogen compounds in Nelore heifers kept on pasture and creatinine recovery in bovine urine as a function of sampling storage.** Adviser: Luciana Navajas Rennó. Co-Advisers: Sebastião de Campos Valadares Filho and Edenio Detmann.

Aimed to evaluate the creatinine excretion to validate the urine *spot* sampling technique, as well as the excretions of purine derivatives (PD) and nitrogen compounds (NC) and their relationship with creatinine in Nelore heifers supplemented on pasture (Chapter 1); Were also aimed evaluate the recovery of creatinine as a function of time and different storage temperatures (Chapter 2). The experiment related to Chapter 1 were conducted in the beef cattle department of the Federal University of Viçosa/MG, using five Nelore heifers with mean body weight (BW) of 400 ± 15 kg, distributed in 5x5 Latin square. The five experimental treatments were based on protein-energy supplementation (concentrate with 22% crude protein in dry matter (DM) bases) offered based on BW (0, 3, 6, 9 and 12 g/kg BW (BW0, BW3, BW6, BW9 and BW12, respectively)). Each experimental period had a duration of 16 days, 12d to diet adaptation and four to sampling of urine, feces, blood and ruminal fluid. The total collection of urine and *spot* of feces sample was performed in three days, from 0:00-4:00, 4:00-8:00, 8:00-12:00, 12:00-16:00, 16:00-20:00 and 20:00-24:00. Sampling *spot* of urine was performed for 24 hours, as well as the collection of ruminal fluid and blood at the times of 0, 4, 8, 12, 16, 20 hours. For total urine collection, a Folley n°26 probe was used, coupled with a polyethylene hose that carried the urine to a closed urine collection bag, which was emptied every four hours. Sampling of the urine was performed every 4 hours, at the same times as described for blood sampling, by measuring the volume and taking two samples, one diluted with 0.036N H₂SO₄ and one undiluted. To determine fecal excretion, titanium dioxide, supplied in the total daily amount of 15 g, was used between days 8th and 16th of each period. In order to estimate pasture consumption, indigestible neutral detergent fiber (iNDF) was used as the internal marker. Pasture was collected by the square technique to determine the potentially digestible DM (pdDM) on the third day of each experimental period. On the 13th and 16th days of each period, manual grazing simulation was performed to estimate the composition of the pasture. In the urine samples, the concentrations of creatinine, total urinary nitrogen (UN), urea (UreaN), uric acid (UA) and allantoin (AL) were determined. Statistical analysis was performed using SAS's 9.4

Proc Mixed statistical software. The evaluation of the adequacy of the best form of urine collection was performed using the square root of the mean square of the prediction error (MSPE) among the urine samples obtained through *spot* sampling. The experiment, referring to Chapter 2, was carried out at the Animal Science Department of the UFV. Urine of twenty-five animals, ten from the Nelore and fifteen from the Holstein, were used. Urine samples (10 from Nelore and 10 from Holstein) were diluted in 0.036N H₂SO₄, fractionated and stored at room temperature, cooled (4°C) and frozen (-20°C and -40°C), being analyzed different days after sampling (1, 3, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 days). Immediately after sampling, the urine was diluted, and its pH corrected to less than 3, and the urine was analyzed, giving a result used as a reference value of the creatinine concentration in the sample. This reference value was used as a divider of the creatinine values obtained on the days of the analysis, per sample, obtaining the relative creatinine value, which allows the observation of increase or decrease in creatinine concentration over time. To evaluate the conversion of creatine to creatinine in the urine of cattle, urine from five Holstein cows was used. These urines were also diluted and had their pH corrected below 3. To evaluate the effect of adding creatine to the urine, creatine solution (concentrations of 20, 40 and 60 mg/dL) was added to eppendorf containing diluted urine. These urines were analyzed on different days after sampling (1, 3, 7, 15, 30 and 45 days), being stored at the same temperatures described previously. In Chapter 1, a positive linear effect (P=0.001) was observed on the total DM intake due to the increase in the amount of supplementation provided to the animals. However, a quadratic effect (P=0.018) was observed on DM intake from pasture. Intake of N differed among treatments (P<0.05), caused by increased supplement intake, which allowed an increase (P=0.001) on the intake of N NC. The supply of supplementation influenced the ruminal ammoniacal N concentration (P<0.05). Serum urea N concentration (SUN) was affected (P<0.05) by the supply of concentrate in the 24-hour period, once the BW0 treatment did not show a variation in the SUN (P>0.05), as a function absence of supplementation. The creatinine excretion daily was 23.01 ± 0.19 (22.82 - 23.2) mg/kgBW. Excretions of AL, UA and PD, in mmol, were influenced by treatments (P=0.002, P=0.004, P=0.003, respectively). Microbial N synthesis (NM) was influenced, as well as the excretions of PD (P=0.001) by the treatments. The ratios between AL, UA and PD with creatinine were not influenced by collection days, collection periods, treatments and their interactions (P>0.05), with an average ratios of 1.36 for AL:creatinine, 0.121 for UA:creatinine and 1.48 for PD:creatinine. In addition to the treatment effect on UN and UreaN excretion,

urine excretion of NC was also influenced ($P < 0.05$) by collection periods. The UN:creatinine and UreaN:creatinine ratios showed no treatment effect ($P > 0.05$), days and collection periods. The comparative evaluation of creatinine excretion observed in the samples obtained from the total collection of urine, sampling every 4 hours per 3 days, with the urine *spot* samples obtained at punctual moments (at 12, 16, 20, 0, 4 and 8 hours), showed no difference ($P > 0.05$) between the two techniques of sampling. The observation of AL:creatinine and UA:creatinine of the two methods evaluated in this study allowed the observation that there was no variation ($P > 0.05$) between the samples obtained in the form of total collection or urine *spot*. The analysis of the UN:creatinine and UreaN:creatinine ratios, it was observed that the sample times obtained at 4, 8, 12, 16 and 20 hours were similar ($P > 0.05$) regardless of the sampling method. However, at midnight (sampling 20h00-24h00, total collection/0h, urine *spot* collection), there was variation in the excretion of UN (slope, $P = 0.03$) and UreaN (slope, $P = 0.01$, and intercept, $P = 0.03$), indicating that urine *spot* collections performed at this time would not represent NC excretion over the 24-hour period. Concluded that creatinine excretion is constant in 24 hours and adequately estimates the urinary volume in beef cattle kept in pasture; and that a single urine *spot* sample obtained in the pasture, at any time of the day, can be used to estimate the purine derivatives excretion. However, two urine *spot* samples, one obtained four hours before and other four hours after supplementation, are required for the estimation of excretion of CN in urine in grazing cattle. The main results of Chapter 2 were that the creatinine recovery was constant ($P > 0.05$) until the 15th day of storage, regardless of the temperature used. From the 30th day of storage there was a time and/or temperature effect ($P < 0.05$) on the recovery of creatinine in bovine urine. Samples stored at room temperature and at 4°C showed an increase in relative creatinine concentration with the passage of days ($P < 0.05$). Frozen samples (-20°C and -40°C) maintained the constant recovery ($P > 0.05$). The addition of creatine in the urine caused an increase ($P < 0.05$) on creatinine recovery in the samples stored at room temperature and in refrigeration, after 30 days of storage. In samples stored at freezing temperatures, there was no change in creatinine recovery ($P > 0.05$). Urine samples can be stored at any temperature evaluated to 15 days after collection for determination of creatinine concentration. Samples requiring storage times greater than 15 days should be frozen at -20°C or -40°C.

Introdução Geral

A maior parte do nitrogênio (N) que alcança o intestino delgado dos ruminantes é proveniente da fermentação microbiana. A microbiota presente no rúmen, ao captar o N solúvel, ou promovendo a quebra das ligações entre aminoácidos e os tornando disponíveis para utilização pela própria microbiota, sintetiza, a sua própria proteína (Russel et al., 1992).

Um dos objetivos básicos da nutrição de ruminantes é a maximização do fluxo de proteína microbiana do rúmen para o intestino delgado, visto que esta apresenta excelente perfil de aminoácidos (Schwab, 1996; Valadares Filho e Valadares, 2001) e atende entre 50 e 100% da exigência de aminoácidos do animal (NRC, 1996). Desta forma, a estimativa da síntese de proteína microbiana é de grande importância para entender a eficiência de uso de N pelos ruminantes (Zhou et al., 2017).

O entendimento da dinâmica na utilização de N pelos animais torna-se importante principalmente em estudos que visem o atendimento das exigências nutricionais dos animais, para manutenção, ganho de peso, etc. Dietas com déficit de N, geram atrasos nos ciclos da produção animal, devido à falta de substrato para a microbiota poder degradar a fibra. Porém se há excessos, estes podem gerar grandes perdas de N através das fezes e da urina (Pereira, 2009). Sendo através da urina o principal meio de excreção de compostos nitrogenados (CN) em mamíferos.

O balanço de N (BN), resultado direto da quantidade que o animal ingere menos o que ele excreta, permite um entendimento do estado proteico do animal, principalmente em animais mantidos em pastejo recebendo algum tipo de suplementação com CN.

Na produção de bovinos mantidos em pastejo, o manejo nutricional constitui um dos principais fatores a ser considerado, uma vez que o pasto de clima tropical dificilmente apresenta teores de proteína bruta (PB), energia, minerais e vitaminas que formem uma dieta balanceada para os ruminantes (Detmann et al., 2014; Paulino et al., 2014). A preocupação com a excreção de CN na urina, se dá principalmente pelo fato de que este é o nutriente/elemento mais caro na alimentação animal (Paulino et al., 2001; Valadares Filho et al., 2006; Pereira, 2009; Alves et al., 2009).

A taxa e extensão com que ocorre a degradação da PB do alimento pelos microrganismos no rúmen são fatores que afetam o aporte de aminoácidos para o intestino delgado. A disponibilidade de carboidratos também pode afetar a eficiência de utilização

dos CN, uma vez que são fonte energética para os microrganismos (Cavalcante et al., 2006).

A saída do N amoniacal do rúmen (NAR) se dá por incorporação à matéria microbiana, pela absorção na parede ruminal ou pelo fluxo de NAR para o abomaso (Nolan, 1993). Quanto maior for a degradação da proteína dietética, maior a produção de amônia e, possivelmente, maiores as perdas urinárias de CN (Russell et al. 1992).

Nos mamíferos a principal forma de excreção de CN na urina é na forma de ureia, podendo representar cerca de 80% do N excretado através da urina em dietas contendo entre 9 e 21% de PB (Marini e Van Amburgh, 2003). Quando a síntese de amônia no rúmen se torna maior que a sua utilização, ocorre aumento nas taxas de sua absorção pela parede do rúmen, e então é carregada pela corrente sanguínea até o fígado onde será detoxificada a ureia pelo ciclo da ornitina com gasto de energia (Visek, 1984; Russell et al. 1992; Van Soest, 1994).

Essa molécula de ureia pode retornar ao rúmen através da parede ruminal e ou saliva, com maior fluxo de retorno quando a concentração de N na dieta diminui (Valkeners et al., 2006). O desempenho dos microrganismos celulolíticos no rúmen está intrinsicamente ligado à qualidade e quantidade dos compostos fibrosos e de N não proteico. A concentração mínima de NAR recomendado pelo NRC (1996) para manter a atividade microbiana é de 5 mg/dL e, assim, permitir a efetiva digestão da matéria orgânica (MO). Detmann et al. (2014a) relataram que a NAR deve ser mantida ao redor de 15 mg/dL, uma vez que nesta concentração permite-se elevar o consumo de fibra em detergente neutro, maximização da degradação dos componentes fibrosos da dieta, melhorando a eficiência microbiana, aumentando assim a síntese de proteína microbiana.

Animais mantidos em sistema de pastejo, onde a pastagem apresenta baixa qualidade (PB menor que 7%), terão como elemento limitante para o crescimento dos microrganismos o N (Detmann et al., 2009). Batista et al. (2016) ao avaliarem a resposta nos níveis de CN de bovinos em confinamento alimentados com mudanças nas concentrações e na forma de fornecimento destes CN, observaram mudanças nas concentrações de NAR destes animais, tendo como menor valor de NAR (5,1 mmol/L) para os animais no tratamento controle (sem suplementação proteica), assumindo assim que o principal mecanismo para manter o aporte de CN para crescimento seja a reciclagem de N. Ocorre maximização na transferência de ureia do sangue para o rúmen, quando a concentração de NAR atinge valores entre 3,6 e 5,6 mmol/L (Batista et al., 2016).

Uma forma de correção da deficiência de N na dieta, é a suplementação com CN, que tende a aumentar o consumo e a digestibilidade da matéria seca (Lazzarini et al., 2009; Sampaio et al., 2010), garantindo melhores índices produtivos, com maiores ganhos de peso, aumentando-se também o fluxo de ureia para o rúmen via saliva e/ou parede ruminal (Wickersham et al., 2008). Contudo, havendo maior ingestão de N na dieta, com consequente picos na produção e concentração sérica de ureia, ocorre maior quantidade de ureia filtrada pelos rins e, assim, observa-se aumento na excreção de CN na urina (Russell et al., 1992; Rocha et al., 2016).

Desta forma, a ureia excretada na urina está relacionada diretamente com as suas concentrações no plasma e com a ingestão de N (Van Soest, 1994; Valadares et al., 1999). Broderick e Clayton (1997) relataram que o aumento nas concentrações de ureia no plasma pode significar um uso ineficiente da proteína da dieta. Observa-se aumento no pico de ureia plasmática cerca de 4 a 6 horas após a alimentação (Valadares et al., 1999). Valadares et al. (1997) observaram maior produção microbiana quando os níveis de ureia no plasma se encontraram ao redor de 12 a 15 mg/dL, o que provavelmente seria o limite a partir do qual começaria a haver maiores perdas de N através da urina, de novilhos zebuínos em confinamento, alimentados com rações contendo de 7 a 14,5% de PB na dieta.

Os métodos utilizados para medir a quantidade de CN microbianos baseiam-se em marcadores microbianos, como bases purinas (RNA), ácido 2,6 diaminopimélico (DAPA), ³⁵S e ¹⁵N, e a utilização dessas metodologias, requer que os animais sejam preparados cirurgicamente (Broderick e Merchen, 1992). Dessa forma há a necessidade de simplificação das técnicas experimentais com geração de técnicas menos invasivas para quantificar a síntese de proteína microbiana. Ao longo dos últimos anos, tem sido demonstrado que coletas de urina têm grande aplicação na quantificação da proteína microbiana através da excreção urinária de derivados de purinas (DP) (Perez et al., 1996; Pereira, 2009).

O método de excreção de DP assume que o fluxo duodenal de ácidos nucléicos é essencialmente de origem microbiana e, após digestão intestinal dos nucleotídeos de purinas, as bases adenina e guanina, presentes no RNA e no DNA microbiano, são catabolizadas e excretadas proporcionalmente na urina como DP, principalmente alantoína (AL), e também como hipoxantina, xantina e ácido úrico (AU) (Perez et al., 1996).

Assim, as purinas são, então, prontamente absorvidas no intestino delgado e ficam sujeitas à degradação realizada por enzimas específicas, como guanina deaminase, adenosina deaminase e xantina oxidase, durante passagem através da mucosa intestinal. Em bovinos, a excreção é quase que em sua totalidade na forma de AL e AU, devido à grande atividade da enzima xantina oxidase que transforma xantina e hipoxantina em AU em nível sanguíneo e tecidual, e pela ação da enzima uricase que converte AU em AL antes de sua excreção (Chen e Gomes, 1992; Lehninger, 1995).

A utilização dos DP através da excreção urinária para estimativa da síntese de proteína microbiana apresenta várias vantagens como: rapidez, facilidade de coletas das amostras, trata-se de um método não invasivo, onde não se faz necessária a utilização de animais com intervenções cirúrgicas (fistulação), o que permite evitar com isso, alterações do comportamento ingestivo, além de não comprometer o bem-estar e contribuindo com a bioética em experimentos com animais.

A excreção de DP está diretamente relacionada com a absorção de purinas (Chen e Gomes, 1992), e pode ser utilizada uma vez que a excreção endógena de DP e a relação quantitativa entre a excreção urinária destes metabólitos e a absorção de purinas tenham sido previamente determinadas (Verbic et al., 1990; Orellana Boero et al., 2001; Barbosa et al., 2011).

Rennó et al. (2000), trabalhando com bovinos fistulados, observaram que não houve diferença entre a produção de proteína microbiana quantificada pelo método das purinas no abomaso e pela excreção urinária de DP. A excreção urinária de DP apresenta correlação positiva com o fluxo de N microbiano encontrado no abomaso (Vagnoni et al., 1997; Johnson et al., 1998).

Contudo, para estimação da excreção dos DP, há necessariamente que se conhecer o volume urinário, sendo obtido inicialmente por meio de coleta total de urina. No entanto, essa técnica é laboriosa, pode causar desconforto ao animal e extremamente difícil de ser realizada como rotina experimental com animais mantidos em pastejo. Logo, quanto menor o tempo de coleta, menores serão os problemas observados, como possíveis lesões no trato urinário das fêmeas utilizadas. Chen e Gomes (1992) relataram que visando reduzir erros provenientes de variações na produção urinária, as coletas de urina deveriam ser feitas durante, no mínimo, cinco dias.

Poucos experimentos foram realizados fazendo coletas de urina com uso de fêmeas com sondas e esses estudos, em sua grande maioria, foram conduzidos em sistema de confinamento, e os tempos de coleta realizados foram de cinco (Susmel et al., 1994),

quatro (Valadares et al., 1997) e três dias (Gonda e Lindenberg, 1997; Vagnoni et al., 1997). De acordo com Fleming et al. (1991), Valadares et al. (1997), Leal et al. (2007) e Barbosa et al. (2006) o período de coleta com duração de 24 horas é suficiente para a avaliação da excreção urinária diária de bovinos Nelore, independentemente de serem novilhas, machos castrados, machos não-castrados ou vacas em lactação. Silva Júnior (2014) trabalhando com novilhas Nelore mantidas em sistema de pastejo recebendo diferentes suplementos, realizando coleta total de urina durante cinco dias consecutivos, também não observou variação entre dias para volume urinário, recomendando que um período de 24 horas seja suficiente para quantificação da excreção urinária.

Porém a demanda internacional por mudanças na experimentação com animais, que visem o bem-estar animal, requer o desenvolvimento de técnicas cada vez menos invasivas e que gerem menos desconforto ao animal. A alternativa proposta para facilitar o processo de obtenção de amostras representativas de urina é o método com base na obtenção de amostras *spot* de urina, que relaciona a excreção urinária de creatinina com sua concentração na urina. Como a excreção de creatinina na urina é relativamente constante em função do peso corporal (Vagnoni et al., 1997; Valadares et al., 1997; Chizzotti et al., 2008), esta pode ser usada como um indicador da produção urinária, e possibilita a estimativa da excreção dos DP sem a coleta total de urina (Valadares et al., 1999).

A coleta *spot* de urina consiste na obtenção de uma amostra pontual de urina em um período de 24 horas. Nesta técnica, o volume urinário é calculado dividindo-se a excreção diária de creatinina (mg), por sua concentração na urina *spot* (mg/L). Valores relatados na literatura apresentam excreções de creatinina de 27,36 mg/kg do peso corporal (PC) (Rennó et al., 2008), 27,99, 24,04 e 24,07 mg/kg PC (Chizzotti et al., 2008) 25,47 mg/kg PC (Leal et al., 2007), 23,41 mg/kg PC (Oliveira et al., 2001), e 23,03 mg/kg PC (Silva Júnior, 2014).

Contudo, como a proporção dos tecidos (proteico, gorduroso, ósseo) apresentam variações dentro de cada estágio de crescimento, é possível que haja variações na excreção de creatinina diariamente, sendo, então, expressa em função do PC. Assim, objetivando estudar a excreção de creatinina em função do PC, o BR-Corte (2016) realizou meta-análise de 32 trabalhos, tendo como resultado a equação $ECU(mg/dia) = 37,88 \times PC^{0,9316}$, onde ECU é a excreção diária de creatinina na urina. Essa equação se diferencia da desenvolvida por Chizzotti et al. (2006) por ser uma equação que leva em consideração que o animal cresce de forma alométrica e não de forma linear.

Enquanto a excreção de CN varia com o teor de PB da dieta, a excreção urinária de creatinina não é afetada (Valadares et al., 1997). Vários estudos também relataram que a excreção de creatinina é uma função constante do peso vivo e que não é afetada pelo teor de N da dieta (Valadares et al., 1999; Chizzotti et al., 2008; Pereira, 2009; Silva Júnior, 2014).

A creatinina encontra-se no sangue e na urina, estando no sangue não é mais utilizada e é excretada constantemente através da urina. Nos rins, a arginina se une com a glicina para formação da glicociamina, que em seguida é conduzida ao fígado, onde receberá uma metila pela s-adenosina-metionina, dando origem a uma molécula de creatina. Esta creatina é conduzida para o músculo, onde reage com a adenosina trifosfato (ATP) formando a creatina-P, que pela ação da enzima creatina quinase e é então estocada como fosfocreatina. Uma parte da creatina livre no músculo não participa desta reação e perde água, sendo convertida em creatinina e posteriormente excretada na urina (Heymsfield et al., 1983).

Borsook e Durnoff (1947) relataram que 98% da reserva de creatina do corpo estão nos músculos, principalmente na forma de fosfocreatina, sendo um imediato precursor da creatinina. Aproximadamente 2% da quantidade total de creatina-P corporal são convertidos a creatinina diariamente (Bloch et al., 1941).

Bloch e Schoenheimer (1939), administrando ^{15}N -creatina em ratos de laboratório, observaram que o marcador se distribuiu homogeneamente no *pool* da creatina do corpo desses animais e também na creatinina excretada através da urina. O que levou a observação da constância para a relação da quebra da molécula de creatina e surgimento da creatinina durante um período de cinco dias, sugerindo, assim, que a creatina é o único precursor da creatinina, e, assim, concluíram que a conversão de creatina em creatinina é um processo irreversível.

Van Niekerk et al. (1963), ao avaliarem a excreção urinária de creatinina, como índice de predição da composição corporal, em ovinos de diferentes idades e sendo submetidos a diferentes dietas, não observaram efeitos tanto da idade quanto de dieta, nem para sua interação, sobre a excreção urinária da creatinina mensurada por unidade de proteína corporal.

A excreção de creatina na urina é considerada baixa, Vici et al. (1987) ao avaliarem o fornecimento de suplementos como ornitina, lisina, arginina, citrulina e creatina para pacientes humanos que apresentavam hiperamonemia, observaram concentrações de $11 \mu\text{mol/kgPC}$. Sendo que estes mesmos autores ao citarem Pavry et al.

(1979), descrevem como valores de referência para a excreção de creatina na urina de 41 a 104 $\mu\text{mol/kgPC}$, não sendo influenciada por idade ou sexo (Forbes e Bruining, 1978).

O equilíbrio da molécula de creatinina (creatina \leftrightarrow creatinina), *in vitro*, é amplamente dependente de temperatura e pH, onde a creatina é favorecida em pH básico e baixa temperatura, e a creatinina tem aumento de sua concentração quando há elevadas temperaturas e meio ácido (Lempert, 1959). Van Niekerk et al. (1963) ao avaliarem a recuperação da creatinina em amostras de urina de ovinos, observaram que há degradação da creatinina em pH de 8,4 a 8,7, e quando estas amostras são armazenadas à temperatura ambiente, variando entre 27 a 30°C. No entanto, encontrou aumento na concentração urinária de creatinina quando esta é armazenada acidificada (pH 2,5 a 3,5) em temperatura entre 28 e 39°C, por 150 dias.

Martin et al. (1986), citando Pardue (1977) e Delanghe e Speeckaert (2011), descreveram que o método analítico para quantificar a concentração de creatinina foi primeiramente desenvolvido por Jaffé há mais de 130 anos, como o método do picrato alcalino, sendo até hoje o mais utilizado, principalmente pela falta de outras alternativas válidas e pelo baixo preço dos produtos químicos necessários (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Delanghe e Speeckaert (2011) relataram que o método foi adaptado para o método cinético colorimétrico, onde a concentração da creatinina é determinada a partir da reação com ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Nesta solução, ocorre a máxima formação do complexo corado creatinina-picrato.

Partindo-se do pressuposto de que a excreção de creatinina seja constante e relacionada apenas ao PC, a coleta total pode, então, ser substituída pela coleta *spot* de urina. Contudo, para Fujihara et al. (1987), apesar de a excreção de creatinina ser constante, existe uma variação na excreção de DP ao longo do dia.

Ao avaliar a variação nas concentrações de DP e creatinina no soro e na urina de novilhas, com peso médio de 204 kg, Chen et al. (1992) observaram variações nas concentrações urinárias de creatinina e DP ao longo do dia (08h00-12h00, 12h00-16h00, 16h00-20h00, 20h00-00h00, 00h00-04h00, 04h00-08h00), porém as variações da concentração de creatinina observadas foram semelhantes às variações observadas para a excreção de DP.

Assim, tem-se sugerido uma relação entre os DP com a creatinina (DP:creatinina), realizada a partir das concentrações destes compostos excretados, que servem como indicadores da quantidade de N microbiano que chega ao duodeno (Chen e Gomes, 1992). Segundo Chen et al. (1992) para que esta relação seja utilizada é necessário que dois

pressupostos sejam atingidos, sendo esses: que a relação DP:creatinina seja constante ao longo do dia; e que a excreção de creatinina seja constante e não seja influenciada pela dieta.

Para Chen et al. (1992), a relação DP:creatinina apresentou pouca variação diurna (coeficiente de variação de 8%, com alta correlação [0,92]) e, portanto, a coleta *spot* de urina permite estimar adequadamente a síntese de proteína microbiana.

Chen et al. (2004), visando a resolução da necessidade de coleta total de urina, desenvolveu um índice de DP:creatinina que se ajusta ao volume urinário diário e ao tamanho e peso do animal. Este índice é obtido pela divisão das concentrações de DP e creatinina na urina, com resultado multiplicado pelo peso metabólico do animal ($PC^{0,75}$). Este índice permite ajustes no uso da creatinina para diferentes volumes urinários e, também, sobre o tamanho dos animais. Estes autores relatam ainda que há uma grande correlação entre a excreção de DP e índice PD:creatinina.

Pereira (2009) avaliou o efeito da hora da coleta de urina, realizando coleta *spot* de urina, sobre a relação DP:creatinina, em novilhas Nelore em confinamento, de duas em duas horas (com dois dias de coleta) e não encontrou diferença do horário de coleta sobre a relação DP:creatinina. No entanto, quando avaliou o efeito da hora da coleta de urina sobre a relação ureia:creatinina e sobre a relação N total:creatinina, observou que havia variação na excreção de CN nos horários da alimentação dos animais e estimou matematicamente que as coletas efetuadas pela manhã e tarde (08h00 e 16h00), permitiam estimar adequadamente as excreções de CN, ou seja, nos períodos imediatamente após as alimentações.

Silva Júnior (2014), estudando a relação DP:creatinina com coleta total de urina, com amostragem a cada 4 horas, também não observou diferença sobre o horário de obtenção da amostra para a relação DP:creatinina. Entretanto, observou que há variação na relação de excreção de CN:creatinina de acordo com o horário de obtenção da amostra, demonstrando haver variações na excreção CN, com picos de aumento após o fornecimento da suplementação e picos de baixa excreção antes do fornecimento do alimento suplementar.

Dórea et al. (2017) ao realizarem meta-análise com 62 experimentos (45 oriundos de gado de leite e 17 com gado de corte), avaliando a excreção de DP obtidos a partir da relação DP:creatinina *index* desenvolvido por Chen et al. (2004), como indicador para predição do consumo de MS, observaram alta correlação entre os DP e a ingestão de MS.

Sugerindo então, que esta relação pode ser usada para estimar o consumo de MS em gado de leite, porém necessita de mais trabalhos para validação em gado de corte.

Entretanto, mesmo havendo grande importância do conhecimento da concentração de creatinina nas amostras de urina de bovinos, não há dados na literatura informando a melhor forma de armazenamento das amostras.

Assim, hipotetizou-se que a excreção de creatinina é constante e que não há variação na excreção dos DP ao longo do dia, contudo, há variações na excreção de CN e na recuperação da creatinina em função do tempo e da temperatura de armazenamento das amostras de urina de bovinos.

Desta forma, objetivou-se avaliar a excreção de creatinina para validação da coleta *spot* de urina, bem como as excreções de DP e CN e suas relações com a creatinina em novilhas Nelore suplementadas a pasto. Avaliou-se também a recuperação da creatinina na urina de bovinos armazenadas em função do tempo e de diferentes temperaturas de armazenamento.

Referências Bibliográficas

- Alves, T. C.; Franzolin, R.; Rodrigues, P. H. M.; Alves, A. C. 2009. Efeitos de dietas com níveis crescentes de milho no metabolismo ruminal de energia e proteína em bubalinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38:2001-2006.
- Barbosa, A. M.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Verás, R. M. L.; Leão, M. I.; Detmann, E.; Paulino, M. F.; Marcondes, M. I. Souza, M. A. 2006. Effect of urinary collection days, concentrate levels and protein sources on creatinine, urea and purine derivatives excretions and microbial protein synthesis in Nellore cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35:870-877.
- Barbosa, A. M.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Pina, D. S.; Detmann, E.; Leão, M. I. 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in Nellore cattle. *Journal of Animal Science*. 89:510-519.
- Batista, E. D.; Detmann, E.; Gomes, D. I.; Rufino, L. M. A.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C.; Franco, M. O.; Sampaio, C. B.; Reis, W. L. S. 2016. Effect of protein supplementation in the rumen, abomasum, or both on intake, digestibility, and nitrogen utilization in cattle fed high-quality tropical forage. *Animal Production Science*. 57:19993-2000.
- Bloch, K.; Schoenheimer, R. 1939. Studies in protein metabolism. The metabolic relation of creatine and creatinine studied with isotopic nitrogen. *The Journal of Biological Chemistry*. 131:111-119.
- Bloch, K.; Schoenheimer, R.; Rittenberg, D. 1941. Rate of formation and disappearance of body creatinine in normal animals. *The Journal of Biological Chemistry*. 138:155-166.
- Broderick, G. A.; Merchen, N. R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 75:2618-2632.
- Borsook, H.; Durnoff, J. W. 1947. The hydrolysis of phosphocreatinine and the origin of urinary creatinine. *The Journal of Biological Chemistry*. 168:493-510.
- BR-Corte. 2016. Tabelas brasileiras de exigências nutricionais. Editores: Valadares Filho, S. C.; Costa e Silva, L. F.; Gionbelli, M. P.; Rotta, P. P.; Marcondes, M. I.; Chizzotti, M. L.; Prados, L. F. 3º Ed. Viçosa/MG: UFV, DZO. 327p.
- Broderick, G.A; Clayton, M. K. A. 1997. Statistical of animal and nutritional factors influencing concentration of milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*. 80:2964-2971.
- Cavalcante, M. A. B.; Pereira, O. G.; Valadares Filho, S. C.; Ribeiro, K. G.; Pacheco, L. B. B.; Araújo, D.; Lemos, V. M. C. 2006. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35:203-210.
- Chen, X. B.; Gomes, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – on overview of technical details.

Buscksburnd: Rowett Research Institute. International Feed Resources Unit. (Occasional publication).

Chen, X. B.; Grubic, G.; Ørskov, E. R.; Osuji, P. 1992. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. *Animal Production*. 55:185-191.

Chen, X. B.; Jayasuria, M. C. N.; Makkar, H. P. S. 2004. Measurement and application of purine derivatives: Creatinine ration in spot urine samples of ruminants. In: *Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives*. Editores: Makkar, H. P. S.; Chen, X. B. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 167–179.

Chizzotti, M. L.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Chizzotti, F. H. M.; Campos, J. M. S.; Marcondes, M. I. 2006. Consumo, digestibilidade e excreção de ureia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. *Revista brasileira de zootecnia*. 35:1813-1821.

Chizzotti, M. L.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Chizzotti, F. H. M.; Tedeschi, L. O. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science*. 113:218-225.

Delanghe, J. R.; Speeckaert, M. M. 2011. Creatinine determination according to Jaffé what does it stand for?. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 4:83-86.

Detmann, E.; Paulino, M. F.; Mantovani, H. C.; Valadares Filho, S. C.; Sampaio, C. B.; Souza, M. A.; Lazzarini, I.; Detmann, K. S. C. 2009. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. *Livestock Science*. 126:136 –146.

Detmann, E.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C.; Batista, E. D.; Rufino, L. M. A. 2014. Aspectos nutricionais aplicados a bovinos em pastejo nos trópicos. In: *Proc. 9th Symposium of beff cattle production*. Viçosa, Brazil. 239p.

Detmann, E.; Valente, E. E. L.; Batista, E. D.; Huhtanen, P. 2014a. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. *Livestock Science*. 162:141-153.

Dórea, J. R. R.; Danés, M. A. C.; Zanton, G. I.; Armentano, L. E. 2017. Urinary purine derivatives as a tool to estimate dry matter intake in cattle: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*. 100:1-18.

Fleming, S. A.; Hunt, E. L.; Riviere, J. E.; Anderson, K. L. 1991. Renal clearance and fractional excretion of electrolytes over four 6-hour periods in cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 52:5-8.

Forbes, G. B.; Bruining, G. J. 1978. Urinary creatinine excretion and lean body mass. *Amercian Journal of Clinical Nutrition*. 29:1359-1366.

Fujihara, T.; Ørskov, E. R.; Reeds, P. J.; Kyle, D. J. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *Journal of Agricultural Science*. 109:7-12.

- Gonda, H. L.; Lindberg, J. E. 1997. Effect of diet on milk allantoin and its relationship with urinary allantoin in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80:364-373.
- Heymsfield, S. B.; Arteaga, C. A.; Manus, C. M.; Smith, J. 1983. Measurement of muscle mass in humans: validity of 24-hour urinary creatinine method. *American Journal of Clinical Nutrition*. 37:487-494.
- Johnson, L. M.; Harrison, J. H.; Riley, R. E. 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using urinary uric acid or allantoin. *Journal of Dairy Science*. 81:2408-2420.
- Lazzarini, I.; Detmann, E.; Sampaio, C. B.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C.; Souza, M. A.; Oliveira, F. A. 2009. Dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61:635-647.
- Leal, T. L.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Campos, J. M. S.; Detmann, E.; Barbosa, A. M.; Teixeira, R. M. A.; Marcondes, M. I. 2007. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36:905-911.
- Lehninger, A. L. 1995. Biosíntese e atualização da energia das ligações de fosfato. 2th ed. Edgard Blucher Ltda.
- Lempert, C. 1959. The chemistry of the glycoyamidines. *Chemical Reviews*. 59:667-736.
- Marini, J. C.; Van Amburgh, M. E. 2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *Journal of Animal Science*. 81:545-552.
- Martin, H.; Chesler, R.; Hagenhuber, C.; Blank, D. W.; Kestrur, J.; Rawe, M. 1986. Automated determination of urinary creatinine without sample dilution: Theory and practice. *Clinical Chemistry*. 32:446-452.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. National Acad. Press, Washington, D.C.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen kinetics. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Editores: Forbes, J. M.; France, J. 123-143.
- Oliveira, A. S.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Cecon, P. R.; Rennó, L. N.; Queiroz, A. C.; Chizzotti, M. L. 2001. Produção de proteína microbiana e estimativa das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30:1621-1629.
- Orellana Boero, P.; Balcells, J.; Martín-Orúe, S. M.; Liang, J. B.; Guada, J. A. 2001. Excretion of derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livestock Science*. 68:243-250.

Paulino, M. F.; Detmann, E.; Zervoudakis, J. T. 2001. Suplementos múltiplos para recria e engorda de bovinos em pastejo. In: Proc. 2th Symposium of beff cattle production. Viçosa, Brazil. p.187.

Paulino, M. F.; Detmann, E.; Silva, A. G.; Almeida, D. M.; Márquez, D. E. C.; Moreno, D. P. S.; Moura, F. H.; Cardenas, J. E. G.; Lima, J. A. C.; Martins, L. S.; Manso, M. R.; Ortega, R. E. M.; Lopes, S. A.; Carvalho, V. V. 2014. Bovinocultura otimizada. In: Proc. 9th Symposium of beff cattle production. Viçosa, Brazil. p.139.

Pereira, V. S. A. 2009. Influência do peso corporal e das características de carcaça sobre a excreção de creatinina e utilização de coleta spot de urina para estimar a excreção de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas Nelore. Master Diss. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Perez, J. F.; Balcells, J.; Guarda, J. A.; Castrillo, C. 1996. Determination of rumen microbial nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using ¹⁵N and purine bases as maskrs of microbial-nitrogen entering the duodenal. British Journal of Nutrition. 75:699-709.

Rennó, L. N.; Valadares, R. F. D.; Leão, M. I.; Valadares Filho, S. C.; Silva, J. F. C.; Cecon, P. R.; Dias, H. L. C.; Costa, M. A. L.; Oliveira, R. V. 2000. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhas. Revista Brasileira de Zootecnia. 29:1223-1234.

Rennó, L. N.; Valadares Filho, S. C.; Paulino, M. F.; Leão, M. I.; Valadares, R. F. D.; Rennó, F. P.; Paixão, M. L. 2008. Níveis de ureia na ração de novilhas de quatro grupos genéticos: parâmetros ruminais, ureia plasmática e excreção de ureia e creatinina. Revista Brasileira de Zootecnia. 37:556-562.

Rocha, T. C.; Fontes, C. A. A.; Silva, R. T. S.; Processi, E. F.; Valle, F. R. A. F.; Lombardi, C. T.; Oliveira, R. L.; Bezerra, L. R. 2016. Performance, nitrogen balance and microbial efficiency of beef cattle under concentrate supplementation strategies in intensive management of a tropical pasture. Tropical Animal Health Production. 48:673-681.

Russell, J. B.; O'Connor, J. D.; Fox, D. J.; Van Soest, P. J.; Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I Ruminant fermentation. Journal of Animal Science. 70:3551-3561.

Sampaio, C. B.; Detmann, E.; Lazzarini, I.; Souza, M. A.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C. 2009. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. Revista Brasileira de Zootecnia. 38:560-569.

Schwab, C. G. 1996. Amino acid nutrition of dairy cow: current status. In: Proc. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufactures. Ithaca. Proceedings... Ithaca: Cornell University. 84-198.

Silva Júnior, J. M. 2014. Excreção urinária de derivados de purinas e de compostos nitrogenados de zebuínos em pastejo. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

Susmel, P.; Stefanon, B.; Plazzotta, E.; Spanghero, M.; Mills, C. R. 1994. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. *Journal of Agricultural Science*. 123:257-266.

Vagnoni, D. B.; Broderick, G. A.; Clayton, M. K.; Hatfield, R. D. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science*. 80:1695-1702.

Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D. 2001. Teores de proteína em dietas de vacas de leite. In: Proc. 2th International symposium of dairy cattle. Lavras, Brazil.

Valadares Filho, S. C.; Paulino, P. V. R.; Magalhães, K. A. 2006. Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos – BR Corte. 1th ed. Viçosa, MG. p.142.

Valadares, R. F. D.; Gonçalves, L. C.; Rodriguez, N. M.; Valadares Filho, S. C.; Sampaio, I. B. 1997. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 4. Concentrações de amônia ruminal e ureia plasmática e excreções de ureia e creatinina. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 26:1270-1278.

Valadares, R. F. D.; Broderick, G. A.; Valadares Filho, S. C.; Clayton, M. K. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science*. 82:2686-2696.

Valkeners, A.; Théwis, A.; Amant, S.; Beckers, Y. 2013. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-musled Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *Journal of Animal Science*. 84:877-885.

Van Niekerk, B. D. H.; Bensadoun, A.; Paladines, O. L.; Reid, J. T. 1963. A study of the conditions affecting the rate of excretion and stability of creatinine in sheep urine. *Journal of Nutrition*. 79:373-380.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminants. 2th ed. Ithaca: Cornell University. 476p.

Verbic, J.; Chen, X. B.; MacLeod, N. A.; Ørskov, E. R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science*. 114:243-248.

Vici, C. D.; Bachamann, C.; Gambarara, M.; Colombo, J. P.; Sabetta, G. 1987. Hypermethioninemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria syndrome: Low creatine excretion and effects of citrulline, arginine, or ornithine supplement. *Pediatric Research*. 22:364-367.

Visek, W. J. 1979. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. *Nutrition Review*. 37:273-282.

Wickersham, T. A.; Titgemeyer, E. C.; Cochran, R. C.; Wickersham, E. E.; Moore, E. S. 2008. Effect of frequency and amount of rumen-degradable intake protein supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming low-quality forage. *Journal of Animal Science*. 86:3089-3099.

Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological reviews*. 80:1107-1213.

Zhou, J. M.; Mi, J. D.; Degen, A. A.; Ding, L. M.; Guo, X. S.; Shang, Z. H.; Wang, W. W.; Long, R. J. 2017. Urinary purine derivatives excretion, rumen microbial nitrogen synthesis and the efficiency of utilization of recycled urea in Tibetan and fine-wool sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 227: 24-31.

Capítulo 1

Pode uma única amostra *spot* de urina obtida no pasto ser usada para estimar a excreção de derivados de purinas e compostos nitrogenados?

Resumo

O presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de avaliar a excreção de creatinina para validação da coleta *spot* de urina, bem como as excreções de derivados de purinas (DP) e de compostos nitrogenados (CN) e suas relações com a creatinina em novilhas Nelore suplementadas a pasto. O experimento foi conduzido no setor de gado de corte da UFV, utilizando-se cinco novilhas Nelore com peso corporal (PC) médio de $400 \pm 15\text{kg}$, distribuídas em quadrado latino (5x5). Os cinco tratamentos experimentais se basearam na suplementação com concentrado contendo 22% de proteína bruta na matéria seca, fornecido às 12h, na quantidade diária de 0, 3, 6, 9 e 12 g/kg PC do animal. Cada período experimental teve duração de 16 dias (12 de adaptação à dieta e quatro de coleta). A coleta total de urina foi efetuada durante três dias a cada quatro horas; nos períodos das 0h00-4h00, 4h00-8h00, 8h00-12h00, 12h00-16h00, 16h00-20h00 e 20h00-24h00. A coleta *spot* de urina foi realizada durante 24 horas, nos horários das 0, 4, 8, 12, 16, 20 horas. Nas amostras de urina foram determinadas as concentrações de creatinina, nitrogênio total urinário (NU), ureia (UreiaN), ácido úrico (AU) e alantoína (AL). Para análise estatística utilizou-se SAS 9,4 e o MES para adequação da melhor forma de coleta de urina utilizando a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição (QMEP) entre as amostras obtidas por coleta total a cada 4 horas com as amostras *spot* de urina. As excreções de AL, AU e DP, em mmol, e a síntese de nitrogênio microbiano foram influenciadas pelos tratamentos ($P < 0,05$). As relações entre AL, AU e DP com a creatinina, não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos dias de coleta, períodos de coleta, tratamentos e suas interações. A excreção de CN na urina foi influenciada ($P < 0,05$) pelos tratamentos e pelos períodos de coleta, enquanto as relações NU:creatinina e UreiaN:creatinina não apresentaram nenhum efeito ($P > 0,05$) das variáveis estudadas. A avaliação comparativa da excreção de creatinina, e as relações AL:creatinina e AU:creatinina nas amostras obtidas a partir da coleta total de urina com as amostras *spot* de urina não foram diferentes entre as duas formas avaliadas ($P > 0,05$). Contudo, diferiu ($P < 0,05$) para as relações NU:creatinina e UreiaN:creatinina ($P < 0,05$). Conclui-se que a excreção de creatinina é constante em 24h e estima adequadamente o volume urinário em bovinos mantidos em pastejo; e que uma única amostra *spot* de urina obtida no pasto, em

qualquer horário do dia, pode ser usada para estimar a excreção de derivados de purinas. Para a estimativa da excreção de CN na urina são necessárias duas amostras *spot* de urina, uma quatro horas antes e outra quatro após a suplementação, em bovinos em pastejo.

Introdução

A produção de gado de corte no Brasil se baseia principalmente em animais mantidos em sistema de pastejo (ASSOCON, 2012). Contudo, as variações sazonais que ocorrem na produção de forragem, causam alteração na disponibilidade e na qualidade do pasto (Detmann et al., 2014), que interfere na produtividade animal. Na tentativa de melhorar o desempenho de bovinos em pastejo faz-se uso de suplementação proteico-energética, o que aumenta a disponibilidade de nitrogênio ruminal, permite maior crescimento microbiano e conseqüente maior aproveitamento da fibra.

O conhecimento da excreção urinária dos derivados de purinas (DP), como a alantoína e o ácido úrico, permite estimar a síntese de proteína microbiana em bovinos (Valadares et al., 1999). Para quantificação da excreção urinária dos DP e dos compostos nitrogenados (CN) pode se realizar coleta total de urina (técnica laboriosa e de difícil realização em pastejo) ou através da técnica da coleta *spot* de urina.

A técnica da coleta *spot* de urina possui grande aplicação prática para a pesquisa com bovinos em pastejo, e baseia-se na utilização da creatinina como indicador da produção urinária diária (Valadares et al., 1997) e na sua relativa constância na excreção por unidade de peso (Chizzotti et al., 2008; Silva Júnior, 2014).

Trabalhos realizados em confinamento (Chen et al., 1992; Chen et al., 2004; Pereira, 2009) têm estudado a excreção urinária e a relação dos DP com a creatinina e encontrando resultados positivos sobre a utilização da creatinina para estimativa do volume urinário, confirmando a utilização da coleta *spot* para animais confinados. Pereira (2009) avaliou a excreção urinária e a relação dos CN com a creatinina e encontrou variação da excreção destes compostos ao longo do período de 24 horas, relatando que para a avaliação da excreção dos CN são necessárias duas amostras *spot* de urina.

Em pastejo, Silva Júnior (2014), avaliando a excreção e a relação dos DP com a creatinina, não encontrou efeito para tratamento, dia e períodos de coleta total de urina com amostragem a cada quatro horas, durante cinco dias consecutivos. No entanto, encontrou efeito de período de coleta e de tratamento para a excreção de nitrogênio urinário (NU) e nitrogênio ureico (UreiaN) e suas relações com a creatinina.

Assim, hipotetizou-se que a excreção de creatinina é constante e que não há variação na excreção dos DP ao longo do dia, contudo, há variações na excreção de CN.

Desta forma, objetivou-se avaliar a excreção de creatinina para validação da coleta *spot* de urina, bem como as excreções de DP e CN e suas relações com a creatinina em novilhas Nelore suplementadas a pasto.

Material e métodos

Animais, tratamentos e desenho experimental

Todos os procedimentos realizados nesse estudo seguiram protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (protocolo CEUAP-UFV 24/2016). O experimento foi conduzido no Setor de Gado de Corte, pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, durante a época seca do ano.

Foram utilizadas cinco novilhas Nelore fistuladas no rúmen, com peso corporal (PC) médio inicial de 400 ± 15 kg e 24 meses de idade, mantidas em piquetes individuais de aproximadamente 0,5 hectare cada, com pastagem constituída de capim braquiária {*Uruchloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster cv. Basilisk [syn. *Brachiaria decumbens* Stapf cv. Basilisk]}, dotados de bebedouros e comedouros cobertos.

Os cinco tratamentos experimentais se basearam na quantidade de suplementação proteico-energética fornecida com base no PC do animal, sendo os níveis de suplementação de 0, 3, 6, 9 e 12 gramas por kgPC (PC0, PC3, PC6, PC9 e PC12, respectivamente). Utilizou-se concentrado com 22.21% de proteína bruta (PB) com base na matéria seca (MS).

Os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias às dietas, piquetes e condução ao tronco de contenção antes do início do período experimental, sendo tratadas para endo e ectoparasitas.

Os suplementos foram fornecidos uma única vez ao dia, às 12h. Quantidade conhecida de sal mineral foi fornecida em cocho separado a fim de permitir a determinação do seu consumo médio diário. As proporções dos ingredientes do concentrado e a composição química do concentrado e do capim braquiária podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Proporções dos ingredientes nos concentrados e a composição química do suplemento e do pasto com base na matéria seca.

Ingredients	Sal –		
	Mineral mix*	Concentrado	Pasto
Milho moído	-	83,5	-
Farelo de Soja	-	14,1	-
Urea/Sulfato de amônia	-	2,40	-
	Composição química		
Materia seca, g/kg	100	88,5	35,6 ± 10,1
Materia orgânica	-	98,1	92,0 ± 1,03
Proteína bruta	-	22,2	7,74 ± 2,05
FDNcp	-	12,9	71,0 ± 3,72
CNF	-	59,9	11,4 ± 2,62
FDNi	-	2,10	24,5 ± 2,61

Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), carboidratos não fibrosos (CNF), e fibra em detergente neutro indigestível (NDFi).

*Sal - Mineral mix: Fosfato bicalcico (50%), sal comum (47,2%), sulfato de zinco (1,5%), sulfato de cobre (0,7%), sulfato de manganês (0,5%), sulfato cobalto (0,05%), selenito de sódio (0,006) e iodato de potássio (0,05%).

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 5×5. Cada um dos cinco períodos experimentais teve duração de 16 dias, sendo 12 de adaptação a dieta experimental e quatro de coleta (fezes, urina, líquido ruminal e sangue). Os animais foram pesados no primeiro dia de cada período experimental para ajuste na quantidade a ser fornecida.

Os animais foram rotacionados entre piquetes e tratamentos, visando à eliminação de possíveis efeitos de piquete sobre os tratamentos (que também foram trocados) de forma a permitir que todos os animais passassem por todos os piquetes e por todos os tratamentos sem que houvesse repetição entre si.

Para estimação da excreção de MS fecal, foi realizado o fornecimento de dióxido de titânio aos animais na quantidade diária de 15 g, entre o oitavo e décimo sexto dia de cada período experimental. Os animais eram conduzidos ao tronco de contenção onde receberam o indicador que foi acondicionado em cartuchos de papel e introduzido diretamente no rúmen em uma única dose às 12:00 horas. Para estimar o consumo de MS de pasto foi utilizada a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador interno (Detmann et al., 2001).

Coletas de amostras

No terceiro dia de cada período experimental, foi realizada coleta de pasto para quantificação da disponibilidade de MS potencialmente digestível (MSpd), através do corte rente ao solo de quatro áreas delimitadas por um quadrado metálico de 0,5 × 0,5 m,

selecionados aleatoriamente em cada piquete experimental, como descrito por McMeniman (1997).

Foi realizada a simulação manual de pastejo em cada piquete, no 13º e 16º dias de cada período experimental, para avaliação qualitativa do pasto (Johnson, 1978). Essas amostras foram pesadas e levadas imediatamente à estufa com circulação forçada de ar (55°C) e moídas em moinho de facas a 2 mm para análise de FDNi e a 1 mm para demais análises laboratoriais.

A coleta de fezes foi realizada com amostragens a cada quatro horas (4h00, 8h00, 12h00, 16h00, 20h00 e 24h00) entre o 13º e 15º dia de cada período experimental, totalizando 18 amostras por animal por período de coleta.

A coleta total de urina foi realizada entre o 13º e 15º dias de cada período experimental, e no 16º foi realizada coleta *spot* de urina, nos mesmos horários já descritos para coletas de fezes. Os períodos de coleta foram: 04:00h-08:00h, 08:00h-12:00h, 12:00h-16:00h, 16:00h-20:00h, 20:00h-0:00h e 24:00h-04:00h. Para a coleta total de urina foi utilizada a sonda de Folley nº 26, duas vias, com balão de 50 mL. Na extremidade livre da sonda foi acoplada uma mangueira de polietileno condutora de urina até uma bolsa coletora de urina por sistema fechado (bolsa de polietileno) com capacidade de dois litros, que foi fixada com cordas em uma bolsa confeccionada com tecido de algodão resistente, ao pescoço do animal, na região ventral, acima da maçã de peito. Para esvaziamento da bolsa, os animais foram conduzidos ao tronco de contenção nos horários estipulados e previamente descritos. A sonda foi colocada em cada animal a partir das 6 horas da manhã do 13º dia, iniciando a coleta de urina às 8 horas, em cada período experimental.

No momento da amostragem, aferiu-se o volume e foram retiradas duas alíquotas: uma de 50 mL e outra de 10 mL que foi diluída em 40 mL de H₂SO₄ 0,036N (para evitar precipitação do ácido úrico (AU)). Ambas amostras tiveram o pH corrigido para valor menor que 3, com adição de H₂SO₄ puro para análise, para impedir o desenvolvimento de microrganismos e, então, foram armazenadas a -20°C para posteriores análises. A amostra de urina sem diluição foi utilizada para quantificação do nitrogênio urinário (NU), e a amostra diluída para quantificação das concentrações de creatinina (Cre), ureia (U), alantoína (AL) e AU.

A coleta de sangue foi realizada no 16º dia do período experimental, nos mesmos horários da coleta *spot* de urina, por punção da veia jugular, usando tubos com gel separador. Estas amostras foram imediatamente centrifugadas a 3000 x g durante 15

minutos e então o soro foi acondicionado em recipientes identificados e armazenados a -20°C para posterior análise de U.

Para estimação da concentração de amônia ruminal foi coletada uma alíquota de líquido ruminal, nos mesmos horários já descritos para sangue e coleta *spot* de urina, diretamente via fistula ruminal, sendo armazenado 40 mL de líquido ruminal em 1 mL de H₂SO₄, armazenadas a -20°C para posteriores análises.

O sal mineral presente no cocho no dia subsequente ao último dia de cada período experimental foi retirado e pesado.

Análises laboratoriais

As amostras fecais, suplementos e forragem foram identificadas por animal, dia e hora, pesadas e secas em estufa com circulação forçada de ar (55°C). As amostras de forragem, fezes e concentrado foram moídas a 2 mm para quantificação da FDN_i e a 1 mm para quantificação dos demais componentes, seguindo metodologia descrita por Detmann et al. (2012). Após secagem e moagem, elaborou-se uma amostra composta por animal em cada período experimental.

Nas amostras de forragem, fezes e do concentrado foram quantificados os teores de MS (método INCT-CA G-003/1), PB (método INCT-CA 17 N-001/1), extrato etéreo (EE, método INCT-CA G-004/1), material mineral (MM, método INCT-CA M-001/1), fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN_{cp}, método INCT-CA F-002/1), o teor de FDN_i (método INCT-CA F-009/1), foi obtido pela incubação de amostras em sacos F57 (Ankom®) *in situ* por 288 horas como descrito por Valente et al. (2011) para forragens tropicais. A concentração de dióxido de titânio nas fezes foi estimada por colorimetria (Titânio, INCT-CA M-007/1), com base na razão entre o fornecido e sua concentração na amostra fecal.

As quantificações de creatinina, AU e U (urina e soro) foram, respectivamente, por métodos cinético colorimétrico, enzimático colorimétrico e por cinético de tempo fixo, utilizando-se o equipamento automático para bioquímica, marca Mindray, modelo: BS200E, no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. A análise de AL foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Chen e Gomes (1992), no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

A quantificação do NU seguiu mesma técnica descrita para PB, descrita anteriormente. A concentração de N amoniacal no rúmen (NAR) foi estimada por colorimetria (método INCT-CA N-006/1).

Cálculos

A MSpd foi estimada conforme Paulino et al. (2008): $MSpd = 0,98 \times (100 - FDN) + (FDN - FDNi)$.

A excreção de MS fecal foi estimada baseada na relação entre a quantidade de indicador fornecido e sua concentração no material fecal *MS fecal excretada* ($\frac{kg}{dia}$) =
$$\frac{\text{Dioxido de titânio fornecido (g)}}{\text{concentração de dioxido de titânio nas fezes } (\frac{g}{kg})} \times 100$$

A quantificação dos carboidratos não fibrosos (CNF) foi realizada de acordo com Detmann e Valadares Filho (2010):

$$CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ da ureia} + \% \text{ de ureia}) + \% FDN_{cp} + \%EE + \%MM].$$

Para estimar os nutrientes digestíveis totais (NDT) utilizou-se a equação:

$NDT = \%PB \text{ dig} + \%FDN_{cp} \text{ dig} + \%CNF \text{ dig} + \%EE \text{ dig} \times 2,25$ onde dig significa digerido.

A ingestão de MS total foi obtida pela equação *Ingestão de MS total* =
$$\frac{Fdni \text{ fecal } (\frac{g}{d}) - FDNi \text{ do suplemento } (\frac{ing}{d})}{Fdni \text{ do pasto } (\frac{g}{g})} \times 100$$
, utilizando para base de cálculo a amostra de pasto obtida via simulação de pastejo manual.

Nas amostras de urina, foram calculadas as relações dos DP, AL e AU, NU e NUreia com a creatinina (AL:creatinina, AU:creatinina, NU:creatinina, NUreia:creatinina, respectivamente) por período de quatro horas e nas amostras *spot* de urina. As excreções de creatinina, NU, NUreia e DP na urina foram obtidas multiplicando-se o volume urinário do período da coleta por suas respectivas concentrações, expressas em mmol. O balanço de CN foi obtido pela diferença entre o total de N ingerido e o total excretado nas fezes e urina, a partir da média diária, durante três dias, obtida pela soma dos valores encontrados em cada período de coleta. A concentração de N ureico (NUreia) foi obtida a partir da concentração de ureia multiplicada por 0,467 (percentagem de N na ureia).

As purinas absorvidas (PA) (Y, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de DP (X, mmol/dia), por intermédio da equação:

$$PA = (DP - 0,301 \times PC^{0,75}) / 0,80$$

em que: 0,80 é a recuperação das purinas absorvidas como derivados de purinas e $0,301 \times PC^{0,75}$, a contribuição endógena para a excreção das purinas (Barbosa et al., 2011).

A síntese de CN microbianos no rúmen (Nmic, g/dia) foi calculada em função das PA (mmol/dia), de acordo com Barbosa et al. (2011):

$$N_{mic} = (70 \times PA) / 0,93 \times 0,137 \times 1000$$

em que: 70 é o conteúdo de N de purinas (mg N/mol); 0,137, a relação N purinas:N total nas bactérias; e 0,93, a digestibilidade verdadeira das purinas microbianas.

A ingestão de Sal mineral foi obtida pela equação

$$\text{Ingestão de sal mineral } \left(\frac{g}{dia} \right) = \frac{\text{sal mineral fornecido} - \text{sobras de sal}}{\text{dias do período experimental}}$$

Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento de quadrado latino 5×5 com efeito fixo para tratamento (níveis de suplementação) e efeitos aleatórios para animal e períodos experimentais. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC), adotando limite crítico para o erro tipo I de 0,05.

Para o caso dos consumos e digestibilidade utilizou-se o procedimento MIXED com teste de contrastes ortogonais. Adianta-se que quando os efeitos cúbicos e de quarto grau não forem significativos, não serão apresentados na tabela.

Para o caso específico das amostras de urina correspondentes a intervalos de 4 horas, os dados foram avaliados em esquema de medidas repetidas no tempo, utilizando-se estrutura de (co)variância do tipo simetria composta (Kaps e Lamberson, 2004). A escolha da melhor matriz (co)variância foi baseada no critério de informação de Akaike com correção e graus de liberdade estimados de acordo com o método Kenward-Roger. Quando necessário, as médias foram comparadas usando diferença mínima significativa de Fischer.

Para determinação da comparação entre as amostras obtidas a partir de coleta total de urina, com amostragem a cada quatro horas, versus as amostras *spot* de urina foi realizado utilizando-se os procedimentos MIXED (para os modelos lineares) do SAS 9,4 (SAS Institute, Cary, NC). Onde determinou-se a inclinação (que indica o coeficiente de regressão de uma reta) e o intercepto (indicador do local onde a reta regressora cruza um eixo). Essa inclinação e o intercepto definidos pela relação linear entre duas variáveis (coleta total versus coleta *spot* de urina), permiti a observação de que quando forem significativas, é que há diferença entre as duas formas de coletas estudadas.

A avaliação da adequação da melhor forma de coleta *spot* de urina foi realizada utilizando a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição (QMEP) e a partição do quadrado médio do erro de predição em vício médio, vício sistemático e erro aleatório. Todos os cálculos das estatísticas de avaliação da comparação entre as formas de coleta

estudadas foram realizados utilizando-se o MES - Model Evaluation System (<http://nutritionmodels.tamu.edu/mes.htm>, College Station, TX, USA; Tedeschi, 2006).

Resultados e Discussão

A MSpd observada variou de 1420,35 kg a 644,43 kg por hectare (ha) entre o primeiro e o quinto período experimental, tendo como média 942,89 kg/ha, possibilitando disponibilidade média de 146,6 gMSpd/kg de PC/dia, valor inferior a 215 g/kgPC encontrados por Silva Júnior (2014) em trabalho realizado em condições semelhantes, porém superior aos valores recomendados Paulino et al. (2004) de MSpd, que deve estar entre 40 e 50 gMSpd/kg PC para possibilitar um ótimo desempenho animal. Desta forma, é possível afirmar que não há, por parte da disponibilidade de pasto, restrição ao desempenho animal.

É importante que o animal possa selecionar material forrageiro de maior valor nutritivo (Hodgson, 1990; Euclides et al., 2001), uma vez que a disponibilidade, o consumo e o valor nutritivo da forragem causam grande influência sobre o atendimento das exigências de manutenção e produção e conseqüentemente sobre o ganho de peso do animal (Allen, 1996; Detmann et al., 2003).

O teor de PB do pasto (77,4 g/kg MS (Tabela 1)) está abaixo do recomendado por Sampaio et al. (2009), que é de 100 g/kg MS, para um bom desempenho animal. Porém, superior ao recomendado por Lazzarini et al. (2009), 70 g/kg MS, como valor mínimo para permitir o crescimento microbiano e degradação da fibra dietética.

Efeito linear positivo ($P=0,001$) foi observado sobre o consumo de MS total, com maior média de ingestão para o PC12, devido ao aumento nas quantidades de suplemento (MSs) fornecido aos animais, porém efeito quadrático ($P=0,018$) sobre a ingestão de MS proveniente do pasto (MSp) (Tabela 2), com maior média para o PC3 e menor média no PC12. À medida que se aumentou a quantidade de suplementação, observou-se maior consumo de MS total, porém com redução na ingestão de MSp, o que segundo Paulino et al. (2004, 2006) pode ser explicado pelo efeito associativo de substituição entre suplemento-pasto-consumo, o que acarreta em uma diminuição no consumo de MSp (Reis et al., 2009) e aumento da ingestão de MSs. Para Zin e Garces (2006) valores superiores a 0,8% do PC fornecido na forma de suplementação causam redução no consumo de forragem.

O aumento na ingestão de MS causado pela suplementação se deve ao aumento na ingestão de CN, que servirão para os microrganismos como substrato para que consigam crescer e, assim, aumentar o aproveitamento da fibra, com conseqüente maior

renovação/ingestão do conteúdo ruminal. Contudo, a medida que se aumentou demais a ingestão de suplemento, ocorreu mudanças no padrão fermentativo, principalmente devido ao aumento na ingestão de CNF, que em sua fermentação tendem a causar queda no pH ruminal, o que causa diminuição no aproveitamento da fibra e conseqüentemente menor ingestão de MSp (Van Soest, 1994; Zin e Garces, 2006; Paulino et al., 2008; Reis et al., 2009; Detmann et al., 2014).

A suplementação influenciou a ingestão FDNcp de forma quadrática ($P=0,007$ e $P=0,036$, respectivamente para kg/d e g/kgPC), causado pela substituição do consumo de material forrageiro pelo aumento no consumo de concentrado, material menos fibroso. O maior desafio da suplementação é ter certeza do impacto que esta causará sobre o consumo de forragem e sobre sua digestão, uma vez que a suplementação a pasto tem como objetivo aumentar os coeficientes de consumo e digestibilidade da forragem, para permitir maior desempenho animal.

A maior ingestão de suplemento causou efeito quadrático ($P=0,005$) sobre a ingestão dos NDT e de matéria orgânica digerida, efeito direto do aumento da disponibilidade de nutrientes, da digestibilidade dos constituintes do concentrado e conseqüentemente maior digestibilidade da MS total.

A suplementação causou efeito linear ($P=0,001$) sobre a ingestão de matéria orgânica digerida e quadrático sobre a digestibilidade da FDNcp ($P=0,007$).

A ingestão de MS em relação ao PC, g/kgPC, foi influenciada pelos tratamentos com efeito quadrático ($P=0,004$), com maiores médias para os tratamentos que receberam concentrado. O que demonstra efeito da ingestão de concentrado sobre a ingestão de MS total.

O consumo voluntário de sal mineral não foi afetado pela ingestão de concentrado ($P>0,05$), apresentando média de 77,10 g/dia. Valor superior ao recomendado por Paulino et al. (2006) que é de 60 g/animal/dia. Para McDowell (1999) os suplementos minerais são menos palatáveis que os concentrados e são frequentemente consumidos irregularmente, quando disponibilizados aos animais em pastejo, o que explica a variação nas médias observadas, mesmo não havendo efeito dos tratamentos sobre a ingestão de sal mineral.

Tabela 2. Médias, probabilidade (Valor P) e erro padrão da média (EPM) dos efeitos de tratamento sobre as variáveis de ingestões para bovinos de corte recebendo suplementação durante a época seca do ano

Item	Níveis de suplementação					EPM	Valor P	
	PC0	PC3	PC6	PC9	PC12		Linear	Quadrático
	Ingestão kg/d							
MS	6,59	8,26	9,10	9,06	9,39	0,394	<0,001	0,901
MSp	6,59	7,18	6,98	5,86	5,38	0,411	0,002	0,018
MSs	0	1,08	2,12	3,20	4,01	-	-	-
FDNcp	4,60	5,16	5,36	4,77	4,37	0,296	0,243	0,007
NDT	3,37	4,74	5,96	6,06	6,51	0,258	<0,001	0,005
MOdig	3,14	4,60	5,68	5,68	6,10	0,947	<0,001	0,151
FDNcpdig	0,60	0,59	0,65	0,62	0,60	0,015	0,385	0,007
	Ingestão g/kgPC							
MS	16,60	20,63	23,01	22,80	23,01	1,315	<0,001	0,004
FDNcp	11,55	12,90	13,50	12,00	10,77	0,929	0,174	0,036
	g/dia							
Sal-Mineral mix	78,50	65,50	76,75	70,12	94,62	11,683	0,132	0,564

De matéria seca (MS), MS do pasto (MSp), MS do suplemento (MSs), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), nutrientes digestíveis totais (NDT), matéria orgânica digerida (MOdig) e FDNcp digerida (FDNcpdig). Tratamento: suplemento com 22,21% PB ofertado aos níveis de 0 g/kgPC (PC0), 3 g/kgPC (PC3), 6 g/kgPC (PC6), 9 g/kgPC (PC9) e 12 g/kgPC (PC12).

A suplementação influenciou a NAR e o NUS no período de 24 horas ($P < 0,05$). O PC0, apenas recebendo mistura mineral, não apresentou variação na concentração de NAR e de NUS ($P > 0,05$) (Tabela 3). A medida que se aumentou a ingestão de CN, aumentou-se a NAR e NUS, com maiores médias observadas no PC12. Ao longo do período de 24 horas, as NAR e NUS apresentaram picos quatro horas após a suplementação (12 horas). Maiores variações nessas concentrações foram observadas nos PC12, seguido pelos demais tratamentos. Nos CT das 4 e 8 horas, não foi observado efeito ($P > 0,05$) da suplementação sobre a NAR e NUS.

Tabela 3. Médias e probabilidades (Valor P) do efeito de tratamento sobre o pool de nitrogênio amoniacal no rúmen (NAR) e nitrogênio no soro (NUS) sobre efeito da hora de coleta.

HORA	Tratamento					Valor P ¹
	PC0	PC3	PC6	PC9	PC12	
NAR (mg/100 mL)						
12	7,16C	9,49bB	11,86bB	15,84bB	19,33aA	<0,001
16	9,53D	15,53aC	26,31aB	31,40aB	40,93aA	<0,001
20	7,39C	8,60bC	11,73bC	20,31bA	17,85aB	<0,001
0	6,76B	7,21bB	10,21bB	12,84cB	17,05aA	<0,001
4	5,69	7,66b	8,33b	11,16c	11,56c	0,102
8	8,33	9,36b	11,46b	12,35c	14,59b	0,172
Valor P ²	0,091	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	EPM=2,015
NUS (mg/100 mL)						
12	14,44C	15,31bB	16,14cB	18,9cB	20,15aA	<0,001
16	15,1D	19,21aC	21,56aB	23,73bB	27,74aA	<0,001
20	15,31C	18,08aB	20,67bB	26,01aA	29,06aA	<0,001
0	14,31B	15,31bB	17,49cB	23,08bA	24,56aA	<0,001
4	14,02	14,62b	15,84c	20,13c	20,84c	0,124
8	14,75	14,29b	17,86c	19,04c	20,87c	0,209
Valor P ²	0,092	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	EPM=1,895

*Médias na mesma coluna seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$). Médias na mesma linha seguida por letras maiúsculas diferentes, são diferentes entre si ($P < 0,05$). ¹Efeito de tratamento dentro da hora de coleta; ²Efeito da hora de coleta dentro de tratamento. Tratamento: suplemento com 22,21% PB ofertado aos níveis de 0 g/kgPC (PC0), 3 g/kgPC (PC3), 6 g/kgPC (PC6), 9 g/kgPC (PC9) e 12 g/kgPC (PC12).

No presente trabalho, o horário de pico (16 horas) da concentração de NAR, observado devido a suplementação, e nos horários das 12, 20 horas (PC9) e 12, 20 e 0 horas (PC12) atingiram valores semelhantes ou superiores aos recomendados por Detmann et al. (2009), que, ao realizarem algumas observações em regiões tropicais, têm indicado que, para que haja maximização do aproveitamento da fibra pelos microrganismos e aumento da ingestão de forragens tropicais, a concentração de NAR deve estar em torno de 15 mg/dL.

O desempenho dos microrganismos celulolíticos no rúmen está intrinsicamente ligado à qualidade e quantidade dos compostos fibrosos e de N não proteico. A concentração média de NAR encontrada nesse trabalho para animais mantidos em pastejo recebendo somente suplementação mineral (PC0) foi de 7,48 mg/dL, valor superior ao recomendado pelo NRC (1996) de 5 mg/dL no líquido ruminal para permitir a efetiva digestão da matéria orgânica (MO).

A alta ingestão de CN na forma de ureia permite aumento da disponibilidade de N ruminal, e a taxa da síntese de amônia sendo maior que a utilização pelos microrganismos (Santos e Pedroso, 2011), seja por ineficiência na utilização desta pelos microrganismos ou por excesso, características ligadas ao alimento ou pH do meio, promovem aumento na concentração sérica de ureia.

A concentração de NUS tem sido utilizada para obtenção de maiores informações sobre o perfil nutricional para ruminantes (Chizzotti et al., 2007) permitindo diagnosticar a utilização de CN em função da disponibilidade de NDT no rúmen (Sampaio et al., 2009). Neste trabalho, apenas em horários pontuais no PC0 (12, 0, 4 e 8 horas) e no PC3 (4 e 8 horas) observaram-se valores entre 13,52 e 15,15 mg/dL de NUS, valores recomendados por Valadares et al. (1997), uma vez que é nessas concentrações de NUS, que observa-se melhor eficiência na utilização da proteína pelos microrganismos quando os animais são alimentados com 62,5% de NDT. As demais médias observadas são superiores a estes valores, o que pode indicar que houve alta metabolização de amônia pelo rúmen, absorção e metabolização desta pelo fígado à ureia e assim excreção de compostos nitrogenados pela urina.

A ingestão de N foi influenciada linearmente ($P < 0,05$), causado pelo aumento na ingestão de suplemento (Tabela 2), o que possibilitou aumento ($P = 0,001$) na ingestão de CN (Tabela 4), apresentando maior média para o PC12 e menor para o PC0.

A suplementação causou efeito linear crescente ($P = 0,001$) sobre as excreções de N através das fezes e da urina (NU e UreiaN, em g/d e mmol), principal via de excreção em mamíferos, uma vez que a excreção de CN está ligada diretamente a ingestão de N (Van Soest, 1994).

A relação UreiaN:NU não foi influenciada pelos tratamentos ($P > 0,05$), demonstrando haver uma constância na quantidade de NU excretada na urina na forma de UreiaN. Estes dados corroboram com Silva Júnior (2014), que ao trabalhar com novilhas Nelore mantidas a pasto recebendo diferentes fontes de suplementação proteica

também não encontrou efeito de tratamento sobre a relação UreiaN:NU, ao realizar coleta total de urina durante cinco dias consecutivos com amostragem a cada 4 horas.

O N retido (RN), em g/dia, apresentou efeito quadrático ($P=0,002$) com maior média para o PC12 e menor para o PC0. Em dietas deficientes em N, o animal reduz a excreção de CN e conseqüentemente aumenta a reciclagem de N no ambiente ruminal (Hennessy e Nolan, 1988), o que subsidia um aporte de N para utilização pelos microrganismos para síntese de PB microbiana. Para Detmann et al. (2014), a retenção de N é reflexo da eficiência de uso de todos os substratos envolvidos na síntese de tecidos (musculo, órgãos) e produtos (leite, ganho de peso), o que corrobora, por sua vez, com Alves et al. (2014), que afirmam que maiores retenções indicam melhor utilização do N dietético possibilitando maiores ganhos de peso.

As excreções de AL, AU e DP, em mmol (Tabela 4), apresentaram efeito linear ($P=0,001$) devido a suplementação. A síntese de N microbiano (NM) em g/dia também apresentou efeito linear ($P=0,001$). Para Fu et al. (2001) a demanda de proteína de um animal pode ser definida como o menor nível de ingestão protéica da dieta, a qual irá equilibrar as perdas de N. Apesar da variação nas dietas experimentais, não se observou RN negativo, permitindo inferir que a ingestão de N a partir do pasto, foi suficiente para atender as demandas de manutenção do animal, uma vez que manteve concentração de NAR acima da mínima recomendada pelo NRC (1996) (Tabela 3).

O volume urinário não sofreu efeito de tratamento, dia de coleta (CD) e período de coleta (CT) ($P>0,05$) e nem de suas interações ($P>0,05$) (Tabela 5), apresentando excreção média de 1,29 litros a cada 4 horas. A excreção de creatinina (mg/kg PC) (Tabela 5) ou em mmol (Tabela 6) também não foi afetada ($P>0,05$) pelos tratamentos, CD e CT, bem como suas interações, apresentando média de 3,84 mg/kg PC e 13,12 mmol, respectivamente, a cada 4 horas. Uma vez que a creatinina é originária do metabolismo muscular, sua síntese e conseqüente excreção é diretamente relacionada ao metabolismo deste tecido (Schutte et al., 1981).

Tabela 4. Médias, erro padrão da media (EPM) e probabilidade (Valor P) do efeito de tratamentos sobre as variáveis de balanço de nitrogênio, ingestão de nitrogênio (NI), excreção de nitrogênio fecal (FeN), N urinário (NU), nitrogênio ureia na urina (UreaN), taxas UreaN:NU, N retido (RN), excreções de alantoina (AL), ácido úrico (UA) e derivados de purinas (DP), e síntese de nitrogênio microbiano (MN).

	Tratamentos ¹					EPM	Valor P	
	PC0	PC3	PC6	PC9	PC12		Linear	Quadrático
NI (g/d)	32,5e	85,8d	122c	164b	202a	5,81	<0,001	0,654
FeN (g/d)	20,8e	34,8d	53,6c	70,4b	86,7a	4,58	<0,001	0,412
NU (g/d)	9,86e	40,4d	47,7c	63,8b	89,1a	4,14	<0,001	0,112
NU (mmol/d)	564c	664b	687b	854a	931a	192,8	<0,001	0,253
UreaN (g/d)	6,73e	29,9d	32,7c	43,3b	64,0a	3,42	<0,001	0,209
UreaN (mmol/d)	327c	469b	434b	544b	805a	205,5	<0,001	0,099
UreaN:NU	0,68	0,72	0,70	0,68	0,72	0,049	0,932	0,876
RN (g/d)	1,77d	10,7c	21,3b	30,2a	26,3ab	2,63	<0,001	0,002
AL (mmol/d)	88,4c	91,2c	108,0b	111,3b	129,2a	59,01	<0,001	0,824
UA (mmol/d)	7,02c	7,68c	8,82b	10,9b	12,8a	4,45	<0,001	0,843
PD (mmol/d)	95,4c	98,9c	116,8b	122,2b	142a	46,34	<0,001	0,354
MN (g/d)	49,6b	64,7b	76,5ab	86,6a	98,1a	49,15	0,017	0,126

*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes, são diferentes entre si (P<0,05). Tratamento: suplemento com 22,21% PB ofertado aos níveis de 0 g/kgPC (PC0), 3 g/kgPC (PC3), 6 g/kgPC (PC6), 9 g/kgPC (PC9) e 12 g/kgPC (PC12).

A excreção de creatinina por dia foi de $23,01 \pm 0,19$ ($22,82 - 23,2$) mg/kgPC, sendo semelhante a encontrada por Silva Júnior (2014), que foi de 23,03 mg/kgPC ao trabalhar em pastagem, condições semelhantes às realizadas nesse experimento. A ausência de efeito de tratamento está de acordo com Thakshala Seresinhe e Jayasuriya (2004), que ao estudarem a excreção de DP em zebuínos, observaram que não há influência dos componentes da dieta sobre a excreção de creatinina. A ausência do efeito de CD e CT sobre a excreção diária de creatinina está de acordo com observações descritas por Valadares et al. (1997), que, em confinamento, não encontraram diferenças nas excreções de creatinina obtidas durante 12, 24, 48 ou 72 horas de coleta. Assim, não havendo variação na excreção de creatinina em função de tratamento, CD e CT de obtenção da amostra, permite-se inferir que uma amostra obtida com coleta total de urina durante um período de 4 horas, pode ser realizada para estimativa do volume urinário, corroborando com Silva Júnior (2014), que encontrou resultados semelhantes.

Em experimentos com animais a realização de períodos mais curtos de coleta de urina são altamente desejáveis, uma vez que assim permite-se a redução do tempo experimental e, conseqüentemente do custo e desconforto animal.

Como descrito anteriormente, a excreção de AL, AU e DP, em mmol, foi influenciada unicamente pelos tratamentos ($P < 0,05$) (Tabela 4), não sendo influenciado pelos CD, CT ou suas interações ($P > 0,05$) (Tabela 6). A excreção de DP média por dia foi de 115,05 mmol, valor superior ao reportado por Barbosa et al. (2006), que foi de 70,57 mmol/dia, ao avaliarem o efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes proteicas sobre a excreção de DP. Para Yu et al. (2002), entre outros fatores que influenciam as excreções de AL, AU e conseqüentemente de DP, estão as fontes e a disponibilidade de proteína dietética e energia.

As relações urinárias entre AL, AU e DP com a creatinina, não foram influenciadas pelas variáveis estudadas (CD, CT, tratamentos e suas interações) ($P > 0,05$), apresentando média de excreções de 1,36 para AL:creatinina, 0,121 para AU:creatinina e 1,48 para PD:creatinina. Esses resultados confirmam os obtidos por Chen et al. (1995), que agruparam as amostras em seis períodos de 4 horas, e não obtiveram diferenças entre as relações das concentrações de DP:creatinina em função do tempo, em ovinos; e por Pereira (2009) que avaliou o efeito da hora da coleta de urina sobre a relação DP:creatinina, em novilhas Nelore, em confinamento, de duas em duas horas e não

Tabela 5. Médias ajustadas para volume urinário e excreção de creatinina (Cre) em função do período de coleta (CT), por 4 horas, e probabilidade (Valor P) e desvio padrão da média (sxy) para os efeitos dos dias de coleta (CD), CT, tratamentos (Tre) e suas interações em bovinos de corte mantidos a pasto.

		Período de Coleta							
		0h00-4h00	4h00-8h00	8h00-12h00	12h00-16h00	16h00-20h00	20h00-24h00		
Volume urinário (L)		1,16	1,12	1,19	1,62	1,51	1,15		
Cre (mg/kg PC)		3,81	3,75	3,72	3,91	3,99	3,84		
		Valor P (efeitos)							
		CD	CT	Tre	CD x Tre	CT x Tre	CD x CT	CD x CT x Tre	sxy
Volume urinário (L)		0,105	0,330	0,200	0,142	0,191	0,479	0,500	0,425
Cre (mg/kg PC)		0,459	0,326	0,707	0,150	0,577	0,632	0,692	0,502

Tabela 6. Médias ajustadas para excreção de creatinina (Cre), alantoina (AL), ácido úrico (UA) e derivados de purinas (DP), em mmol, e as relações AL:Cre, UA:Cre e PD:Cre em função do período de coleta (CT), por 4 horas, e seus valores de probabilidade (Valor P) e desvio padrão da média (sxy) sobre efeitos dos dias coleta (CD), CT e tratamentos (Tre).

	Período de coleta							
	0h00-4h00	4h00-8h00	8h00-12h00	12h00-16h00	16h00-20h00	20h00-24h00		
Cre (mmol)	12,95	13,10	12,83	13,18	13,49	13,17		
AL (mmol)	18,30	18,26	17,76	17,55	17,56	17,51		
UA (mmol)	1,71	1,55	1,38	1,62	1,58	1,67		
PD (mmol)	20,01	19,81	19,14	19,17	19,14	19,18		
AL:Cre	1,41	1,39	1,38	1,33	1,30	1,33		
UA:Cre	0,132	0,118	0,107	0,123	0,117	0,127		
PD:Cre	1,54	1,51	1,49	1,45	1,42	1,46		
	Valor P							
	CD	CT	Tre	CD x Tre	CT x Tre	CD x CT	CD x CT x Tre	sxy
Cre (mmol)	0,487	0,395	0,352	0,683	0,635	0,202	0,881	0,409
AL (mmol)	0,240	0,632	<0,001	0,108	0,090	0,808	0,214	9,983
UA (mmol)	0,994	0,160	<0,001	0,126	0,472	0,934	0,710	0,741
PD (mmol)	0,278	0,645	<0,001	0,108	0,098	0,843	0,202	9,711
AL:Cre	0,121	0,171	0,190	0,089	0,264	0,762	0,162	0,475
UA:Cre	0,901	0,278	0,121	0,152	0,644	0,946	0,346	0,054
PD:Cre	0,138	0,204	0,210	0,086	0,270	0,800	0,134	0,501

encontrou diferença significativa para o período de coleta sobre a relação DP:creatinina; e por Silva Júnior (2014) que ao avaliar o efeito de dias e períodos de coleta total de urina, com amostragem a cada 4 horas, em novilhas Nelore mantidas a pasto, recebendo diferentes fontes e quantidades de nitrogênio suplementar, também não observou efeito de tratamento sobre as relações AL:creatinina, AU:creatinina e PD:creatinina.

Desta forma, devido à ausência de efeito ($P > 0,05$) de tratamento, CD, CT sobre as relações AL:creatinina, AU:creatinina e DP:creatinina, permite-se inferir que uma única coleta de urina obtida em um período de 4 horas, estima adequadamente a excreção dos DP na urina, o que permite estimar a síntese de proteína microbiana.

Além do efeito de tratamento sobre a excreção de NU e UreiaN (Tabela 4), a excreção de CN na urina foi influenciada ($P < 0,05$) também pelos CT (Tabela 7). A excreção urinária de NU e UreiaN não diferiu entre períodos de coleta para PC0 e PC3 ($P > 0,05$). Entretanto para os PC6, PC9 e PC12 foram influenciados ($P < 0,05$) pelo CT.

O PC6 apresentou maiores médias de excreção nos horários 0:00h-4:00h, 12:00h-16:00h, 20:00h-24:00h, e 16:00h-20:00h que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$). O PC9 apresentou maiores médias de excreção de NU para os horários 16:00h-20:00h, 20:00h-24:00h, 12:00h-16:00h e 0:00h-04:00, diferindo ($P < 0,05$) dos horários 0:00h-4:00h e 4:00h-8:00h, que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$), e que apresentaram as menores médias ($P < 0,05$). O PC12 apresentou maiores excreções nos horários 20:00h-24:00h e 12:00h-16:00h, seguido pelos horários 0:00h-4:00h e 16:00h-20:00h, que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$) diferindo dos horários 4:00h-8:00h e 8:00h-12:00h, também semelhantes entre si ($P > 0,05$).

O PC6 apresentou maiores médias de excreção de UreiaN para os CT 0:00h-4:00h, 12:00h-16:00h e 20:00h-24:00h que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$). Ao se realizar fornecimento do PC9, observou-se maior excreção de UreiaN no CT 16:00h-20:00h, seguido pelos CT 20:00h-24:00h, 0:00h-4:00h, 4:00h-8:00h e 12:00h-16:00h que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$), sendo o horário 8:00h-12:00h o que apresentou as menores médias de excreção de N na forma de UreiaN. A excreção de UreiaN para o PC12 foi superior para os CT 16:00h-20:00h e 20:00h-24:00h, diferindo ($P < 0,05$) dos CT 12:00h-16:00h e 0:00h-4:00h que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$), seguido pelo CT 4:00h-8:00h, que por sua vez diferiu ($P < 0,05$) do CT 8:00h-12:00h que apresentou as menores médias de UreiaN excretado.

A excreção de CN na urina está relacionada aos teores de ureia e/ou do teor de PB das dietas e quantidades ingeridas (Valadares et al., 1997; Moraes, 2003). Observa-se que

ao haver aumento na quantidade de N ingerida (Tabela 4) influenciados pelos níveis de suplementação, resultou em maiores concentrações de NAR e NUS (Tabela 3) nos horários das coletas (12, 16, 20 e 0 horas), e que a excreção de NU e UreiaN aumentou a medida que a ingestão de CN aumentou, demonstrando que houve uma maior excreção de CN a partir de um maior consumo de PB.

O excesso de NAR é absorvido pela circulação portal e detoxificado a ureia pelo ciclo da ornitina no fígado, com gasto de energia (Visek, 1984; Russell et al., 1992; Van Soest, 1994). Essa molécula de ureia pode retornar ao rúmen através da parede ruminal e ou saliva, quando a concentração de N na dieta diminui (Valkeners et al., 2006). Contudo, havendo maior ingestão de N na dieta, com conseqüente picos na produção e concentração sérica de UreiaN, ocasionaram maior quantidade de UreiaN filtrada pelos rins e, assim, haverá aumento na excreção de CN na urina (Russell et al., 1992; Rocha et al., 2016).

As relações NU:creatinina e UreiaN:creatinina na urina não apresentaram efeito ($P>0,05$) de tratamento, CD e CT (Tabela 7), bem como suas interações, embora a excreção de CN na urina tenha apresentado diferença para tratamentos e CT ($P<0,05$) (Tabela 7). Desta forma, a sugestão da obtenção de uma única amostra de urina obtida por coleta total de 4 horas, não permite estimar adequadamente a excreção de CN na urina, corroborando com os resultados de Silva Júnior (2014).

A avaliação comparativa da excreção de creatinina observada nas amostras obtidas a partir da coleta total de urina, a cada 4 horas por 3 dias com as amostras *spot* de urina obtidas em momentos pontuais (às 12, 16, 20, 0, 4 e 8 horas) (Tabela 8), demonstrou não haver diferença ($P>0,05$) entre as duas formas de coleta estudadas. Logo, permite inferir que a creatinina estima adequadamente o volume urinário em bovinos mantidos em pastejo.

Tabela 7. Médias ajustadas para nitrogênio urinário (NU), excreção de nitrogênio ureia na urina (UreiaN), em mmol, e as relações com a creatinina (Cre), NU:Cre e UreiaN:Cre, em função dos períodos de coleta (CT), por 4 horas, e seus valores de probabilidade (Valor P) e desvio padrão da média (sxy) para os efeitos de dia de coleta (CD), CT e tratamentos (Tre) e suas interações.

	Período de coleta						Valor P
	0h00-4h00	4h00-8h00	8h00-12h00	12h00-16h00	16h00-20h00	20h00-24h00	
	NU						
PC0	532	550	524	623	611	545	0,097
PC3	677	603	643	715	667	683	0,244
PC6	779a	615b	627b	734a	655ab	710a	<0,001
PC9	808a	790b	669b	840a	1048a	965a	<0,001
PC12	980b	790c	773c	1006a	956b	1081a	<0,001
	UreiaN						
PC0	319	368	297	291	371	317	0,127
PC3	464	448	434	497	482	486	0,442
PC6	481a	374b	423b	469a	407b	448a	<0,001
PC9	542b	532b	377c	514b	699a	601b	<0,001
PC12	802b	694c	622d	813b	1038a	907a	<0,001
	NU:Cre						
PC0	42,7	42,6	42,0	49,7	46,1	43,9	0,124
PC3	51,0	46,7	48,6	49,5	47,7	50,4	0,234
PC6	57,7	48,4	47,0	55,1	49,4	49,4	0,091
PC9	59,3	57,7	51,9	60,3	77,2	72,5	0,102
PC12	73,4	63,7	59,1	74,2	68,5	82,5	0,081
	UreiaN:Cre						
PC0	22,5	28,4	23,9	23,3	28,4	25,2	0,223
PC3	34,9	33,2	32,7	34,5	33,8	35,8	0,342
PC6	35,8	29,5	31,5	35,2	30,7	31,5	0,098
PC9	39,6	39,4	29,4	36,6	51,7	45,0	0,081
PC12	59,7	52,3	47,9	59,8	72,0	70,0	0,090

	Valor P (efeitos)							sxy
	CD	CT	Tre	CD x Tre	CT x Tre	CD x CT	CD x CT x Tre	
NU	0,192	<0,001	<0,001	0,253	0,194	0,920	0,628	20,554
NUrea	0,894	<0,001	<0,001	0,309	0,750	0,744	0,514	19,286
NU:Cre	0,201	0,117	0,430	0,271	0,173	0,927	0,776	16,131
NUrea:Cre	0,932	0,398	0,530	0,185	0,122	0,787	0,342	13,433

*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes, são diferentes entre si (P<0,05). Tratamento: suplemento com 22,21% PB ofertado aos níveis de 0 g/kgPC (PC0), 3 g/kgPC (PC3), 6 g/kgPC (PC6), 9 g/kgPC (PC9) e 12 g/kgPC (PC12).

A observação das relações AL:creatinina e AU:creatinina, nos métodos de coleta avaliados neste estudo, possibilitou a observação de que não houve variação ($P>0,05$) (Tabela 8) entre as amostras obtidas na forma de coleta total ou *spot* de urina.

Tabela 8. Intercepto, inclinação, desvio padrão (sxy) and Valor P da correlação entre as amostras de urina obtidas por coleta total a cada 4 horas (CT) e a coleta *spot* de urina.

	CT	Intercepto	Valor P	Inclinação	Valor P	Sxy
Cre	12	15.101	0.156	0.882	0.079	7.569
	16	4.644	0.629	0.972	0.671	6.840
	20	5.381	0.478	0.966	0.502	5.855
	0	5.790	0.334	1.043	0.267	4.602
	4	11.441	0.307	0.906	0.206	9.097
	8	12.297	0.157	0.924	0.158	5.666
	AL:Cre	12	0.000	0.946	1.013	0.724
16		0.000	0.313	0.993	0.282	0.002
20		0.003	0.310	0.969	0.314	0.003
0		0.068	0.541	0.585	0.689	0.183
4		0.002	0.668	0.977	0.577	0.005
8		0.014	0.341	0.863	0.315	0.017
AU:Cre		12	0.002	0.146	0.881	0.224
	16	0.002	0.373	0.853	0.346	0.004
	20	0.009	0.182	0.343	0.228	0.009
	0	0.001	0.332	0.875	0.287	0.023
	4	0.001	0.283	0.890	0.216	0.211
	8	0.000	0.634	0.978	0.793	0.194
	NU:Cre	12	0.038	0.891	1.006	0.866
16		0.050	0.850	1.008	0.823	0.282
20		0.196	0.518	1.024	0.535	0.323
0		1.310	0.077	0.822	0.036	0.673
4		0.317	0.675	0.402	0.442	0.793
8		0.116	0.680	0.996	0.924	0.313
UreiaN:Cre		12	0.048	0.864	0.984	0.758
	16	0.078	0.741	0.979	0.491	0.239
	20	0.261	0.344	0.956	0.374	0.413
	0	0.647	0.039	1.104	0.012	0.307
	4	0.451	0.151	0.901	0.063	0.428
	8	0.055	0.827	0.990	0.828	0.412

Creatinina (Cre) e as suas relações com alantoína (AL:Cre), ácido úrico (AU:Cre), nitrogênio urinário (NU:Cre) e nitrogênio ureia na urina (NUrea:Cre).

Esses resultados corroboram com Chen et al. (1995), que ao avaliarem a variação diurna das relações entre as concentrações de DP e creatinina em ovinos submetidos a

diferentes frequências de fornecimento de alimento, não observaram diferenças para tratamentos e CT, concluindo que uma amostra de urina coletada em qualquer horário do dia (*spot*) poderia ser utilizada para a estimativa da excreção diária de DP na urina. E também, com Valadares et al. (1999), Rennó et al. (2000), Oliveira et al. (2001) e Pereira (2009), que ao compararem a excreção de DP obtidos em coleta total de urina durante 24 horas e os estimados, utilizando a concentração de creatinina nas amostras *spot*, não observaram diferença entre as duas metodologias de coleta. Assim, sugere-se então que a amostragem realizada na forma de coleta *spot* de urina, obtida em qualquer horário do dia, estima adequadamente a excreção de DP. É de grande importância a obtenção de amostras que representem bem o metabolismo animal, principalmente para animais mantidos em pastejo, que possuem uma maior variedade de fatores que possibilitam mudanças nutricionais e produtivas, quando comparados com animais mantidos em confinamento.

Na análise das relações NU:creatinina e UreiaN:creatinina (Tabela 8), observou-se que os horários das amostras obtidas às 4, 8, 12, 16 e 20 horas, foram similares a coleta total de urina com amostragem a cada 4 horas ($P > 0,05$). Entretanto, no horário da meia noite (amostragem 20h00-24h00, coleta total/0 hora, coleta *spot* de urina), observou-se variação na excreção de NU (inclinação, $P = 0,03$) e de UreiaN (inclinação, $P = 0,01$; e intercepto, $P = 0,03$), indicando que coletas *spot* de urina realizadas neste horário, não representariam a excreção de CN ao longo do período de 24 horas.

Uma vez que a inclinação determina o coeficiente de regressão da reta determinada pela comparação entre as duas técnicas de obtenção da amostra e o intercepto indica o ponto onde essa reta cruza o eixo. A inclinação e o intercepto definidos pela relação linear entre duas variáveis (coleta total *versus* coleta *spot* de urina), permitiu determinar que quando estas duas (inclinação e intercepto), ou apenas uma delas, forem significativas, existe diferença entre as duas formas de coletas estudadas.

Com base nos resultados, observa-se que a excreção de CN varia de acordo com o tratamento e com o CT (Tabela 7), principal fator que pode levar a erros amostrais. Uma vez que esta variação na excreção de CN não permite que uma única amostra de coleta total de urina por 4 horas fosse suficiente para estimar a excreção de CN na urina, uma única coleta *spot* de urina pode ser algo que necessite de maior atenção, quando se objetiva estudar a excreção de CN na urina. Assim, a obtenção de duas amostras na forma *spot* de urina seria mais adequada.

Tabela 9. Médias ajustadas para as relações da alantoína (AL), ácido úrico (UA), nitrogênio urinário (NU) e nitrogênio ureia na urina (UreiaN) com a creatinina (Cre), AL:Cre, UA:Cre, NU:Cre e UreiaN:Cre, em mmol, e o intercepto, coeficiente de regressão (slope), desvio padrão (sxy), Valor P, quadrado médio de predição de erros (QMPE), e a percentual absoluta e de decomposição das correlações entre as amostras de urina obtidas por coleta total a cada 4 horas e a média de duas amostras spot de urina.

	CT	Média	Intercepto	Valor P	Inclinação	Valor P	Sxy	QMPE	Decomposição percentual		
									MB	UV	UC
AL:Cre	8/12	1,40	0,029	0,454	0,944	0,580	0,012	0,00084	0,051	3,348	96,601
	8/16	1,41	0,023	0,906	0,926	0,492	0,013	0,00024	3,313	5,590	93,097
	12/16	1,46	0,032	0,590	0,878	0,328	0,015	0,00032	0,362	2,777	96,861
AU:Cre	8/12	0,113	0,008	0,227	0,973	0,736	0,008	0,00016	4,654	43,881	50,302
	8/16	0,121	0,006	0,690	0,982	0,489	0,003	0,00003	2,429	0,910	96,661
	12/16	0,114	0,012	0,981	1,006	0,699	0,007	0,00014	7,956	0,126	91,918
NU:Cre	8/12	53,4	0,031	0,880	1,002	0,928	0,236	0,13851	6,645	1,799	91,455
	8/16	53,3	0,035	0,864	1,001	0,946	0,223	0,12337	6,249	3,199	90,552
	12/16	57,8	0,042	0,867	1,006	0,842	0,281	0,12259	0,512	0,087	99,402
UreiaN:Cre	8/12	39,9	0,007	0,975	0,987	0,769	0,368	0,06210	2,400	0,180	97,421
	8/16	38,5	0,001	0,995	0,987	0,707	0,288	0,06146	1,931	0,002	98,067
	12/16	36,9	0,072	0,737	0,979	0,561	0,292	0,08226	0,001	0,729	99,271

*CT: Período de coleta.

A combinação da média de duas amostras *spot* de urina *versus* a amostra de urina obtida via coleta total, com amostragem a cada 4 horas, demonstrou não haver diferença ($P>0,05$) entre as duas formas de coleta estudadas (Tabela 9). Com base nesta análise, observa-se que as amostras obtidas nos horários das 8 e 16 horas, demonstraram menor variação no quadrado médio dos erros de predição (QMEP) nas variáveis AL:creatinina (QMEP=0,00024), AU:creatinina (QMEP=0.00003) e UreiaN:creatinina (QMEP=0,06146) em relação a coleta total de 4 horas, demonstrando garantir, assim, uma maior precisão nos resultados, quando as coletas *spot* de urina são realizadas nestes horários. Contudo, para a variável NU:creatinina observou-se o resultado de menor variação (QMEP=0.12259) na combinação de amostras obtidas nos horários das coletas realizadas às 12 e 16 horas. Pela proximidade entre os valores de QMEP nos horários das 8 e 16 horas com o das 12 e 16 horas (QMEP=0,12337, na amostra das 8 e 16 horas), e o fato das outras três variáveis estudadas terem coincidido com o horário das 8 e 16 horas, recomenda-se a realização de coletas *spot* de urina 4 horas antes e 4 horas após o fornecimento de suplementação (realizada às 12 horas neste experimento) para bovinos em pastejo.

Os horários para combinação de amostras *spot* de urina foram escolhidos baseados na ausência dos efeitos avaliados sobre as relações dos DP:creatinina ($P>0,05$), nas duas formas de obtenção das amostras de urina aqui estudadas, além da ausência de efeitos diurnos sobre as relações dos CN:creatinina e pela facilidade da realização da coleta durante o dia, o que possibilitaram a combinação de duas amostras de urina obtidas durante os horários diurnos.

Faz-se importante ressaltar que a demanda de realização de duas coletas *spot* de urina se faz necessária apenas quando objetiva-se estudar simultaneamente a excreção de DP e CN. Para o estudo apenas da excreção de DP não se faz necessário, uma vez que não apresentaram efeito de tratamento e CT, demonstrado que uma única amostra *spot* de urina obtida em qualquer horário do dia é suficiente para estimar a excreção de AL e AU.

Conclusão

A excreção de creatinina é constante em 24h e estima adequadamente o volume urinário em bovinos mantidos em pastejo.

Uma única amostra *spot* de urina obtida no pasto, em qualquer horário do dia, pode ser usada para estimar a excreção de derivados de purinas. Para a estimativa da excreção de compostos nitrogenados na urina são necessárias duas amostras *spot* de urina, 4 horas antes e após a suplementação, em bovinos em pastejo.

Referências bibliográficas

Allen, M. S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forage by ruminants. *Journal of Animal Science*. 66:2959-2964.

Alves, E. V.; Magalhães, E. R.; Freitas, M. A.; Santos, E. J.; Pereira, M. L. A.; Pedreira, M. S. 2014. Nitrogen metabolism and microbial synthesis in sheep fed diets containing slow release ureia to replace the convencional urea. *Acta Scientiarum. Animal Science*. 36:55-62.

ASSOCON. 2012. Levantamento sobre o Sistema de produção em confinamento no Brasil, Disponível em: <http://pt.slidshare.net/Beefpoint/assocon-censo-2012>, Acessado em: 15/07/2016.

Barbosa, A. M.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Verás, R. M. L.; Leão, M. I.; Detmann, E.; Paulino, M. F.; Marcondes, M. I.; Souza, M. A. 2006. Effect of urinary collection days, concentrate levels and protein sources on creatinine, urea and purine derivatives excretions and microbial protein synthesis in Nellore cattle. *Rev. Bras. Zootec*. 35:870-877.

Barbosa, A. M.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Pina, D. S.; Detmann, E.; Leão, M. I. 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in Nellore cattle. *Journal of Animal Science*. 89:510-519.

Chen, X. B.; Gomes, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivates – on overview of technical details. Buscksburnd: Rowett Research Institute. International Feed Resources Unit, (Occasional publication). 21p.

Chen, X. B.; Grubic, G.; Ørskov, E. R.; Osuji, P. 1992. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. *Animal Production*. 55:185-191.

Chen, X. B.; Mejia, A. T.; Kyle, D. J.; Ørskov, E. R. 1995. Evaluation of the use of the purine derivative:creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. *Journal of Agricultural Science*. 125:137–143.

Chen, X. B.; Jayasuria, M. C. N.; Makkar, H. P. S. 2004. Measurement and application of purine derivatives: Creatinine ration in spot urine samples of ruminants. In: *Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives*. Editores: Makkar, H. P. S.; Chen, X. B. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 167–179.

Chizzotti, M. L.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Chizzotti, F. H. M.; Marcondes, M. I.; Fonseca, M. A. 2007. Consumo, digestibilidade e excreção de úreia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36:138-146.

Chizzotti, M. L.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Chizzotti, F. H. M.; Tedeschi, L. O. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science*. 113:218-225.

Detmann, E.; Paulino, M. F.; Zervoudakis, J. T.; Valadares Filho, S. C.; Euclides, R. F.; Lana, R. P.; Queiroz, D. S. 2001. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30:1600-1609.

Detmann, E.; Queiroz, A. C.; Cecon, P. R.; Zervoudakis, J. T.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C.; Cabral, L. S.; Lana, R. P. 2003. Consumo de fibra em detergente neutro por bovinos em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32:1763-1777. (Suplemento 1).

Detmann, E.; Paulino, M. F.; Mantovani, H. C.; Valadares Filho, S. C.; Sampaio, C. B.; Souza, M. A.; Lazzarini, I.; Detmann, K. S. C. 2009. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. *Livestock Science*. 126:136-146.

Detmann, E.; Valadares Filho, S. C. 2010. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64:980-984.

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. 2012. Métodos para análise de alimentos – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Ciência Animal, INCT-CA. Universidade Federal de Viçosa, Visoça, MG. 214p.

Detmann, E.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C.; Batista, E. D.; Rufino, L. M. A. 2014. Aspectos nutricionais aplicados a bovinos em pastejo nos trópicos. In: Proc. 9th Symposium of beff cattle production. Viçosa, Brazil. 239p.

Detmann, E.; Valente, E. E. L.; Batista, E. D.; Huhtanen, P. 2014a. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. *Livestock Science*. 162:141-153.

Euclides, V. B. P.; Euclides Filho, K.; Costa, E. P. 2001. Desempenho de novilhas F1s Angus-Nelore em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30:470-481.

Fu, C. J.; Felton, E. E. D.; Leckhler, J. W.; Kerley, M. S. 2001. Ruminal peptide concentration required to optimized microbial growth and efficiency, *Journal of Dairy Science*. 79:1305- 1314.

Hennessy, D. W.; Nolan, J. V. 1988. Nitrogen kinetics in cattle fed a mature subtropical grass hay with and without protein meal supplementation. *Australian Journal of Agriculture Research*. 39:1135-1150.

Hodgson, J. 1990. *Grazing management: Science into practice*, 1º ed, London, UK. 203p.

Johnson, A. D. 1978. Sample preparation and chemical analysis of vegetation. Measurement of grassland vegetation and animal production. Commonwealth Agricultural Bureaux: Aberystwyth.

Kaps, A. M.; Lamberson, W. R. 2004. Biostatistics for Animal Science. 1º ed, CABI Publishing, London, UK. 445p.

Lazzarini, I.; Detmann, E.; Sampaio, C. B.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C.; Souza, M. A.; Oliveira, F. A. 2009. Dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 61:635-647.

McDowell, L. R. 1999. Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais enfatizando o Brasil. Gaines Ville: University of Florida. 39p.

McMeniman, N. P. 1997. Methods of estimating intake of grazing animals, in: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Simpósio sobre tópicos especiais em Zootecnia. Juiz de Fora, MG, Brazil.

Moraes, E. H. B. K. 2003. Suplementos múltiplos para recria e terminação de novilhos mestiços em pastejo durante os períodos de seca e transição seca-águas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

National Research Council – NRC. 1996. Ruminant nitrogen usage, Washington, DC: Academic Press. 244p.

Oliveira, A. S.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Cecon, P. R.; Rennó, L. N.; Queiroz, A. C.; Chizzotti, M. L. 2001. Produção de proteína microbiana e estimativa das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. Revista Brasileira de Zootecnia. 30:1621-1629.

Paulino, M. F.; Figueiredo, D. M.; Moraes, E. H. B. K.; Porto, M. O.; Sales, M. F. L.; Acedo, T. S.; Vilela, S. D. J.; Valadares Filho, S. C. 2004. Suplementação de bovinos em pastagem: uma visão sistêmica. In: Proc. 4th Symposium of beef cattle production. Viçosa, Brazil. p.93.

Paulino, M. F.; Zamperlini, B.; Figueiredo, D. M.; Moraes, E. H. B. K.; Fernandes, H. J.; Porto, M. O.; Sales, M. F. L.; Paixão, M. L.; Acedo, T. S.; Detmann, E.; Valadares Filho, S. C. 2006. Bovinocultura de precisão em pastagens. In: Proc. 5th Symposium of beef cattle production. Viçosa, Brazil. p.361.

Paulino, M. F.; Detmann, E.; Valadares Filho, S. C. 2008. Bovinocultura funcional nos trópicos. In: Proc. 6th Symposium of beef cattle production. Viçosa, Brasil. p.275.

Pereira, V. S. A. 2009. Influência do peso corporal e das características de carcaça sobre a excreção de creatinina e utilização de coleta spot de urina para estimar a excreção de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas nelore Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

- Reis, R. A.; Ruggieri, A. C.; Casagrande, D. R.; Páscoa, A. G. 2009. Supplementation of beef cattle as strategy of pasture management. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38:147-159.
- Rennó, L. N.; Valadares, R. F. D.; Leão, M. I.; Valadares Filho, S. C.; Silva, J. F. C.; Cecon, P. R.; Dias, H. L. C.; Costa, M. A. L.; Oliveira, R. V. 2000. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29:1223-1234.
- Rocha, T. C.; Fontes, C. A. A.; Silva, R. T. S.; Processi, E. F.; Valle, F. R. A. F.; Lombardi, C. T.; Oliveira, R. L.; Bezerra, L. R. 2016. Performance, nitrogen balance and microbial efficiency of beef cattle under concentrate supplementation strategies in intensive management of a tropical pasture. *Tropical Animal Health Production*. 48:673-681.
- Russell, J. B.; O'Connor, J. D.; Fox, D. J.; Van Soest, P. J.; Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science*. 70:3551-3561.
- Sampaio, C. B.; Detmann, E.; Lazzarini, I.; Souza, M. A.; Paulino, M. F.; Valadares Filho, S. C. 2009. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38:560-569.
- Santos, F. A. P.; Pedroso, A. M. 2011. *Metabolismo de proteína Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2:265-297.
- Silva Júnior, J. M. 2014. *Excreção urinária de derivados de purinas e de compostos nitrogenados de zebuínos em pastejo*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- Schutte, J. E.; Longhurst, J. C.; Gaffney, F. A.; Bastian, B. C.; Blomqvist, C. G. 1981. Total plasma creatinine: an accurate measure of total striated muscle mass. *Journal of Applied Physiology*. 51:762-766.
- Thakshala Seresinhe, K. K. P.; Jayasuriya, M. C. N. 2004. Urinary excretion of purine derivatives as an indicator of microbial protein supply in Sri Lankan local Zebu cattle and crossbred milking cows. Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives. *Kluwer academic publishers*. Netherlands. 95-102.
- Tedeschi, L. O. 2006. Model evaluation system – MES. Disponível em: <http://nutritionmodels.com/index.html>. Acessado em: 20 setembro 2017.
- Valadares, R. F. D.; Gonçalves, L. C.; Rodriguez, N. M.; Valadares Filho, S. C.; Sampaio, I. B. 1997. Níveis de proteína em dietas de bovinos, 4, Concentrações de amônia ruminal e ureia plasmática e excreções de ureia e creatinina. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 26:1270-1278.

Valadares, R. F. D.; Broderick, G. A.; Valadares Filho, S. C.; Clayton, M. K. 1999. Effect of replacing alfafa silage with high misture on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivates. *Journal of Dairy Science*. 82:2686-2696.

Valente, T. N. P.; Detmann, E.; Queiroz, A. C.; Valadares Filho, S. C.; Gomes, D. I.; Figueiras, J. F. 2011. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 40:2565–2573.

Valkeners, A.; Théwis, A.; Amant, S.; Beckers, Y. 2013. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *Journal of Animal Science*. 84:877-885.

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

Visek, W. L. 1984. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *Journal of Dairy Science*. 67:481-498.

Yu, P.; Egan, A. R.; Boon-Ek, L.; Leury, B. J. 2002. Purine derivative excretion and ruminal microbial yield in growing lambs fed raw and dry roasted legume seeds as protein supplements. *Animal Feed Science and Technology*. 95:33-48.

Zin, R. A.; Graces, P. 2006. Suplementação de bovinos de corte a pasto: considerações biológicas e econômicas. *International symposium of beff cattle production, Viçosa, Brasil*. 5:15-30.

Capítulo 2

Recuperação da creatinina na urina de bovinos em função do tempo e da temperatura de armazenamento

Resumo

Objetivou-se avaliar a recuperação da creatinina em função do tempo e de diferentes temperaturas de armazenamento. O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da UFV. Foram utilizadas urina de vinte e cinco animais, dez provenientes da raça Nelore e quinze da raça Holandesa. As urinas (10 de gado de corte e 10 de gado de leite) foram diluídas em solução de ácido sulfúrico a 0,036 N, fracionadas e conservadas em temperatura ambiente, resfriadas (4°C) e congeladas (-20°C e a -40°C), analisadas em diferentes dias após a coleta (1, 3, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 dias). Imediatamente após a coleta, a urina foi diluída e seu pH corrigido para valor inferior a 3, e a urina foi analisada, dando origem ao valor de creatinina, resultado utilizado como valor de referência da concentração de creatinina na amostra. Este valor referência, foi utilizado como divisor dos valores de creatinina obtidos nos dias da análise, por amostra, obtendo-se o valor de creatinina relativa, o que permite a observação do aumento ou diminuição da concentração de creatinina ao longo do tempo. Para avaliar a conversão de creatina em creatinina na urina de bovinos, utilizou-se urina proveniente de cinco bovinos da raça Holandesa. Estas urinas também foram diluídas e tiveram seu pH corrigido para valor inferior a 3. Para avaliar o efeito da adição de creatina na urina, adicionou-se solução de creatina (concentrações de 20, 40 e 60 mg/dL) nos eppendorf contendo urina diluída. Estas urinas foram analisadas em diferentes dias após a coleta (1, 3, 7, 15, 30 e 45 dias), sendo armazenadas nas mesmas temperaturas descritas anteriormente. a recuperação da creatinina foi constante ($P>0,05$) até o décimo dia de armazenamento, independente da temperatura utilizada. A partir do 30º dia de armazenamento houve efeito de tempo e/ou temperatura ($P<0,05$) na recuperação de creatinina na urina de bovinos. As amostras armazenadas em temperatura ambiente e a 4°C apresentaram aumento na concentração da creatinina relativa com o passar dos dias ($P<0,05$). As amostras congeladas (-20°C e a -40°C) mantiveram a recuperação constante ($P>0,05$). A adição de creatina na urina causou aumento ($P<0,05$) nas concentrações de creatinina nas amostras armazenadas a temperatura ambiente e em refrigeração, a partir de 30 dias de armazenamento. Nas amostras armazenadas em temperaturas de congelamento, não houve alteração na concentração de creatinina ($P>0,05$). Conclui-se que as amostras de urina podem ser

armazenadas em qualquer uma das temperatura estudada até quinze dias após a coleta para estimativa da concentração de creatinina. Amostras que necessitem tempos de armazenamentos superiores a 15 dias devem ser congeladas a -20°C ou -40°C.

Introdução

A creatinina é uma molécula formada no músculo pela remoção não enzimática de água do fosfato de creatina, que é uma importante reserva energética no metabolismo do tecido muscular (Harper et al., 1982; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000; Ardalan et al., 2015). A degradação do fosfato de creatina é realizada de forma espontânea e é relativamente constante, e aproximadamente 2% do *pool* de creatina corporal são convertidos a creatinina diariamente (Bloch et al., 1941). A creatinina pode ser encontrada no sangue e na urina. Contudo, a creatinina presente no sangue não é mais utilizada pelo organismo animal e, assim, é filtrada e excretada pelos rins através da urina (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

A urina é um fluido biológico formado a partir da depuração sanguínea, de fácil obtenção e consiste na principal via de excreção de compostos nitrogenados e derivados de purinas em bovinos, o que possui grande importância na experimentação animal, uma vez que estes metabolitos excretados através da urina servem de parâmetros da dinâmica de digestão e metabolismo dos componentes da dieta, principalmente nitrogênio.

Contudo, devido a necessidade de se realizar coleta de urina por no mínimo cinco dias (Chen e Gomes, 1992), que é uma técnica experimental laboriosa, desconfortável para o animal, a creatinina tem sido avaliada e validada como indicador interno do volume urinário, visando diminuir e facilitar coletas experimentais com animais (Valadares et al., 1999; Rennó et al. 2000; Silva Júnior, 2014). O uso da creatinina como indicador da produção urinária é obtido pela divisão da excreção diária desse composto pela sua concentração na amostra, o que permite a realização da coleta *spot* de urina (Chizzotti et al., 2008), tanto em bovinos em confinamento quanto mantidos a pasto.

Entretanto, mesmo havendo grande importância do conhecimento da concentração de creatinina nas amostras de urina de bovinos, não foram encontrados dados na literatura informando a melhor forma de armazenamento das amostras. Van Niekerk et al. (1963) ao avaliaram a recuperação da creatinina na urina de ovinos, observaram que há degradação da creatinina em seu pH normal (entre 8,4 e 8,7), quando armazenada à temperatura entre 27 e 30°C, no entanto, encontraram aumento na concentração urinária de creatinina quando esta é armazenada acidificada (pH 2,5 a 3,5) em temperatura de 28 a 39°C por cento e cinquenta dias de armazenamento.

Desta forma, objetivou-se avaliar a recuperação da creatinina em função do tempo e de diferentes temperaturas de armazenamento.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção – CEUAP, da Universidade Federal de Viçosa, conforme protocolo nº 24/2016.

Foram utilizadas amostras de urina de 25 animais, sendo dez coletadas de gado de corte (cinco novilhos machos e cinco novilhas fêmeas Nelore) e quinze de gado de leite (cinco vacas primíparas e dez vacas múltíparas da raça Holandesa). Os animais utilizados para realização da coleta, foram escolhidas de forma aleatória.

A amostragem foi realizada através da coleta *spot* de urina, por micção espontânea, onde 40 mL de urina, por animal, seguindo recomendações de Chen e Gomes (1992), foram diluídos em 160 mL de água para evitar precipitação do ácido úrico e teve seu pH ajustado para valores abaixo de 3, a fim de evitar degradação microbiana dos derivados de purinas e da creatinina.

Imediatamente após a amostragem, diluição, correção do pH e homogeneização, uma alíquota foi imediatamente analisada, a fim de determinar a concentração da creatinina no ato da coleta, sendo este o dia zero. As alíquotas de urina foram analisadas no dia zero, um dia após a realização da coleta, 3, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 dias de armazenamento após a coleta.

Realizou-se fracionamento da amostra, onde as demais alíquotas foram armazenadas, após homogeneização, em eppendorf de 2 mL e armazenadas em caixas porta eppendorf com capacidade para 100 unidades.

As amostras de urina foram conservadas em temperatura ambiente, mantidas sob refrigeração 4°C, congeladas a -20°C e a -40°C, totalizando quatro temperaturas de armazenamento. Totalizando 4 caixas de armazenamento por temperatura avaliada.

A temperatura ambiente, da sala onde as urinas referentes a essa variável, foi verificada e anotada todos os dias, às 16h, horário onde a temperatura ambiente máxima já foi atingida. Para mensuração da temperatura ambiente fez-se uso de termômetro meteorológico com medição de temperatura máxima e mínima.

A quantificação da concentração de creatinina foi realizada por meio do método cinético colorimétrico (K067), usando kit Bioclin® (Belo Horizonte, Brasil), utilizando-se o equipamento automático para bioquímica, marca Mindray, modelo: BS200E, com

comprimento de onda de leitura de 510 nm (490-520 nm) no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

A concentração da creatinina no dia zero serviu como referência para as amostras armazenadas. O valor da concentração de creatinina (mg/dL) no dia da análise foi dividido pelo valor referência obtendo-se assim o valor de creatinina relativa, possibilitando a observação do aumento ou diminuição na concentração da creatinina na amostra, para avaliação do efeito do tempo e da temperatura de armazenamento.

A fim de avaliar a conversão de creatina em creatinina em função do tempo e temperatura de armazenamento foram utilizadas amostras de urina provenientes de 5 animais, de origem leiteira. Adicionou-se 0,2 mL de solução de creatina em 1,8 mL de urina em pH abaixo de 3 nos eppendorfs.

Para confecção da solução de creatina, utilizou-se padrão de análise da SIGMA® com 99,5% de pureza.

As alíquotas foram então armazenadas, após homogeneização, em caixas porta eppendorf com capacidade para 100 unidades, sendo uma alíquota de urina diluída e com pH corrigido sem adição de solução de creatina e três com adição de solução de creatina a 20, 40 e 60 mg/dL.

As amostras de urina foram conservadas nas mesmas temperaturas testadas no experimento um. Sendo analisadas nos dias 1, 3, 7, 15, 30 e 45 após a coleta. Seguindo mesma metodologia de determinação da creatinina do experimento um.

Para avaliar a recuperação da creatinina ao longo do tempo sob efeito da temperatura de armazenamento utilizaram-se os procedimentos estatísticos do programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.4). Utilizaram-se os procedimentos MIXED, adotando-se alfa de 5% como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I, tendo como efeitos fixos o tempo e temperaturas de armazenamento, e para efeito aleatório, os animais.

Para avaliar a conversão da creatina em creatinina utilizaram-se o procedimento REG do SAS 9.4, onde foi estimado a regressão linear de valores adicionados e recuperados, sendo o parâmetro regressor (β_1) interpretado como teste de conversão de creatina em creatinina. Adotou-se alfa de 5% como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Resultados e Discussão

A temperatura ambiente média observada na sala de armazenamento das amostras para o experimento um foi de $20,6 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$ para mínima e máxima de $25,8 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$. Já para o experimento dois $21,2 \pm 0,8$ para mínima e a máxima de $26,4 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$.

Houve interação entre o tempo e a temperatura de armazenamento. Na Tabela 1 podem ser observadas as médias de creatinina relativa e os valores de P em função de tempo (dias) e temperatura de armazenamento das amostras de urina. Do primeiro ao 15º dia de armazenamento não houve diferença ($P > 0,05$) na concentração de creatinina relativa nas amostras, não havendo assim aumento ou diminuição significativos na sua concentração, o que possibilita inferir que a amostra de urina diluída e com pH ajustado para valor abaixo de três podem ser armazenadas em qualquer uma das temperaturas que foram testadas.

Não foi observada degradação da creatinina ($P > 0,05$) nas amostras de urina, demonstrando que a diluição e correção do pH para valores abaixo de três inibem a degradação da molécula de creatinina. Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) relataram que enzimas específicas provenientes de microrganismos que podem se desenvolver na urina degradam a creatinina a ácido acético e metilguanidina, em condições de pH próximo ao normal da urina (8,4 a 8,7).

Entre o 30º e o 150º dia de armazenamento houve efeito ($P < 0,05$) de tempo e/ou temperatura de armazenamento sobre a concentração de creatinina. A urina armazenada a temperatura ambiente e a 4°C sofreu influência ($P < 0,05$) do tempo de armazenamento, ocorrendo aumento na concentração da creatinina relativa (Figura 1).

Estes dados estão de acordo com Van Niekerk et al. (1963), que ao avaliarem a recuperação da creatinina em amostras de urina de ovinos, encontraram aumento na concentração urinária de creatinina quando esta é armazenada acidificada (pH 2,5 a 3,5) em temperatura entre 28 e 39°C , por 150 dias, demonstrando que algum composto presente na urina esteja se transformando em creatinina.

Possivelmente esse aumento nas concentrações de creatinina relativa na urina de bovinos esteja ligada a excreção de creatina na urina, uma vez que o equilíbrio da molécula de creatinina (creatina \leftrightarrow creatinina), *in vitro*, é amplamente dependente de temperatura e pH, onde a creatina é favorecida em pH básico e baixa temperatura, e a creatinina tem aumento de sua concentração quando há elevadas temperaturas e meio ácido (Lempert, 1959; Van Niekerk, 1963).

Tabela 1. Médias, nível de significância (valores P) e erro padrão da média (EPM) obtidos para creatinina relativa em função de tempo (dias) e temperatura de armazenamento em amostras de urina de bovinos.

Dias	Temperatura de Conservação				Valor P ¹
	Ambiente	4°C	-20°C	-40°C	
1	1,037	1,015	0,975	1,001	0,376
3	1,039	1,015	1,045	1,012	0,759
7	1,054	1,013	0,998	1,003	0,441
10	1,067	1,027	1,017	1,028	0,527
15	1,092	1,009	1,011	1,021	0,067
30	1,168	0,995	0,980	0,958	<0,001
45	1,248	1,065	1,022	1,014	<0,001
60	1,250	1,074	1,023	1,015	<0,001
90	1,304	1,109	1,043	0,997	<0,001
120	1,369	1,117	1,050	1,044	<0,001
150	1,329	1,070	1,041	1,037	<0,001
Valor P ²	<0,001	0,002	0,409	0,560	EPM=0,0449 ³

¹Efeito de tratamento dentro de tempo (dia); ²Efeito de tratamento ao longo do tempo (dias); ³Para n=20.

Observa-se que os incrementos nas concentrações de creatinina nas amostras armazenadas à temperatura ambiente aumentaram à medida que se armazenava as amostras por maiores períodos. No 30º dia, a concentração de creatinina aumentou aproximadamente 17% em relação a creatinina observada no dia zero, no 150º dia a concentração de creatinina ficou aproximadamente 33% maior ao valor de referência. Esses aumentos levam a superestimação da concentração de creatinina na urina, podendo levar a erros experimentais, quando se usa a creatinina como indicador do volume urinário.

As amostras armazenadas sob refrigeração também apresentaram variação ao longo do tempo de armazenamento ($P < 0,05$), com menor variação que em temperatura ambiente, porém também significativa, evidenciando que mesmo sob refrigeração é possível haver incrementos na recuperação da creatinina.

As amostras quando armazenadas a temperaturas que promoviam congelamento da urina (-20°C e -40°C) não sofreram influência ($P > 0,05$) de tempo e tão pouco de temperatura (Tabela 1), demonstrando serem as melhores formas de armazenamento da urina por tempos maiores que 15 dias de conservação.

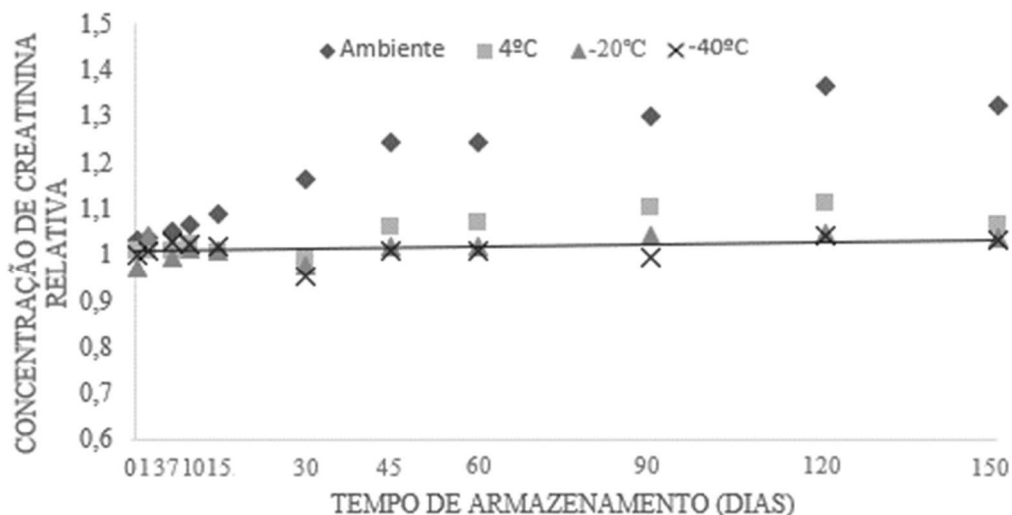


Figura 1: Concentração da Creatinina relativa na urina de bovinos em função do tempo (dias) e temperatura de armazenamento.

A adição de solução de creatina (Figura 2) na urina de bovinos demonstrou que com o passar dos dias de conservação das amostras nas diferentes temperaturas estudadas, houve aumento ($P < 0,05$) na concentração de creatinina, para a temperatura ambiente ($24,3^{\circ}\text{C}$) e refrigeração (4°C) a partir de 30 dias de armazenamento. Nas temperaturas de congelamento (-20°C e -40°C) não houve alteração na concentração de creatinina ($P > 0,05$), confirmando a hipótese de que na urina conservada sem congelamento, principalmente em temperatura ambiente, há aumento na conversão de creatina em creatinina em urina acidificada.

No entanto não foram encontrados dados na literatura que relatem a excreção de creatina através da urina de bovinos. Em humanos, a excreção de creatina na urina é considerada baixa, Vici et al. (1987) ao avaliar o fornecimento de suplementos como ornitina, lisina, arginina, citrulina e creatina para pacientes humanos que apresentavam hiperamonemia, observaram concentrações de $11 \mu\text{mol}/\text{kg}$ de peso corporal. Estes mesmos autores ao citarem Pavry et al. (1979) descreveram como valores de referência para a excreção de creatina na urina de 41 a $104 \mu\text{mol}/\text{kg}$ de peso corporal, não sendo influenciada por idade ou sexo (Forbes e Bruining, 1978).

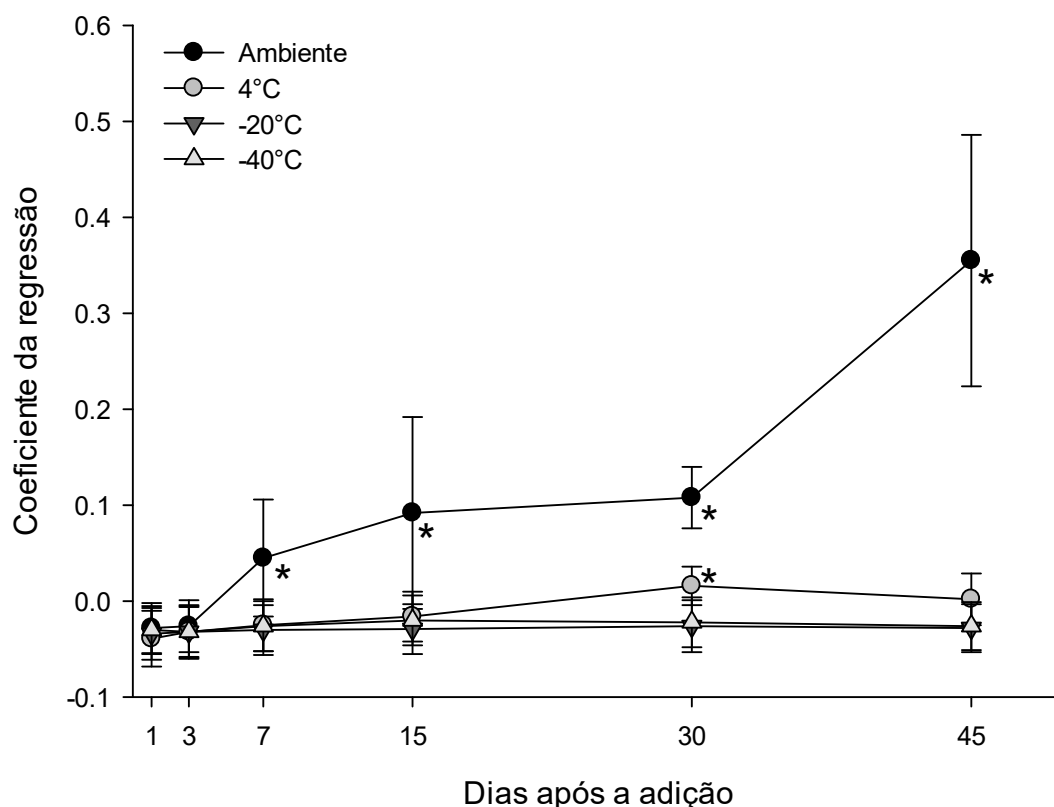


Figura 2. Coeficientes da regressão linear entre os valores de creatinina analisada em função da creatina adicionada, de acordo com os dias de conservação sob diferentes temperaturas (* significativo a 0,05 de probabilidade).

Observa-se que a adição de solução de creatina nas amostras de urina causou aumento na recuperação de creatinina. Esse aumento foi mais proeminente nas amostras mantidas em temperatura ambiente, mesmo comportamento observado nas amostras sem adição referentes ao experimento 1 (Tabela 1 e Figura 1). Contudo esse aumento que no experimento 1 começou a ocorrer no 30º dia de armazenamento, aqui ocorreu mais precocemente, no 7º dia de armazenamento. No 7º dia de armazenamento, para cada miligrama de creatina adicionada cerca de 5% estava convertida em creatinina, aos 45 dias de armazenamento essa conversão foi cerca de 35%, evidenciando que quanto maior a concentração de creatina na urina, maior e mais rápida sua conversão em creatinina.

É preciso salientar que as concentrações de creatina adicionadas são muito superiores as que possivelmente possam ser encontradas na urina de bovinos, uma vez que como destacado, a excreção de creatina na urina é baixa.

Conclusão

Amostras de urina de bovinos podem ser armazenadas em qualquer temperatura até dez dias após a coleta para determinação da concentração de creatinina. Amostras que

necessitem tempos de armazenamentos superiores a quinze dias devem ser congeladas a -20°C ou -40°C.

Referências bibliográficas

Ardalan, M.; Batista, E.; Armendariz, C.; Titgemeyer, E. 2015. Guanidinoacetate acid as a precursor of creatine for cattle. Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports. 1:1-7.

Bloch, K.; Schoenheimer, R.; Rittenberg, D. 1941. Rate of formation and disappearance of body creatinine in normal animals. *The Journal of Biological Chemistry*. 138:155-166.

Chen, X. B.; Gomes M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – on overview of technical details. Buscksburn: Rowett Research Institute. International Feed Resources Unit. (Occasional publication). 21p.

Chizzotti, M. L.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Chizzotti, F. H. M.; Tedeschi, L. O. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science*. 113:218-225.

Forbes, G. B.; Bruining, G. J. 1978. Urinary creatinine excretion and lean body mass. *American Journal of Clinical Nutrition*. 29:1359-1366.

Harper, H. A.; Rodwell, V. W.; Mayes, P. A. 1982. Manual de química fisiológica. 5th ed. Atheneu, São Paulo, SP. 570p.

Lempert, C. 1959. The chemistry of the glycohydrazides. *Chemical Reviews*. 59:667-736.

Rennó, L. N.; Valadares, R. F. D.; Leão, M. I.; Valadares Filho, S. C.; Silva, J. F. C.; Cecon, P. R.; Dias, H. L. C.; Costa, M. A. L.; Oliveira, R. V. 2000. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29:1223-1234.

Silva Júnior, J. M. Excreção urinária de derivados de purinas e de compostos nitrogenados de zebuínos em pastejo. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

Valadares, R. F. D.; Broderick, S. C.; Valadares Filho, S. C.; Clayton, M. K. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science*. 82:2686-2696.

Van Niekerk, B. D. H.; Bensadoun, A.; Paladines, O. L.; Reid, J. T. 1963. A study of the conditions affecting the rate of excretion and stability of creatinine in sheep urine. *Journal of Nutrition*. 79:373-380.

Vici, C. D.; Bachmann, C.; Gambarara, M.; Colombo, J. P.; Sabetta, G. 1987. Hypermethioninemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria syndrome: Low creatine excretion and effects of citrulline, arginine, or ornithine supplement. *Pediatric Research*. 22:364-367.

Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological reviews*. 80:1107-1213.