

ANDERSON SOUZA TRECE

**PERFIL NICTEMERAL DAS EXCREÇÕES URINÁRIAS DE  
DERIVADOS DE PURINAS E COMPOSTOS NITROGENADOS E  
DE SUAS RELAÇÕES COM A EXCREÇÃO DE CREATININA EM  
VACAS LEITEIRAS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

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

T

T785p  
2016

Trece, Anderson Souza, 1989-

Perfil nictermeral das excreções urinárias de derivados de purinas e compostos nitrogenados e de suas relações com a excreção de creatinina em vacas leiteiras / Anderson Souza Trece. – Viçosa, MG, 2016.

viii, 31f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Rilene Ferreira Diniz Valadares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Vacas leiteiras. 2. Urina - Análise. 3. Purinas - Excreção. 4. Uréia - Excreção. 5. Creatinina - Excreção . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.23

ANDERSON SOUZA TRECE

**PERFIL NICTEMERAL DAS EXCREÇÕES URINÁRIAS DE DERIVADOS DE  
PURINAS E COMPOSTOS NITROGENADOS E DE SUAS RELAÇÕES COM  
A EXCREÇÃO DE CREATININA EM VACAS LEITEIRAS**

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

APROVADA: 18 de abril de 2016.



Sebastião de Campos Valadares Filho  
(Coorientador)



Marcos Inácio Marcondes  
(Coorientador)



Luiz Fernando Costa e Silva



Luciana Navajas Rennó



Rilene Ferreira Diniz Valadares  
(Orientadora)

*Aos meus pais, Rogério Teixeira Trece*

*e Elenice Souza Trece,*

*e minha irmã Aline Souza Trece,*

*que sempre me apoiaram, acreditaram*

*e inspiraram minha carreira:*

**OFEREÇO e DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rogério Teixeira Trece e Elenice Souza Trece, pelo exemplo como pais e seres humanos, pela criação, apoio, torcida, carinho e amor incondicional. Por serem a minha maior inspiração na construção da carreira profissional e pessoal.

À minha irmã, Aline Souza Trece, que sempre esteve ao meu lado nos momentos de grandes adversidades, com maior apoio, carinho e atenção. Sem você esse trabalho seria muito mais árduo minha irmã, você é muito especial.

Aos meus avós e todos familiares que sempre acreditaram, apoiaram e torceram ao longo dessa caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realização e qualidade do curso. Ao Departamento de Zootecnia por oferecer toda estrutura e suporte para realização do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Professora Rilene Ferreira Diniz Valadares, pela grande oportunidade e honra de trabalhar e conduzir essa pesquisa sob sua orientação, e por toda dedicação, apoio, compreensão, carinho e atenção para realização do melhor trabalho possível.

Ao Professor Marcos Inácio Marcondes por todo apoio, carinho e gigante dedicação na condução de todas as etapas desse trabalho e por ser um grande exemplo e inspiração profissional em minha carreira.

Ao Professor Sebastião de Campos Valadares Filho pelo grande apoio, atenção e ajuda para conduzir essa pesquisa da melhor maneira possível.

À Professora Luciana Navajas Rennó e Professor Edênio Detmann pelas orientações e conselhos para análises laboratoriais e estatísticas.

Ao Luiz Fernando Costa e Silva e Professora Polyana Pizzi Rotta pela grande dedicação e atenção nas análises estatísticas.

Aos funcionários da UEPE-GL, dos laboratórios do DZO e DVT pela imensa atenção e ajuda no decorrer de todas as fases do experimento.

Aos professores que contribuíram com a minha formação acadêmica e foram guias e conselheiros nessa jornada profissional.

À todos meus estagiários e orientados do Professor Marcos Marcondes, pela gigantesca dedicação, apoio, atenção e boa vontade em todas as fases desse trabalho, vocês foram fundamentais para esse trabalho acontecer.

À todos os orientados de graduação e pós graduação do Professor Sebastião de Campos Valadares Filho, pela imensa ajuda e atenção para realização de todas as análises laboratoriais.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, desde o primeiro momento que saí da casa de meus pais em busca de uma carreira e sonho. Em especial aos amigos da Escola Agrotécnica Federal de Barbacena, Thiago, Marcos, Marcelo, Saulo e Jordane; aos meus companheiros de alojamento na UFV Marquinhos, Thiago e Michel; aos

grandes companheiros Tadeu, Marcelo e Rafael; ao meu grande amigo e parceiro Sílvio; aos meus companheiros e amigos de casa Tarciso, Alex e Luiz; e à imensa amizade e companheirismo de meu irmão de coração Leanes, vocês fizeram essa jornada muitíssimo gratificante e inesquecível.

À Deus por iluminar meu caminho com força e saúde e permitir conquistar mais essa etapa.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma com apoio e atenção para condução desse trabalho, serão lembradas com respeito e carinho.

Muito obrigado!!

## **BIOGRAFIA**

ANDERSON SOUZA TRECE, filho de Rogério Teixeira Trece e Elenice Souza Trece, nasceu na cidade de Senador Cortes, estado de Minas Gerais, em 9 de março de 1989.

Em 2009, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa. Colando grau em março de 2014.

Em março de 2014, ingressou no programa de Pós-graduação no Departamento de Veterinária, nível mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Professora Rilene Ferreira Diniz Valadares, com os seus estudos concentrados na área de produção de ruminantes.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRATC .....	viii
1- INTRODUÇÃO .....	1
2- MATERIAL E MÉTODOS .....	3
2.1- Consumo e digestibilidade de alimentos .....	4
2.2- Amostragem e análise do leite.....	4
2.3- Coleta de urina <i>spot</i> .....	5
2.3- Coletas totais de urina.....	5
2.5- Análises de urina .....	5
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	6
4- CONCLUSÕES.....	10
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
6- TABELAS E FIGURAS .....	14
MATERIAL SUPLEMENTAR .....	24

## RESUMO

TRECE, Anderson Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2016. **Perfil nictemeral das excreções urinárias de derivados de purinas e compostos nitrogenados de suas relações com a excreção de creatinina em vacas leiteiras.** Orientadora: Rilene Ferreira Diniz Valadares. Co-Orientadores: Marcos Inácio Marcondes e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Esse estudo foi conduzido para estabelecer o perfil nictemeral da excreção urinária de creatinina (CR), uréia (UR), nitrogênio total (NT) e derivados de purina (DP) e as relações UR:CR, NT:CR e DP:CR em vacas leiteiras, com objetivo de reduzir a coleta de 24 para 2h ou indicar o melhor horário para estimar esses compostos por meio de coletas de urina *spot*. Foram utilizadas quinze vacas Holandesas em sistema de confinamento total em baias individuais. O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos consistiram de três níveis de produção diária: Alta ( $31,26_{\pm 2,99}$  kg), média ( $22,86_{\pm 1,57}$  kg) e baixa ( $14,16_{\pm 0,75}$  kg). O período experimental teve duração de 27 dias, sendo 14 para adaptação dos animais às condições experimentais e 13 dias para coletas de amostras. As amostras *spot* de urina foram coletadas de 2h em 2h (2hSp) no 16º e 17º dia experimental. Do 22º ao 25º dia foram obtidas amostras totais de urina a intervalos de duas horas. Não houve diferença entre os horários de coleta e produção de leite (PL) para a excreção diária de creatinina, expressa em mg/kgPC e para relação DP:CR para coleta total de 2h em 2h (2hTL). Houve efeitos dos horários de coleta e PL sobre as relações UR:CR e NT:CR para coleta 2hTL. Os horários representativos para coleta 24h das coletas 2hTL foram 2, 4, 6, 8, 12, 18, 20 ou 24 h para relação UR:CR e 2, 4, 6, 8, 10, 16, 18, 22 ou 24 h para relação NT:CR. Não houve diferença entre os horários de coleta e PL para relação DP:CR em coleta 2hSp. Para as coletas 2hSp, os horários indicados para estimação da excreção de NT e UR, foram 10, 18 e 24 h. Conclui-se que a excreção de creatinina, expressa em mg/kgPC, e a relação DP:C não variam ao longo do dia, respaldando a recomendação de que a coleta *spot* de urina seja efetuada a qualquer horário do dia para estimar a excreção de DP diária. Para coletas de urina *spot* ou redução do tempo de coleta de 24 para 2h, com objetivo de estimar a excreção de compostos nitrogenados, recomenda-se os horários de 10h, 18h e 24h. Ressalta-se, finalmente, que apesar desses três horários individualmente estimarem adequadamente a produção de compostos nitrogenados e DP, recomenda-se que seja feita coleta nos três horários para reduzir a probabilidade de erros das estimativas.

## ABSTRACT

TRECE, Anderson Souza, M.Sc., Federal University of Viçosa, April 2016. **Diurnal profile of urinary excretion of purine derivatives and nitrogen compounds and their ratios with creatinine excretion in dairy cows.** Advisor: Rilene Ferreira Diniz Valadares. Co-advisors: Marcos Inácio Marcondes and Sebastião de Campos Valadares Filho.

This study was conducted to establish the diurnal profile of urinary excretion of creatinine (CR), urea (UR), total nitrogen (TN), and purine derivatives (PD) and the UR:CR, TN:CR, and PD:CR ratios in dairy cows, aiming to reduce the collection time from 24 h to 2 h or indicate the best time to estimate these compounds via spot urine collections. Fifteen Holstein cows were used in a total confinement system, housed in individual stalls. The study was undertaken as a completely randomized design with three treatments and five replications. Treatments consisted of three levels of daily milk yield: high ( $31.26 \pm 2.99$  kg), medium ( $22.86 \pm 1.57$  kg), and low ( $14.16 \pm 0.75$  kg). The experimental period lasted 27 days, including 14 days for the adaptation of animals to the experimental conditions and 13 days for sample collections. Spot urine samples were collected every 2 h (2hSp) on the 16th and 17th experimental days. From the 22nd to the 25th days, total urine samples were obtained at two-hour intervals. There was no difference between collection times and milk yield (MY) for the daily excretion of creatinine, expressed in mg/kg BW, and for the PD:CR ratio for total collection performed every 2 h (2hTL). There was an effect of collection times and MY on the UR:CR and TN:CR ratios for 2hTL collection. The representative times for the 24-h collection of 2hTL collections were 2, 4, 6, 8, 12, 18, 20, or 24h00 for UR:CR ratio and 2, 4, 6, 8, 10, 16, 18, 22, or 24h00 for TN:CR ratio. There was no difference between collection times and MY for the PD:CR ratio in 2hSp collection. For 2hSp collections, the times indicated for the estimate of TN and UR excretion were 10, 18, and 24 h. In conclusion, creatinine excretion, expressed in mg/kg BW, and PD:CR ratio do not vary throughout the day, corroborating the recommendation that the spot urine collection should be performed at any time of the day to estimate the daily PD excretion. For spot urine collections or to reduce the collection time from 24 to 2 h aiming to estimate the excretion of nitrogen compounds, the times 10h00, 18h00, and 24h00 are recommended. Lastly, we stress that although these three times alone adequately estimate production of nitrogen compounds and PD, we recommend that collection be performed at all three times to reduce the error probability of estimates.

## 1- INTRODUÇÃO

Os requerimentos proteicos dos ruminantes são atendidos pela absorção intestinal de aminoácidos provenientes da proteína dietética não degradada no rúmen e da proteína microbiana ruminal, que constituem a proteína metabolizável (Valadares Filho, 1995). A proteína microbiana (PMic) pode suprir grande parte da proteína metabolizável, possui digestibilidade intestinal em torno de 80% e seu perfil de aminoácidos é semelhante aos tecidos corporais e à proteína do leite. A partir dessas características, visa-se a maximização do fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, com objetivo de aumentar a eficiência produtiva.

Dessa forma, a quantificação da produção de PMic é fundamental para a elaboração de dietas balanceadas de acordo com o requerimento dos animais leiteiros. Em geral, métodos para quantificação da produção de proteína microbiana baseiam-se em indicadores internos microbianos, tais como as bases de purinas (RNA) e o ácido 2,6 diaminopimélico (DAPA) e os externos como o  $^{35}\text{S}$  e  $^{15}\text{N}$  (Broderick e Merchen, 1992). Porém, esses métodos são laboriosos e necessitam de animais cirurgicamente preparados. Outro método alternativo para quantificação de PMic é por meio da excreção de derivados de purina (DP). O método de excreção de DP na urina baseia-se no pressuposto que todo ácido nucléico que deixa o rúmen é de origem essencialmente microbiana (Chen et al. 1990; Belenguer et al. 2002) e os ácidos nucleicos que estão presentes na alimentação de ruminantes são degradados pela fermentação ruminal (Chen e Gomes, 1992). Após a absorção intestinal, os nucleotídeos purínicos, adenina e guanina, são absorvidos, catabolizados e excretados na urina como hipoxantina, xantina, ácido úrico, e, principalmente, alantoína (Perez et al. 1996; Orellana-Boero et al. 2001). Segundo Chen et al. (1990), em bovinos, devido à alta atividade da xantina oxidase presente no sangue e nos tecidos, os DP excretados são essencialmente a alantoína e ácido úrico, já que essa enzima converte xantina e hipoxantina à ácido úrico. Dessa maneira, a excreção urinária de DP tem relação direta com a absorção intestinal das purinas e, quando se conhece a relação N-purina: N-total da biomassa microbiana, a PMic pode ser calculada a partir da quantidade de purina absorvida, estimada pela excreção urinária de DP (Chen e Gomes, 1992).

Para quantificação da excreção de DP na urina é necessária coleta total de urina. Alguns estudos utilizaram tempos de coletas distintos para mensurar excreção urinária de DP, como Leal et al. (2007) que utilizaram seis dias, Barbosa et al. (2006) cinco dias e Vagnoni et al. (1997) três dias. Porém, de acordo com Fleming (1991), Valadares et al. (1997) e Leal et al. (2007), coletas em 24 horas são representativas da excreção urinária de DP. Contudo, mesmo considerando 24 horas como tempo ideal para coleta de urina, a coleta total é laboriosa, tem risco de perda de amostra durante o período de coleta, e, além disso, é difícil de ser obtida em condições de pastejo. Além do tempo para coleta, a técnica requer a utilização de cateteres uretrais que podem gerar desconforto e aumentar o risco de infecções urogenitais, principalmente quando são utilizados por tempo prolongado.

Como alternativa menos laboriosa e invasiva, alguns estudos utilizaram a técnica de coleta de urina *spot*. A amostra *spot* baseia-se na constância da excreção diária de creatinina (CR) por unidade de peso. Segundo Valadares et al. (1997), a excreção de CR é constante e pode ser utilizada como indicador da produção urinária diária. Rennó et al. (2008), avaliaram a constância da excreção de CR sob diferentes níveis de inclusão de uréia (UR) na dieta de novilhos (Holandês, ½ Holandês x Guzerá, ½ Holandês x Gir, Zebu) e não encontram diferença na excreção de CR. Dessa forma, poderia ser coletada uma amostra isolada, denominada *spot*, o que poderia simplificar a coleta a nível experimental e a campo. Em casos extremos, a redução da coleta de 24h para 2h poderia ser uma alternativa interessante, caso a mesma também seja eficaz na estimação de DP e compostos nitrogenados (CN).

Apesar dos trabalhos reportados acima, a eficácia da utilização da amostra *spot* é dependente do perfil da excreção urinária das substâncias de interesse, por exemplo, alantoína, ácido úrico e CN totais em relação à excreção de CR. Chen et al. (1992) e Pereira (2009), avaliaram as concentrações de CR e DP na urina de novilhos Nelore e novilhas Nelore por meio de coletas *spot* ao longo do dia, respectivamente. Ambos autores detectaram variações similares ao longo do dia nas concentrações urinárias de CR e DP, sendo constante a relação DP:CR, o que possibilita a utilização de coleta *spot* para mensuração de DP. Já Chizzotti et al. (2007), utilizando vacas Holandesas, avaliaram a excreção urinária de DP e NT obtidos por meio de coleta total em 24 horas e por coleta *spot* 4h após o fornecimento da alimentação, e não encontraram diferença nas estimativas da excreção diária de alantoína, ácido úrico, N total e N-uréico entre os métodos, porém não foram realizadas avaliações sobre o perfil de excreção desses compostos ao longo do

dia. Pereira (2009), ainda avaliou as relações urinárias de UR:CR e NT:CR, e observou que essas relações diferiram entre as coletas a intervalos de 2 h, sendo indicados os horários de 08:00h e 16:00h como mais apropriados para estimar a excreção de NT e UR.

Assim percebe-se, ainda, grande escassez de estudos que descrevam o perfil da excreção de DP e CN e de suas relações com a CR ao longo do dia que demonstrem o melhor horário para coleta de urina *spot*, principalmente em bovinos de origem leiteira. Além disso, no caso da ineficácia da coleta de urina *spot*, uma redução da coleta total de 24 para 2 h pode ser alternativa viável para determinação de DP e CN em vacas em lactação. Assim, a hipótese do estudo é que em coletas de urina *spot* a cada 2h ou redução da coleta total de 24 para 2h em vacas holandesas de alta, média e baixa produção de leite a relação DP:CR não varia ao longo do dia e que as relações UR:CR e NT:CR apresentem variação. O objetivo do estudo é apontar quais são os melhores horários para coleta de urina *spot* para estimar a excreção urinária de DP, NT e UR em vacas holandesas em lactação.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. O estudo foi conduzido seguindo as normas da comissão de ética no uso de animais de produção da UFV, certificado no processo número 109/2014.

Foram utilizadas quinze vacas da raça Holandesa em sistema de confinamento total em baias individuais, tipo *Free Stall*, providas de cocho e bebedouro. O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos consistiram de três níveis de produção diária de leite: Alta ( $31,26_{\pm 2,99}$  kg), média ( $22,86_{\pm 1,57}$  kg) e baixa ( $14,16_{\pm 0,75}$  kg). Os animais de alta, média e baixa produção apresentaram peso corporal de 556, 530 e 510 kg respectivamente. O período experimental teve duração de 27 dias, sendo 14 para adaptação às condições experimentais e 13 para as coletas de amostras.

## 2.1- Consumo e digestibilidade de alimentos

Para monitoramento dos tratamentos, foi realizada a determinação do consumo e digestibilidade dos nutrientes dos animais. Para isso, a alimentação, fornecida na forma de mistura completa, foi constituída de silagem de milho à vontade e um kg de concentrado para cada três kg de leite, sendo fornecida diariamente às 7:30 e 15:30h, permitindo-se sobras de no máximo 5%. A proporção dos ingredientes no concentrado se encontra na Tabela 1 e as composições da silagem de milho e do concentrado são apresentadas na Tabela 2.

Foram realizadas amostragens e análises de alimentos, sobras e fezes com objetivo de verificar o consumo e digestibilidade de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN) e nutrientes digestíveis totais (NDT), para as vacas de cada nível de produção de leite (PL).

Do 15º até o 21º dia, as sobras foram quantificadas pela manhã e as amostras dos alimentos e das sobras foram armazenadas em sacos plásticos a -15°C e posteriormente moídas em moinho de facas (1 e 2 mm). Nas amostras de sobras, forragem e do concentrado foram quantificados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e fibra em detergente neutro (FDN), segundo recomendações do INCT-CA G-003/1, INCT-CA N-001/1, INCT-CA M-001/1, INCT-CA G-005/1, INCT-CA F-002/1 (Detmann et al., 2012), respectivamente.

Nos 18º, 19º e 20º dias foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto, às 6:00h, 12:00h e 18:00h respectivamente. As amostras foram parcialmente secas em estufa de ventilação forçada, a 60°C por 72 horas, moídas em moinho de facas com peneira com crivos de 1 mm e 2 mm, então, foi elaborada uma amostra composta por animal, com base no peso seco de cada sub amostra. Foi utilizada a fibra em detergente ácido indigestível (FDNi) para se estimar a produção de matéria seca fecal, conforme proposto por Cochran et al. (1986). Todavia, foi utilizada a incubação ruminal em sacos de ankum (filter bags F57) (5 x 5 centímetros), por 288 horas, em vez da digestibilidade *in vitro* sugerida no protocolo original (INCT- CA F-010-1; Detmann et al., 2012).

## 2.2- Amostragem e análise do leite

As vacas foram ordenhadas mecanicamente, duas vezes ao dia. Nas ordenhas da tarde do 15º dia e da manhã do 16º dia foram coletadas amostras de leite, sendo elaborada uma amostra composta, proporcional à produção em cada ordenha, para fins de análise dos teores de gordura, lactose e proteína, segundo Pregnotatto & Pregnotatto (1985). A

produção de leite corrigida (PLC) para 3,5% de gordura foi efetuada conforme Sklan et al. (1992):

$$\text{PLC} = (0,432 + 0,1625 \times \% \text{ de gordura do leite}) \times \text{produção de leite.}$$

### 2.3- Coleta de urina *spot*

As amostras *spot* de urina foram coletadas a cada 2 horas (2hSp), após micção estimulada por massagem na vulva, no 16° e 17° dia experimental (coleta em horários intercalados de 4 em 4 h, totalizando 12 coletas). As amostras em cada horário foram filtradas em gaze, e foram obtidas duas alíquotas de aproximadamente 50 mL, uma sem diluir e outra diluída (10 mL em 40 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,036 N), que foram armazenadas em frascos plásticos a -15°C para análises de NT, CR, UR E DP. A partir dessa coleta, foram calculadas as relações de DP:CR, NT:CR e UR:CR, com objetivo de apontar os horários representativos de coleta para estimar os compostos de interesse a partir de coleta 2hSp.

### 2.3- Coletas totais de urina

Para a coleta total de urina de cada animal, foram adaptadas sondas de Folley n°26, duas vias, com balão de 50 mL, que foram introduzidas via uretra até a bexiga no 22° dia. Na extremidade externa do cateter foi adaptada mangueira de polietileno que conduziu a urina até recipientes plásticos com capacidade de 20L, acondicionados em isopor com gelo.

Do 22° ao 25° dia, foram obtidas amostras totais de urina a intervalos de 2 horas (2hTL) à partir das 8:00h. Ao término de cada período de 2 horas de coleta, a urina total foi pesada, homogeneizada e amostrada, sendo o restante descartado. As amostras foram obtidas conforme descrito para as amostras *spot*. A partir dessas amostras, foram calculadas: a excreção de creatinina em cada horário de coleta, para verificar sua constância de excreção ao longo do dia; e as relações de DP:CR; NT:CR e U:CR, com objetivo de apontar horários representativos para estimação dos compostos de interesse a partir de coletas 2hTL. A soma dos valores encontrados em cada amostra 2hTL foi realizada para obtenção da excreção de CR, DP, NT e UR.

### 2.5- Análises de urina

As análises para a determinação das concentrações de nitrogênio total (NT), foram efetuadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFV, já as amostras de CR, UR, ácido úrico e alantoína foram efetuadas no Laboratório de

Fisiologia e Reprodução Animal. O teor de NT na urina foi estimado pelo método INCT-CA N-001/1. As determinações das concentrações de CR, UR e ácido úrico foram efetuadas em aparelho Analisador Bioquímico modelo BS-200E Mindray, utilizando kits comerciais Bioclin. Para a CR foi utilizado método colorimétrico, para UR, o método enzimático-colorimétrico, enquanto para o ácido úrico o método enzimático. A concentração de alantóina foi determinada pelo método colorimétrico, conforme Fujihara et al. (1987), descrito por Chen & Gomes, (1992).

Todas variáveis foram analisadas usando procedimentos MIXED do programa SAS (Institute Inc, versão 9, 2008). Os resultados referentes às coletas 2hTL e 2hSp, foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, em medidas repetidas no tempo de acordo com o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \delta_{ij} + P_e + (T \times P)_{ie} + \varepsilon_{ijke}, \text{ onde:}$$

$\mu$  = significância geral

$T_i$  = efeito fixo de tratamento  $i$

$\delta_{ij}$  = erro aleatório com significância 0 e variância  $\sigma^2 \delta$ , a variância entre os animais em que o tratamento é igual à covariância entre medidas repetidas dos animais.

$P_e$  = efeito fixo de período,  $e$

$(T \times P)_{ie}$  = efeito fixo de interação entre tratamento e período  $e$

$\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório com significância 0 e variância  $\tau^2$ , a variação entre as medidas entre os animais.

As médias foram comparadas pelo método dos quadrados mínimos e as diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$  pelo teste  $t$  de Student.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme o planejamento experimental, houve diferença ( $P < 0,001$ ) para a produção de leite (PL), tanto sem correção quanto corrigida para 3,5% de gordura (Tabela 3). Observou-se diferenças da ordem de 24% entre as produções alta e média e de 38% entre as produções média e baixa. Entretanto, os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos foram semelhantes ( $P > 0,05$ , Tabela 3).

O fornecimento de concentrado ajustado ao nível de produção de leite (PL), resultou em relação volumoso: concentrado (V:C) de 51,70, 57,79 e 71,12 de MS, respectivamente, para os níveis de alta, média e baixa PL. Os consumos de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), carboidratos não fibrosos (CNF) e de nutrientes digestíveis

totais (NDT), expressos em kg/dia, foram maiores ( $P < 0,001$ ) para as vacas de maior PL, e as de média produção tiveram consumo maior que as de baixa PL (Tabela 3 e *Material suplementar*). Entretanto, o consumo de fibra em detergente neutro (FDN) não apresentou diferença ( $P = 0,379$ ) entre as vacas de diferentes PL. As digestibilidades de MS, PB, CNF e os teores de NDT não apresentaram diferença ( $P > 0,05$ ) entre as vacas de alta, média e baixa PL (*Material Suplementar*).

As excreções diárias de UR de NT foram maiores ( $P < 0,001$ ) para os animais de maior PL (Tabela 4), os quais apresentaram maior consumo de proteína bruta (PB). Maiores valores de excreção urinária de UR para animais com maior ingestão de nitrogênio dietético foram descritos por Valadares et al. (1999) trabalhando com vacas em lactação e por Pereira (2009), utilizando novilhas Nelore.

A excreção diária de CR, expressa em g ou mg/kg de peso corporal, não apresentou diferença ( $P > 0,117$ ) entre os níveis de produção de leite, sendo em média 20,41 mg/kg PC (Tabela 4). Trabalhando com vacas em lactação com níveis crescentes de inclusão de N na dieta, Silva et al. (2001) encontraram excreção média de creatinina de 23,60 mg/kg PC, enquanto Oliveira et al. (2001) relataram excreção média de creatinina de 23,41 mg/kg PC. Chizzotti et al. (2008), trabalhando com vacas de diferentes níveis de produção de leite, obtiveram valor médio da excreção de creatinina de 24,04 mg/kg PC e concluíram que tal excreção independe do nível de produção, ingestão matéria seca e tempo em lactação. O valor médio obtido foi aproximadamente 13% menor que os trabalhos citados, contudo percebe-se que há coerência entre os resultados da literatura, principalmente no que se refere do efeito da PL sobre a excreção de CR e perfil de excreção ao longo do dia, conforme será discutido posteriormente.

A excreção diária de DP, expressa em mmol/d, não apresentou diferença ( $P > 0,515$ ) entre os animais de diferentes produções de leite (Tabela 4). Valadares et al. (1999), que encontraram diferença significativa da excreção de DP mmol/dia para vacas em lactação com diferentes níveis de ingestão de N, enquanto Chizzotti et al. (2007) não encontraram diferença significativa para excreção diária de DP (mmol) entre vacas de alta e média PL, entretanto, a excreção de DP de vacas de alta PL foi maior do que para as vacas de baixa PL. A constância na excreção diária de DP demonstra que independente do nível de produção, houve uma mesma síntese de proteína microbiana, e que houve um acréscimo na proteína não degradada no rúmen com o aumento da PL dos animais (NRC, 2001). Além disso, percebe-se que o N em excesso no rúmen não foi utilizado para síntese de Pmic, mas foi excretado na urina na forma de uréia (Tabela 4).

As relações urinárias UR:CR e NT:CR foram maiores ( $P < 0,001$ ) e ( $P < 0,040$ ), respectivamente, para os animais de alta produção de leite em relação aos de baixa produção (Tabela 4), e a relação DP:CR não apresentou diferença entre os animais de diferentes produções de leite ( $P > 0,097$ ), reflexo das diferentes ingestões de PB dietética e constância na produção de Pmic, conforme discutido anteriormente.

Quanto à excreção ao longo do dia de creatinina, expressa em mg/kgPC a partir de coleta 2hTL (*Material suplementar*), não houve interação nem efeitos individuais ( $P > 0,05$ ) de período de coleta ao longo do dia e de produção de leite. Valadares et al. (1997) não encontraram diferenças nas excreções de creatinina obtidas durante 12, 24, 48, ou 72 h de coleta total e recomendaram a utilização de coleta total 24 h para estimar a produção diária de urina. Chizzoti et al. (2008), utilizando coletas totais de urina com duração de 6, 12, 18 ou 24 h, não observaram efeitos de períodos ao longo do dia sobre as excreções de creatinina, expressas em mg/kg PC. Pereira (2009), utilizando novilhas Nelore, não encontrou diferença para excreção de creatinina em mg/kgPC em coletas totais de urina de 2 em 2 h. A partir desses resultados, observa-se a constância da excreção de CR ao longo do dia, isso permite que a CR seja usada como parâmetro para calcular as relações com demais compostos de interesse.

Não houve efeito de interação, nem de efeitos individuais ( $P > 0,05$ ) dos períodos de coleta ao longo do dia e dos níveis de PL para a relação DP:CR a partir de coleta 2hTL (*Material suplementar*). A ausência de diferença significativa entre relações DP:CR obtidas ao longo do dia também foi descrita por Chen et al. (1995) e Pereira (2009), que realizaram coletas totais de urina de 2 em 2h em ovelhas e novilhas Nelore, respectivamente. Esses resultados permitem que a produção de DP seja estimada por meio de coleta em 2hTL em qualquer horário do dia.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) da PL e do período de coleta sobre as relações UR:CR (Figura 1) e NT:CR (Figura 2) para coleta 2hTL. Ocorreram oscilações ao longo do dia tanto na relação UR:CR quanto na relação NT:CR, o que mostrou a existência de períodos não representativos para estimação da excreção diária.

Os horários de coleta 2hTL mais representativos da relação média UR:CR estão destacados em cinza na Figura 1. Observou-se picos de excreção de UR nos horários de 14h e 16h para todos os níveis de PL. Assim, para obter uma amostra representativa da excreção total de 24h, sugere-se a amostragem total de 2 em 2h nos horários 2, 4, 6, 8, 12, 18, 20 ou 24 h.

Observou-se, na Figura 2, que a variação da relação NT:CR é pequena ao longo do dia em coleta 2hTL, mas, ainda assim existem horários não representativos. Os horários sugeridos para coletas representativas da excreção diária de UR são 2, 4, 6, 8, 10, 16, 18, 22 ou 24 h.

Para as coletas 2hSp, traçou-se as relações UR:CR (Figure 3) e NT:CR (Figure 4) e observou-se que não existe um padrão das relações UR:CR e NT:CR. De forma semelhante, Pereira (2009), a partir de coletas 2hSp, traçou um perfil das relações UR:CR e NT:CR ao longo do dia e também não encontrou um padrão nessa relação ao longo do dia. Assim, percebe-se que nos horários de 4, 8, 10, 12, 14, 18 ou 24 h (Figure 3) as relações UR:CR são representativas da coleta total em 24h (24hTL), a partir de coletas 2hSp, para todos os níveis de PL. Para as relações de NT:CR, observou-se que os horários de 4, 6, 10, 16h, 18, 20, 22 ou 24 h são representativos da coleta 24hTL, a partir de coletas 2hSp (Figure 4).

A partir das observações nas Figuras 3 e 4, nota-se que diversos horários de coleta 2hSp são representativos para estimar a produção de compostos nitrogenados em 24 h. Porém, observa-se que em alguns horários o intervalo de confiança da coleta 2hSp, mesmo não sendo diferente significativamente da média da coleta 24hTL, estão muito próximos do limite do intervalo de confiança. Dessa maneira, com objetivo de reduzir possíveis erros de estimação das excreções de compostos nitrogenados, indica-se realizar a coleta em pelo menos 3 dos horários sugeridos e, a partir dessas fazer uma média. Assim, de forma prática, indica-se os horários de 10, 18 e 24 h, considerando momentos distintos do dia e sendo ambos representativos para NT e UR, além disso evita-se as coletas durante o período da madrugada. Adicionalmente, percebe-se que a coleta 2hSp é igualmente eficiente à coleta 2hTL para estimação de CN e DP nos horários sugeridos, não sendo, portanto, necessário esse tipo de coleta, uma vez que a coleta *spot* é consideravelmente menos trabalhosa.

Por fim, tanto a partir da coleta 2hSp, com a partir da coleta 2hTL, observa-se que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para relação DP:CR ao longo do dia, sendo que todos os horários foram representativos da coleta 24hTL (*Material Suplementar*). Em estudo semelhante, Chen et al. (1995) e Pereira (2009) não observaram variação diurna da relação DP:C para excreções de urina de ovinos e novilhos Nelore, respectivamente, e concluíram que amostra *spot* em qualquer horário poderia ser utilizada para estimar a excreção diária de DP. Já Valadares et al. (1999), Oliveira et al. (2001) e Chizzotti et al. (2007), trabalharam com vacas em lactação e estimaram a excreção de DP diária por meio

de coleta total 24h e coleta *spot* 4h depois da primeira alimentação e verificaram mesmo padrão para estimar a DP em ambos os métodos. Dessa maneira, recomenda-se a coleta *spot* para estimar DP em qualquer horário do dia, mas, caso tenha-se interesse em estimar na mesma coleta *spot* compostos nitrogenados e DP, sugere-se a coleta nos horários de 10h, 18h e 24h.

Diferente dos demais autores que trabalharam com a estimação de excreção urinária de DP e compostos nitrogenados (CN) em vacas de origem leiteira, nesse estudo foi descrito um perfil diário da excreção de CR e suas relações com DP, NT e UR, a partir de uma alta frequência de horários de coleta (2h em 2h), o que gerou maior confiança para análise desse perfil e, em consequência, maior segurança para indicar horários representativos de coletas para estimação da excreção diária dos CN e DP. O estudo também mostrou, de forma prática, quais são os melhores horários para coletas 2hTL e 2hSp que sejam representativos para estimar a excreção diária de DP, NT e UR, para diferentes níveis de PL, em horários similares.

#### **4- CONCLUSÕES**

A excreção de creatinina, expressa em mg/kgPC, e a relação DP:C não variaram em coletas totais e *spot* de 2h em 2h, respaldando a recomendação de que a coleta *spot* de urina seja efetuada a qualquer horário do dia para estimar a excreção de DP diária. Adicionalmente, sugere-se a coleta de urina *spot* nos horários de 10, 18 e 24 h para estimação simultânea da excreção diária de CN e DP para todos níveis de produção de leite.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa, A.M., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.d.C., Vêras, R.M.L., Leão, M.I., Detmann, E., Paulino, M.F., Marcondes, M.I., Souza, M.A.d., 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. *Braz J Anim Sci* 35, 870-877.

Belenguer, A., Yañez, D., Balcells, J., Ozdemir Baber, N.H., Gonzalez Ronquillo, M., 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livest Prod Sci* 77, 127-135.

Broderick, G.A., Merchen, N.R., 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J Dairy Sci* 75, 2618-2632.

Chen, X.B., Gomes, M.J., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details. Rowett Research Institute, Bucksburnd Aberdeen.

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. *J Anim Sci* 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. *J Agr Sci* 125, 137-143.

Chen, X.B., Ørskov, E.R., Hovell, F.D.D., 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br J Nut* 63, 121-129.

Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Marcondes, M.I., Fonseca, M.A., 2007. Intake, digestibility and nitrogen metabolism in Holstein cows with different milk production levels. *Braz J Anim Sci* 36, 138-146.

Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.d.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. *Livest Sci* 113, 218-225.

Cochran, R.C., Adams, D.C., Wallace, J.D., Galyean, M.L., 1986. Predicting Digestibility of Different Diets with Internal Markers: Evaluation of Four Potential Markers<sup>1</sup>. *J Anim Sci* 63, 1476-1483.

Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C., Queiróz, A.C., Berchielli, T.T., Saliba, E.O.S., Cabral, L.S., Pina, D.S., Ladeira, M.M., Azevedo, J.A.G., 2012. *Methods for feed analysis - INCT - Animal Science*. Suprema Gráfica, Visconde do Rio Branco, BR.

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. *Am J Vet Res* 52, 5-8.

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. *J Agr Sci* 109, 7-12.

Leal, T.L., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Leão, M.I., Detmann, E., Barbosa, A.M., Chizzotti, M.L., Paixão, M.L., 2007. Daily variation in the excretion of creatinine and purine derivatives in steers. *Braz J Anim Sci* 36, 896-904.

NRC, 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*, 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.

Oliveira, A.S., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.d.C., Cecon, P.R., Rennó, L.N., Queiroz, A.C.d., Chizzotti, M.L., 2001. Microbial Protein Production, Purine Derivatives and Urea Excretion Estimate in Lactating Dairy Cows Fed Isoprotein Diets with Different Non Protein Nitrogen Compounds Levels. *Braz J Anim Sci* 30, 1621-1629.

Orellana Boero, P., Balcells, J., Martín-Orúe, S.M., Liang, J.B., Guada, J.A., 2001. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livest Prod Sci* 68, 243-250.

Pereira, V.S.A., 2009. Influence of body weight and carcass traits on creatinine excretion and use of spot urine collection to estimate the excretion of purine derivatives and nitrogenous compounds in heifers, Veterinary Department. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil, p. 55.

Perez, J.F., Balcells, J., Guada, J.A., Castrillo, C., 1996. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using <sup>15</sup>N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. *Br J Nut* 75, 699-709.

Pregolato, W., Pregolato, N.P., 1985. Analytical standards of the Adolfo Lutz Institute - chemical and physical methods for food analysis, 3rd Edition ed. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Rennó, L.N., Valadares Filho, S.d.C., Valadares, R.F.D., Paulino, M.F., Rennó, F.P., Silva, P.A., 2008. Urea levels in diet for steers of four genetic groups: microbial protein production by the urinary purine derivatives, using two collection methodologies. *Braz J Anim Sci* 37, 546-555.

Silva, R.M.N.d., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.d.C., Cecon, P.R., Rennó, L.N., Silva, J.M.d., 2001. Urea for Dairy Cows. 2. Estimates of Urinary Volume, Microbial Production and Urea Excretion. *Braz J Anim Sci* 30, 1948-1957.

Sklan, D., Ashkenazi, R., Braun, A., Devorin, A., Tabori, K., 1992. Fatty Acids, Calcium Soaps of Fatty Acids, and Cottonseeds Fed to High Yielding Cows. *J. Dairy Sci.* 75, 2463-2472.

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<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 80, 1695-1702.

Valadares Filho, S.C., 1995. Microbial protein synthesis efficiency, ruminal degradation and intestinal digestibility of crude protein in cattle, International symposium on nutrient requirements of ruminants. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil, pp. 355-388.

Valadares, R.F.D., Broderick, G.A., Filho, S.C.V., Clayton, M.K., 1999. Effect of Replacing Alfalfa Silage with High Moisture Corn on Ruminal Protein Synthesis

Estimated from Excretion of Total Purine Derivatives<sup>1</sup>. J. Dairy Sci. 82, 2686-2696.

Valadares, R.F.D., Gonçalves, L.C., Sampaio, I.B.M., Valadares Filho, S.C., 1997. Methodology for Urine Collection in Cows Using Foley Catheters. Braz J Anim Sci 26, 1279-1282.

## **6- TABELAS E FIGURAS**

Tabela 1. Proporção dos ingredientes nos concentrados, com base na matéria natural

<u>Alimento</u>	<u>%</u>
-----------------	----------

---

Fubá de milho	48,24
Farelo de soja	46,63
Calcário	1,81
Bicarbonato de sódio	1,24
Fosfato bicálcico	1,13
Óxido de magnésio	0,60
Flor de enxofre	0,21
Vitaminas	0,10
Rumensin	0,02
Premix Mineral <sup>1</sup>	0,02

---

<sup>1</sup> Composição centesimal: Sulfato de manganês: 47,1; Sulfato de zinco: 45,3; Sulfato de cobre: 6,8; Sulfato de potássio: 0,1; Selenito de sódio: 0,6; Sulfato de Cobalto: 0,1

Tabela 2. Teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE); fibra em detergente neutro (FDN); carboidratos não fibrosos (CNF); fibra indigestível em detergente neutro (FDNi) da silagem e do concentrado

Itens	Alimentos	
	Silagem %	Concentrado%
MS	26,37	84,84
MO	94,96	91,37
PB	6,44	27,36
EE	2,08	2,18
FDN	55,19	13,55
CNF	31,24	48,27
FDNi	16,03	3,61

Tabela 3. Consumo de proteína, produção (kg) e composição do leite (%) das vacas de alta, média e baixa produção.

ITEM	Produção de Leite			EPM	P
	Alta	Média	Baixa		
Consumo de PB	3,47 a	2,75 b	1,98 c	0,09	<,001
Produção de Leite	30,26 a	22,86 b	14,16 c	1,12	<,001
PL 3,5% de Gordura	31,58 a	24,06 b	14,65 c	1,49	<,001
Gordura	4,30	4,40	4,21	0,34	0,923
Proteína	3,00	2,95	3,21	0,11	0,081
Lactose	4,07	4,19	4,14	0,10	0,697
Sólidos Totais	12,45	12,59	12,68	0,4	0,924

<sup>a, b, c</sup> – Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade

Tabela 4. Estimativa das excreções urinárias diárias de uréia (UR), nitrogênio total (NT), creatinina (CR) e derivados de purinas (DP) e as relações UR:CR, NT:CR e DP:CR obtidas a partir da coleta total de 24h das vacas de alta, média e baixa produções de leite

ITEM	Produção de Leite			EPM	P
	Alta	Média	Baixa		
UR (g)	321,06a	196,38b	119,25c	20,31	0,001
NT (g)	273,86a	173,32b	96,65c	22,30	0,001
CR (g)	12,10	10,29	10,33	0,64	0,117
<sup>1</sup> CR (mg/kgPC)	21,72	19,37	20,26	1,10	0,358
<sup>2</sup> DP (mmol/d)	403,47	367,49	352,92	33,69	0,515
<sup>3</sup> UR:CR	25,90ab	22,40ab	12,55c	0,82	0,001
<sup>3</sup> NT:CR	20,99ab	16,67ab	11,13b	0,23	0,040
<sup>4</sup> DP:CR	22,17	21,65	20,36	0,57	0,097

<sup>1</sup> - Relações calculadas a partir da concentração expressa em mg/L

<sup>2</sup> - Relações calculadas a partir da concentração expressa em mmol/L

<sup>3</sup> - Excreção diária calculada em mg por quilo de peso corporal

<sup>4</sup> - Excreção diária em mmol/dia

a, b, c – Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade

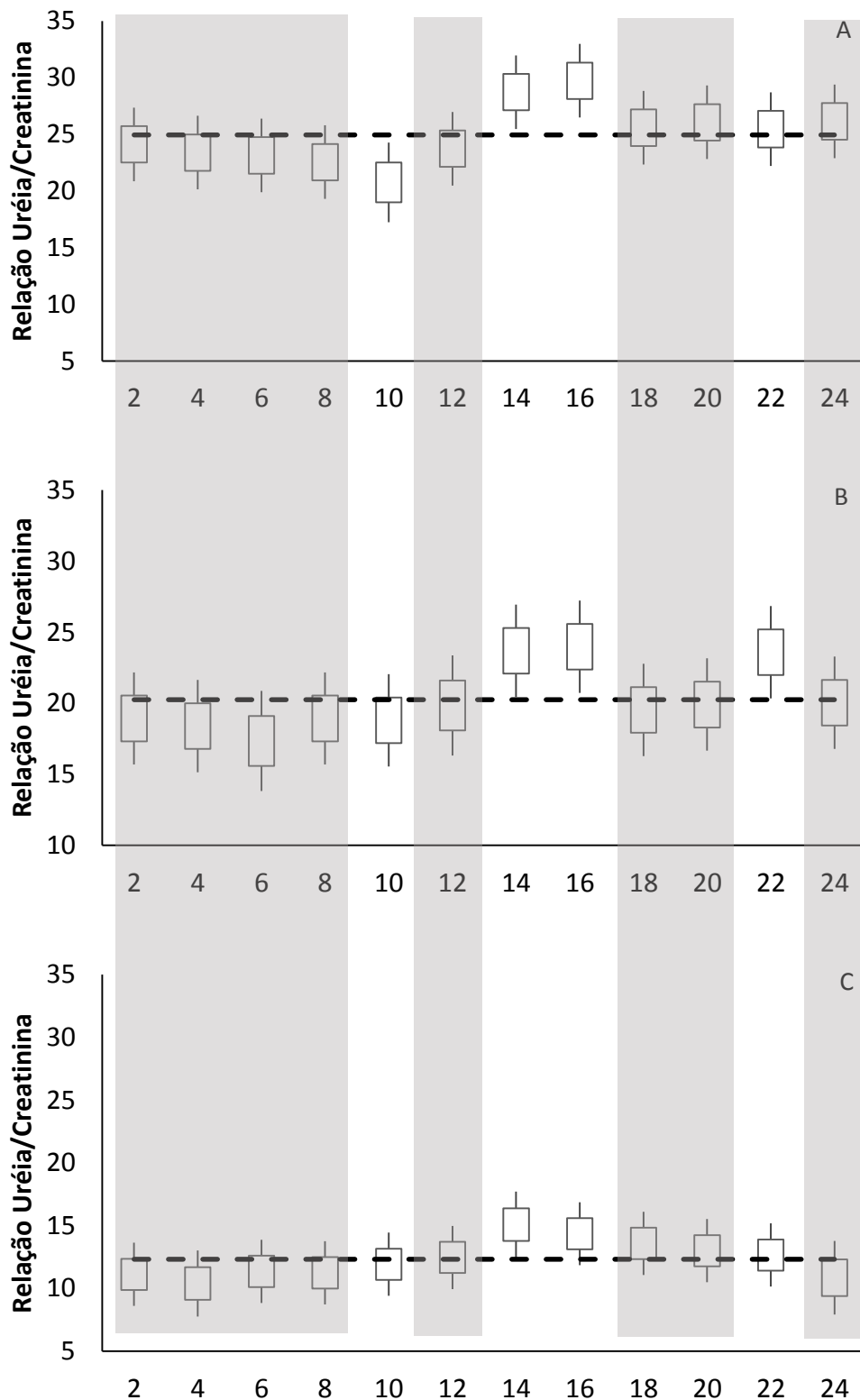


Figura 1 – Comparação da relação Ureia: Creatinina, expressas em mg/mL, nas coletas totais a cada 2h ao longo do dia com a coleta total 24h (linha tracejada) para as vacas de alta (A), média (B) e baixa (C) produções de leite. Boxplot construído como o box sendo a média  $\pm$  um desvio padrão e linhas representando o intervalo de confiança ( $P < 0,05$ ) da média. Intervalos de confiança que interceptam a média de 24h não diferem entre si pelo teste  $t$  de Student a 5% de probabilidade. A faixa cinza indica relação UR:CR igual à média de 24h.

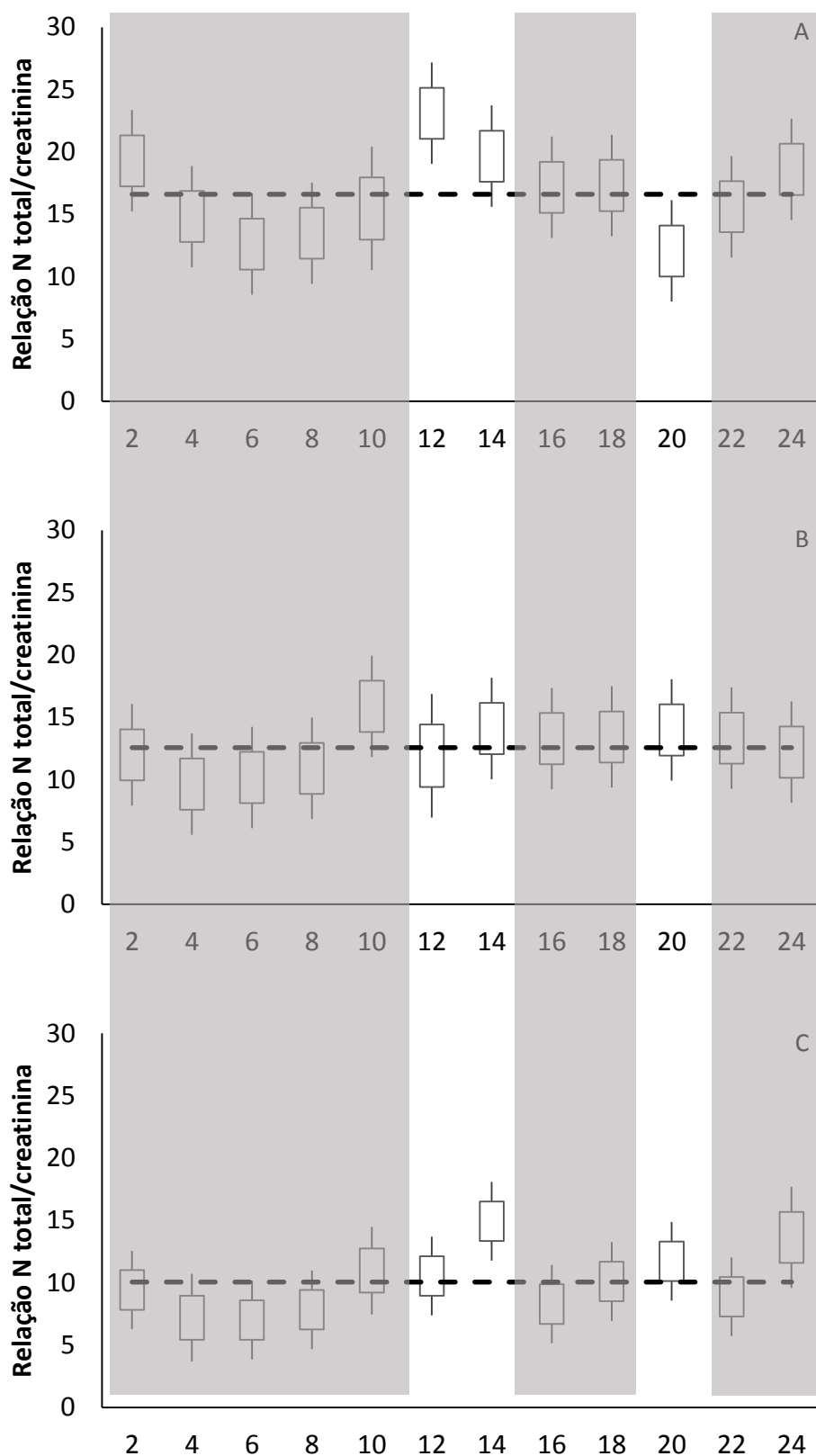


Figura 2 – Comparação da relação Nitrogênio Total: Creatinina, expressa em mg/mL, nas coletas totais a cada 2h ao longo do dia com a coleta total 24h (linha tracejada) para as vacas de alta (A), média (B) e baixa (C) produções. Boxplot construído como o box sendo a média  $\pm$  um desvio padrão e linhas representando o intervalo de confiança ( $P < 0,05$ ) da média. Intervalos de confiança que interceptam a média de 24h não diferem entre si pelo teste  $t$  de Student a 5% de probabilidade. A faixa cinza indica relação UR:CR igual à média de 24h.

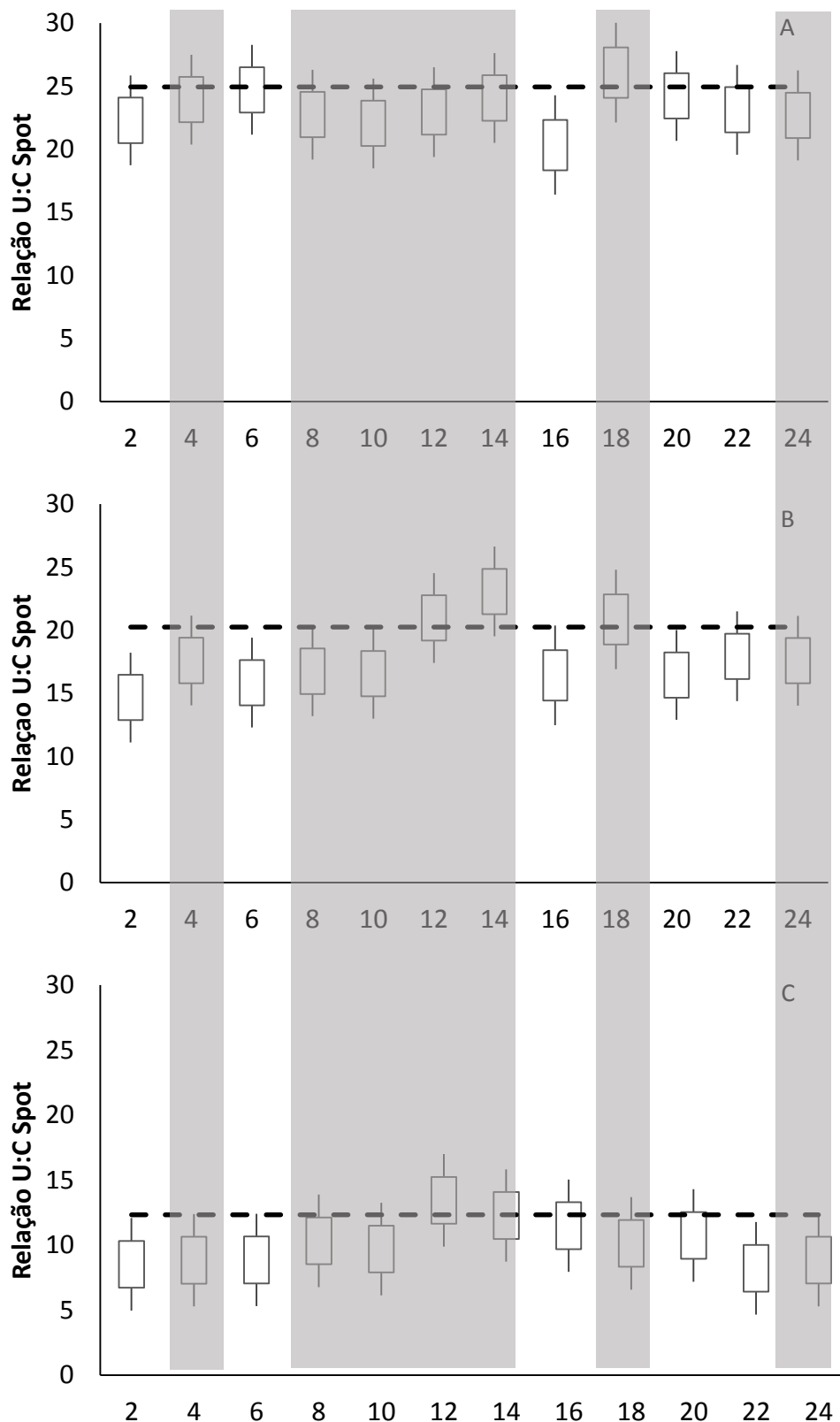


Figura 3 – Comparação da relação Uréia: Creatinina, expressa em mg/mL, na coleta *spot* a cada 2h ao longo do dia com a coleta total 24h (linha tracejada) para as vacas de alta (A), média (B) e baixa (C) produções de leite. Boxplot construído como o box sendo a média  $\pm$  um desvio padrão e linhas representando o intervalo de confiança ( $P < 0,05$ ) da média. Intervalos de confiança que

interceptam a média de 24h não diferem entre si pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade. A faixa cinza indica relação UR:CR igual à média de 24h.

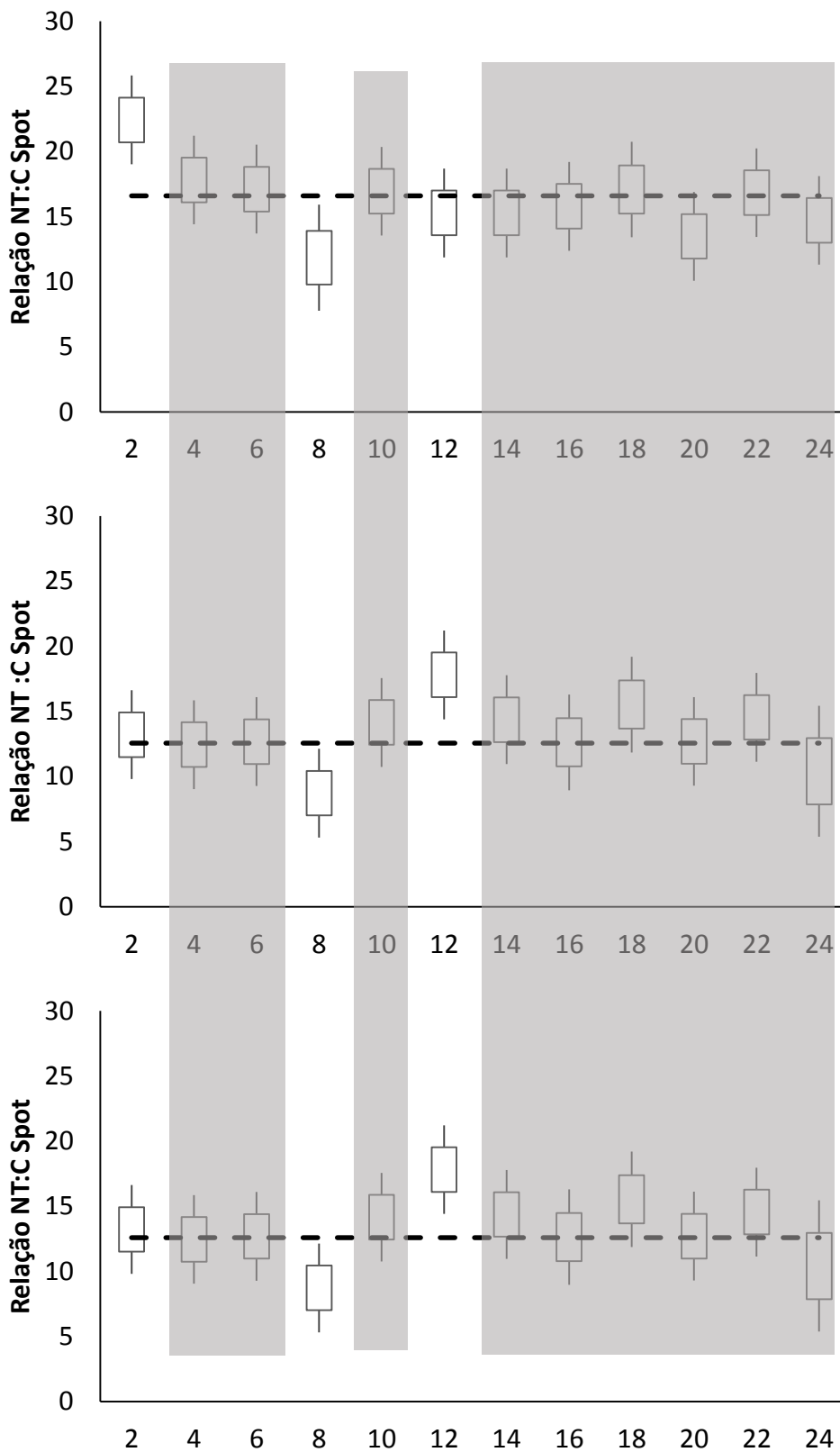


Figura 4 – Comparação da relação Nitrogênio Total: Creatinina, expressas em mg/mL, na coleta *spot* a cada 2h ao longo do dia com a coleta total 24h (linha tracejada) para as vacas de alta (A), média (B) e baixa (C) produções. Boxplot construído como o box sendo a média  $\pm$  um desvio

padrão e linhas representando o intervalo de confiança ( $P < 0,05$ ) da média. Intervalos de confiança que interceptam a média de 24h não diferem entre si pelo teste  $t$  de Student a 5% de probabilidade. A faixa cinza indica relação UR:CR igual à média de 24h.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Consumo e digestibilidade aparente dos constituintes das dietas de vacas de alta, média e baixa produções de leite.

ITEM	Produção de Leite			EPM	P
	Alta	Média	Baixa		
	Consumos (Kg/dia)				
MS	20,63 a	17,70 b	15,57 c	0,50	<,001
FDN	7,02	6,43	6,63	0,29	0,379
CNF	8,28 a	6,98 b	5,66 c	1,17	<,001
NDT	12,90 a	11,56 b	9,87 c	0,37	<,001
	Consumos %PC				
MS	3,70 a	3,36 ab	3,06 b	0,15	0,029
FDN	1,26	1,22	1,30	0,08	0,754
	Digestibilidade %				
MS	62,52	65,35	63,29	1,48	0,404
PB	71,57	73,50	69,07	1,45	0,139
FDN	39,10 b	44,40 ab	47,18 a	1,78	0,022
CNF	82,86	85,39	83,09	1,38	0,389
NDT	63,00	66,00	63,00	0,02	0,343

<sup>a, b, c</sup> – Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo *t* de Student a 5% de probabilidade

Tabela S2. Médias de excreção de creatinina em mg/kg de peso corporal, obtidas a partir de coleta total de 2h em 2h para as vacas de alta, média e baixa produções de leite

Período	Nível de produção de leite		
	Alta	Média	Baixa
24h00-02h00	2,120 $\pm$ 0,202	2,156 $\pm$ 0,202	1,825 $\pm$ 0,157
02h00-04h00	1,431 $\pm$ 0,202	1,533 $\pm$ 0,247	2,035 $\pm$ 0,202
04h00-06h00	2,236 $\pm$ 0,248	1,755 $\pm$ 0,202	1,834 $\pm$ 0,175
06h00-08h00	1,617 $\pm$ 0,350	1,406 $\pm$ 0,248	1,892 $\pm$ 0,157
08h00-10h00	1,748 $\pm$ 0,248	1,790 $\pm$ 0,350	1,475 $\pm$ 0,247
10h00-12h00	1,628 $\pm$ 0,248	1,806 $\pm$ 0,248	2,328 $\pm$ 0,202
12h00-14h00	1,970 $\pm$ 0,202	1,533 $\pm$ 0,202	1,933 $\pm$ 0,157
14h00-16h00	1,859 $\pm$ 0,202	2,016 $\pm$ 0,202	1,826 $\pm$ 0,175
16h00-18h00	1,885 $\pm$ 0,202	1,674 $\pm$ 0,202	1,951 $\pm$ 0,175
18h00-20h00	1,732 $\pm$ 0,202	1,792 $\pm$ 0,202	1,832 $\pm$ 0,175
20h00-22h00	1,746 $\pm$ 0,202	1,580 $\pm$ 0,202	2,225 $\pm$ 0,175
22h00-24h00	2,022 $\pm$ 0,350	1,722 $\pm$ 0,202	1,768 $\pm$ 0,202
Média <sup>2</sup>	1,833 $\pm$ 0,074	1,730 $\pm$ 0,07	1,910 $\pm$ 0,057

<sup>1</sup> Excreções calculadas a partir da concentração em mg/kg de peso corporal

<sup>2</sup> P valores para Produção de Leite (P = 0,156), Período (P=0,520) e Interação Período x Produção de Leite (P = 0,256).

Tabela S3. Médias da relação derivado de purina: creatinina (<sup>1</sup>DP:C) a partir de coleta total de 2h em 2h para as vacas de alta, média e baixa produções de leite

Período	Nível de produção de leite		
	Alta	Média	Baixa
24h00-02h00	18,378 <sub>±2,242</sub>	21,302 <sub>±2,243</sub>	19,828 <sub>±1,420</sub>
02h00-04h00	18,973 <sub>±1,833</sub>	18,782 <sub>±2,243</sub>	16,583 <sub>±2,236</sub>
04h00-06h00	17,149 <sub>±2,240</sub>	17,074 <sub>±2,245</sub>	18,172 <sub>±1,420</sub>
06h00-08h00	19,343 <sub>±1,833</sub>	21,277 <sub>±2,242</sub>	20,678 <sub>±1,586</sub>
08h00-10h00	18,600 <sub>±1,833</sub>	18,196 <sub>±1,833</sub>	20,653 <sub>±1,829</sub>
10h00-12h00	18,642 <sub>±2,242</sub>	17,151 <sub>±2,242</sub>	19,409 <sub>±1,585</sub>
12h00-14h00	20,464 <sub>±3,169</sub>	22,258 <sub>±2,242</sub>	21,581 <sub>±1,420</sub>
14h00-16h00	21,262 <sub>±3,169</sub>	20,524 <sub>±1,833</sub>	20,54 <sub>±2,238</sub>
16h00-18h00	22,200 <sub>±2,242</sub>	21,292 <sub>±1,833</sub>	18,822 <sub>±2,239</sub>
18h00-20h00	20,143 <sub>±1,833</sub>	19,53 <sub>±2,242</sub>	18,707 <sub>±1,586</sub>
20h00-22h00	19,749 <sub>±1,833</sub>	21,694 <sub>±2,245</sub>	18,888 <sub>±1,420</sub>
22h00-24h00	19,363 <sub>±1,833</sub>	18,106 <sub>±2,245</sub>	21,135 <sub>±2,240</sub>
Média <sup>2</sup>	19,522 <sub>±0,682</sub>	19,766 <sub>±0,663</sub>	19,583 <sub>±0,548</sub>

<sup>1</sup>-Relações calculadas a partir da concentração mmol/L

<sup>2</sup>- P valores para Produção de Leite (P =0,964), Período (P=0,507) e Interação Período x Produção de Leite (P =0,994).

Tabela S4. Médias da relação ureia: creatinina (<sup>1</sup>U:C) a partir de coleta total de em 2h para as vacas de alta, média e baixa produções de leite

Período	Nível de produção de leite		
	Alta	Média	Baixa
24h00-02h00	24,108 $\pm$ 1,608	18,934 $\pm$ 1,608	11,118 $\pm$ 1,246
02h00-04h00	23,379 $\pm$ 1,608	18,389 $\pm$ 1,608	10,387 $\pm$ 1,305
04h00-06h00	23,132 $\pm$ 1,608	17,352 $\pm$ 1,759	11,356 $\pm$ 1,246
06h00-08h00	22,539 $\pm$ 1,608	18,933 $\pm$ 1,608	11,240 $\pm$ 1,246
08h00-10h00	20,753 $\pm$ 1,759	18,799 $\pm$ 1,608	11,924 $\pm$ 1,246
10h00-12h00	23,725 $\pm$ 1,608	19,847 $\pm$ 1,759	12,465 $\pm$ 1,246
12h00-14h00	28,721 $\pm$ 1,608	23,699 $\pm$ 1,608	15,082 $\pm$ 1,305
14h00-16h00	29,720 $\pm$ 1,608	23,981 $\pm$ 1,608	14,355 $\pm$ 1,246
16h00-18h00	25,576 $\pm$ 1,608	19,529 $\pm$ 1,608	13,586 $\pm$ 1,246
18h00-20h00	26,054 $\pm$ 1,608	19,912 $\pm$ 1,608	13,002 $\pm$ 1,246
20h00-22h00	25,453 $\pm$ 1,608	23,594 $\pm$ 1,608	12,658 $\pm$ 1,246
22h00-24h00	26,138 $\pm$ 1,608	20,038 $\pm$ 1,608	10,844 $\pm$ 1,461
Média <sup>2</sup>	24,942 $\pm$ 0,924	20,251 $\pm$ 0,925	12,335 $\pm$ 0,718

<sup>1</sup>-Relações calculadas a partir da concentração mg/l

<sup>2</sup>- P valores para Produção de Leite (P <0,001), Período (P<0,001) e Interação Período x Produção de Leite (P =0,343).

Tabela S5. Médias da relação nitrogênio total: creatinina (<sup>1</sup>NT:C) a partir de coleta total de 2h em 2h para as vacas de alta, média e baixa produções de leite.

Período	Nível de produção de leite		
	Alta	Média	Baixa
24h00-02h00	19,287 <sub>±2,047</sub>	11,986 <sub>±2,047</sub>	9,415 <sub>±1,586</sub>
02h00-04h00	14,814 <sub>±2,047</sub>	9,641 <sub>±2,047</sub>	7,195 <sub>±1,768</sub>
04h00-06h00	12,609 <sub>±2,047</sub>	10,173 <sub>±2,047</sub>	6,998 <sub>±1,586</sub>
06h00-08h00	13,476 <sub>±2,047</sub>	10,906 <sub>±2,047</sub>	7,825 <sub>±1,586</sub>
08h00-10h00	15,468 <sub>±2,496</sub>	15,881 <sub>±2,047</sub>	10,969 <sub>±1,768</sub>
10h00-12h00	23,101 <sub>±2,047</sub>	11,917 <sub>±2,496</sub>	10,535 <sub>±1,586</sub>
12h00-14h00	19,655 <sub>±2,047</sub>	14,103 <sub>±2,047</sub>	14,922 <sub>±1,586</sub>
14h00-16h00	17,165 <sub>±2,047</sub>	13,291 <sub>±2,047</sub>	8,285 <sub>±1,586</sub>
16h00-18h00	17,305 <sub>±2,047</sub>	13,424 <sub>±2,047</sub>	10,091 <sub>±1,586</sub>
18h00-20h00	12,055 <sub>±2,047</sub>	13,985 <sub>±2,047</sub>	11,708 <sub>±1,586</sub>
20h00-22h00	15,601 <sub>±2,047</sub>	13,331 <sub>±2,047</sub>	8,875 <sub>±1,586</sub>
22h00-24h00	18,600 <sub>±2,047</sub>	12,208 <sub>±2,047</sub>	13,634 <sub>±2,042</sub>
Média <sup>2</sup>	16,595 <sub>±0,670</sub>	12,571 <sub>±0,67</sub>	10,038 <sub>±0,53</sub>

<sup>1</sup>-Relações calculadas a partir da concentração mg/l

<sup>2</sup>-P valores para Produção de Leite (P <0,001), Período (P<0,001) e Interação Período x Produção de Leite (P =0,324 ).

Tabela S6. Médias da relação ureia: creatinina (<sup>1</sup>U:C) a partir de coleta *spot* a cada 2h para as vacas de alta, média e baixa produções de leite.

Período	Nível de produção de leite		
	Alta	Média	Baixa
24h00-02h00	22,291 <sub>±1,798</sub>	14,666 <sub>±1,798</sub>	8,521 <sub>±1,798</sub>
02h00-04h00	23,934 <sub>±1,798</sub>	17,599 <sub>±1,798</sub>	8,842 <sub>±1,798</sub>
04h00-06h00	24,704 <sub>±1,798</sub>	15,84 <sub>±1,798</sub>	8,865 <sub>±1,798</sub>
06h00-08h00	22,747 <sub>±1,798</sub>	16,746 <sub>±1,798</sub>	10,331 <sub>±1,798</sub>
08h00-10h00	22,046 <sub>±1,798</sub>	16,552 <sub>±1,798</sub>	9,709 <sub>±1,798</sub>
10h00-12h00	22,950 <sub>±1,798</sub>	20,971 <sub>±1,798</sub>	13,440 <sub>±1,798</sub>
12h00-14h00	24,063 <sub>±1,798</sub>	23,071 <sub>±1,798</sub>	12,281 <sub>±1,798</sub>
14h00-16h00	20,334 <sub>±1,993</sub>	16,423 <sub>±1,993</sub>	11,498 <sub>±1,798</sub>
16h00-18h00	26,073 <sub>±1,993</sub>	20,854 <sub>±1,993</sub>	10,129 <sub>±1,798</sub>
18h00-20h00	24,224 <sub>±1,798</sub>	16,448 <sub>±1,798</sub>	10,746 <sub>±1,798</sub>
20h00-22h00	23,126 <sub>±1,798</sub>	17,929 <sub>±1,798</sub>	8,224 <sub>±1,798</sub>
22h00-24h00	22,684 <sub>±1,798</sub>	17,585 <sub>±1,798</sub>	8,858 <sub>±1,798</sub>
Média <sup>2</sup>	23,264 <sub>±0,640</sub>	17,890 <sub>±0,640</sub>	10,120 <sub>±0,633</sub>

<sup>1</sup>-Relações calculadas a partir da concentração mg/l

<sup>2</sup>-P valores para Produção de Leite (P <0,001), Período (P=0,048) e Interação Período x Produção de Leite (P =0,773).

Tabela S7. Médias da relação nitrogênio total: creatinina (<sup>1</sup>NT:C) a partir de coleta spot a cada 2h para as vacas de alta, média e baixa produções de leite.

Período	Nível de produção de leite		
	Alta	Média	Baixa
24h00-02h00	22,427 <sub>±1,714</sub>	13,210 <sub>±1,714</sub>	9,806 <sub>±1,714</sub>
02h00-04h00	17,810 <sub>±1,714</sub>	12,446 <sub>±1,714</sub>	7,915 <sub>±1,714</sub>
04h00-06h00	17,112 <sub>±1,714</sub>	12,682 <sub>±1,714</sub>	7,479 <sub>±1,714</sub>
06h00-08h00	11,853 <sub>±2,061</sub>	8,722 <sub>±1,714</sub>	6,345 <sub>±1,714</sub>
08h00-10h00	16,949 <sub>±1,714</sub>	14,151 <sub>±1,714</sub>	11,806 <sub>±1,852</sub>
10h00-12h00	15,282 <sub>±1,714</sub>	17,802 <sub>±1,714</sub>	9,434 <sub>±1,714</sub>
12h00-14h00	15,282 <sub>±1,714</sub>	14,365 <sub>±1,714</sub>	9,671 <sub>±1,714</sub>
14h00-16h00	15,794 <sub>±1,714</sub>	12,625 <sub>±1,853</sub>	10,197 <sub>±1,714</sub>
16h00-18h00	17,087 <sub>±1,852</sub>	15,526 <sub>±1,853</sub>	8,370 <sub>±1,714</sub>
18h00-20h00	13,485 <sub>±1,714</sub>	12,698 <sub>±1,714</sub>	8,624 <sub>±1,714</sub>
20h00-22h00	16,840 <sub>±1,714</sub>	14,543 <sub>±1,714</sub>	8,096 <sub>±1,714</sub>
22h00-24h00	14,714 <sub>±1,714</sub>	10,406 <sub>±2,544</sub>	8,181 <sub>±1,714</sub>
Média <sup>2</sup>	16,219 <sub>±0,77</sub>	13,265 <sub>±0,781</sub>	8,827 <sub>±0,764</sub>

<sup>1</sup>Relações calculadas a partir da concentração mg/l

<sup>2</sup>P valores para Produção de Leite (P <0,001), Período (P<0,001) e Interação Período x Produção de Leite (P =0278).

Tabela S8. Médias da relação derivados de purina: creatinina (<sup>1</sup>DP:C) a partir de coleta *spot* a cada 2h para as vacas de alta, média e baixa produções de leite.

Período	Nível de produção de leite		
	Alta	Média	Baixa
24h00-02h00	18,405 <sub>±1,987</sub>	19,597 <sub>±2,056</sub>	19,296 <sub>±1,313</sub>
02h00-04h00	18,973 <sub>±1,623</sub>	17,162 <sub>±2,056</sub>	15,955 <sub>±2,046</sub>
04h00-06h00	16,950 <sub>±1,623</sub>	15,372 <sub>±2,056</sub>	17,638 <sub>±1,313</sub>
06h00-08h00	19,343 <sub>±1,623</sub>	19,662 <sub>±2,056</sub>	19,914 <sub>±1,455</sub>
08h00-10h00	18,597 <sub>±1,623</sub>	17,048 <sub>±1,660</sub>	19,814 <sub>±1,655</sub>
10h00-12h00	18,780 <sub>±1,987</sub>	15,542 <sub>±2,056</sub>	18,708 <sub>±1,483</sub>
12h00-14h00	23,780 <sub>±1,987</sub>	20,617 <sub>±2,056</sub>	21,048 <sub>±1,313</sub>
14h00-16h00	21,180 <sub>±2,811</sub>	19,374 <sub>±1,660</sub>	18,978 <sub>±2,126</sub>
16h00-18h00	22,135 <sub>±1,987</sub>	20,144 <sub>±1,660</sub>	18,431 <sub>±2,105</sub>
18h00-20h00	20,143 <sub>±1,623</sub>	17,832 <sub>±2,056</sub>	18,068 <sub>±1,483</sub>
20h00-22h00	19,750 <sub>±1,623</sub>	19,972 <sub>±2,056</sub>	18,352 <sub>±1,313</sub>
22h00-24h00	19,360 <sub>±1,623</sub>	16,382 <sub>±2,056</sub>	20,000 <sub>±2,046</sub>
Média <sup>2</sup>	19,783 <sub>±0,541</sub>	18,224 <sub>±0,732</sub>	18,850 <sub>±0,627</sub>

1-Relações calculadas a partir da concentração mmol/l

<sup>2</sup>P valores para Produção de Leite (P =0,214), Período (P=0,068) e Interação Período x Produção de Leite (P =0,982).