

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MAIRA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Fabiene Tomazetti dos Santos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE URINA DE BOVINOS E
OVINOS PARA ANALISAR CREATININA, UREIA E DERIVADOS DE
PURINA**

Santa Maria, RS

2019

Fabiene Tomazetti dos Santos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DE
AMOSTRAS DE URINA DE BOVINOS E OVINOS PARA ANALISAR CREATININA,
UREIA E DERIVADOS DE PURINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do **título de Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria

2019

Santos, Fabiene Tomazetti dos
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DE
AMOSTRAS DE URINA DE BOVINOS E OVINOS PARA ANALISAR
CREATININA, UREIA E DERIVADOS DE PURINA / Fabiene
Tomazetti dos Santos.- 2019.
43 p.; 30 cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2019

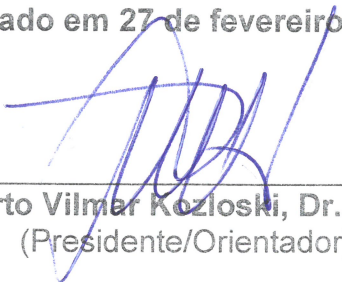
1. Ácido sulfúrico 2. Creatinina 3. Derivados de
purina 4. Hidróxido de sódio 5. Ruminantes I. Vilmar
Kozloski, Gilberto II. Título.

Fabiene Tomazetti dos Santos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DE
AMOSTRAS DE URINA DE BOVINOS E OVINOS PARA ANALISAR CREATININA,
UREIA E DERIVADOS DE PURINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2019



Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Carla Joice Härter, Dra. (UFPEL)



Mariana Patricia Mezzomo, Dra. (UFSM)

Santa Maria

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Silvio Marco e Ana Helena por todo carinho, apoio, cuidado, atenção, paciência e amor e que tiveram comigo ao longo do caminho que percorri até a realização desse sonho. Graças a vocês dois, isso pode ser realizado.

A Deus por ter colocado essa oportunidade em meu caminho.

A minha tia avó Helena Zanini Trindade (*in memoriam*), meu avô Julio Tomazetti (*in memoriam*) que mesmo não estando mais comigo fisicamente, estão em meu coração.

A minha família, de ambos os lados, materno e paterno, por todo apoio e torcida na realização desse sonho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski pela oportunidade, conhecimento, ensinamento e paciência no decorrer desse mestrado.

A todos os meus colegas do LABRUMEN, pelo companheirismo, auxílio, pois de um jeito ou de outro fizeram parte para que tudo nesse estudo pudesse ser feito.

Aos meus grandes amigos do coração que fiz no final de 2017, no decorrer de 2018 e início de 2019, pela grande amizade, carinho, paciência, apoio, dedicação, animação, sorrisos, boas risadas, atenção que tiveram comigo no decorrer desses 2 anos, muito obrigada.

A todas as pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente que não foram mencionadas acima.

A CAPES pelo financiamento, por meio de uma bolsa de estudos.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE URINA DE BOVINOS E OVINOS PARA ANALISAR CREATININA, UREIA E DERIVADOS DE PURINA

AUTORA: Fabiene Tomazetti dos Santos
ORIENTADOR: Gilberto Vilmar Kozloski

O objetivo desse estudo foi avaliar o impacto do método de conservação, processamento de amostras e tempo de conservação, sobre a concentração de metabólitos em amostras de urina de bovinos e ovinos. Foram coletadas 112 amostras de urina de bovinos leiteiros e 42 amostras de ovinos machos castrados. As amostras de urina foram conservadas em três meios de conservação: meio ácido (ácido sulfúrico), meio básico (hidróxido de sódio), meio sem conservante (água destilada). Algumas amostras de urina de ovinos foram congeladas imediatamente ou mantidas em temperatura ambiente por 12 horas antes de armazenadas em um congelador. Também foi testado o impacto da sonicação sobre a concentração de metabólitos em algumas amostras de ovinos. A determinação das concentrações dos metabólitos foi feita utilizando-se métodos colorimétricos. A concentração de uréia não foi afetada pelo tipo de conservante. As concentrações de creatinina e ácido úrico foram menores e a de alantoína foi maior nas amostras conservadas em meio básico ($P < 0,05$). A sonicação resultou em valores mais altos de alantoína ($P < 0,05$), mas não interferiu nas concentrações dos demais metabólitos. A exposição da amostra à temperatura ambiente por 12 horas não interferiu na concentração de nenhum dos metabólitos analisados, independentemente do tipo de conservante. Em conclusão, não há necessidade de adição de ácido ou base em amostras de urina para quantificar a excreção de creatinina, uréia ou ácido úrico, enquanto que uma base deve ser adicionada nas amostras para quantificação da excreção de alantoína. A sonicação de todas as amostras de urina antes da análise também é um procedimento recomendado, principalmente para análise de alantoína.

Palavras-chave: Ácido sulfúrico. Creatinina. Derivados de purina. Hidróxido de sódio. Ruminantes. Ureia.

ABSTRACT

EVALUATION OF METHODS OF CONSERVATION AND PROCESSING OF URINE SAMPLES OF CATTLE AND SHEEP FOR ANALYZING CREATININ, UREA AND PURINE DERIVATIVES

AUTHOR: Fabiene Tomazetti dos Santos

ADVISOR: Gilberto Vilmar Kozloski

The objective of this study was to evaluate the impact of the method of preservation, sample processing and conservation time on the concentration of metabolites in urine samples from cattle and sheep. 112 samples of urine of dairy cattle and 42 samples of castrated male sheep were collected. Urine samples were added with either storage media: acid medium (sulfuric acid), basic medium (sodium hydroxide), medium without preservative (distilled water). The effect of the exposition to the environmental temperature during 12 hours before stored frozen, and the sonication processing of samples before analysis on metabolites concentration was evaluated in some sheep urine samples. The metabolites concentration were determined using colorimetric techniques. The urea concentration was not affected by method of preservation. The concentration of creatinine and uric acid were lower whereas de allantoin was higher in samples added with basic solution ($P < 0,05$). The sonication resulted in higher values of allantoin ($P < 0,05$) whereas it did not affect the concentration of other metabolites. Independently of preservation method, the exposition of samples to the environment temperature for 12 hours did not affect the concentration of any metabolite. In conclusion, results of the present study indicated that there was not need of using any type of preserving solution in urine samples for determining the excretion of creatinine, urea or uric acid, whereas a basic solution should be added for determining the excretion of allantoin. In addition, sonication of samples is a recommended procedure before analysis, mainly of allantoin.

Keywords: Sulphuric acid. Creatinine. Purine derivatives. Sodium hydroxide. Ruminants. Urea.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=41; CV=34,49; P<0,05) conservadas em meio ácido versus conservante básico. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠121
- Figura 2 - Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=40; CV=39,03; P<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão =1.21
- Figura 3- Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=41; CV=27,58; P<0,05) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.22
- Figura 4- Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=39; CV=22,57; P<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.23
- Figura 5- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=40; CV=35,90; P<0,05) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão =1.24
- Figura 6- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=38; CV=22,71; P<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.24
- Figura 7- Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de URINA de ovinos (n=40; CV=21,71; P<0,05) conservadas em meio ácido versus conservante básico. Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1.25
- Figura 8- Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=38; CV=29,72; P<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto =0; Coeficiente de regressão=1.26
- Figura 9- Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=109; P<0,05) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.27
- Figura 10- Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=106; P<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.27
- Figura 11 - Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=111; P<0,05) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1.28
- Figura 12- Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=110; p<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1.28
- Figura 13- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=109; P>0,05) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.29
- Figura 14- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=108; P<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.29
- Figura 15 - Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=110; P<0,05) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.30

Figura 16-	Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=109; P<0,05) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.	31
Figura 17	- Relação entre os teores (mg/L) de creatinina (A), ureia (B), ácido úrico (C) e alantoína (D) em amostras de urina de ovinos sonicadas ou não sonicadas. n=30 por metabólito. A: Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1; B: Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1; C: Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1; D: Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1.....	32
Figura 18	- Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=35; Intercepto = 0; Coeficiente de regressão ≠1; B: amostras em meio básico. n=34; Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1; C: amostras em meio sem conservante. n=36; Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1.....	35
Figura 19-	Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=33; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1; B: amostras em meio básico. n=36; Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1; C: amostras em meio sem conservante. n=33; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.	36
Figura 20	- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=34; Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão=1; B: amostras em meio básico. n=36; Intercepto ≠0; Coeficiente de regressão ≠1; C: amostras em meio sem conservante. n=33; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.	38
Figura 21	- Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=34; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1; B: amostras em meio básico. n=35; Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1; C: amostras em meio sem conservante. n=34; Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3. HIPÓTESE	14
4. OBJETIVOS	14
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 AVALIAÇÃO DO TIPO DE CONSERVANTE	15
5.1.1 Preparo dos reagentes conservantes	15
5.1.2 Ensaio com amostras de urinas de ovinos	16
5.1.3 Ensaio com amostras de urina de bovinos	16
5.2 AVALIAÇÃO DA SONICAÇÃO NO PREPARO DAS AMOSTRAS	17
5.3 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM TEMPERATURA AMBIENTE .	17
5.4 ANÁLISES QUÍMICAS	17
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
6.1 EFEITO DO CONSERVANTE NAS AMOSTRAS DE URINA DE OVINOS.....	20
6.2 EFEITO DO CONSERVANTE NAS AMOSTRAS DE URINA DE BOVINOS	26
6.3 EFEITO DA SONICAÇÃO NAS AMOSTRAS DE URINA DE OVINOS.....	31
6.4 EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM TEMPERATURA AMBIENTE EM AMOSTRAS DE OVINOS	33
7. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Em ruminantes, o aporte de aminoácidos no duodeno é originário da proteína microbiana sintetizada no rúmen, da proteína do alimento que não foi degradada no rúmen e da proteína endógena (descamações celulares, sucos digestivos, entre outros). A proteína microbiana constitui, geralmente, uma proporção considerável do fluxo duodenal de nitrogênio (N) aminoacídico nos ruminantes, podendo alcançar 100% em determinadas situações (NRC, 1996), o que denota a importância do estudo dos mecanismos de síntese proteica microbiana em ruminantes.

A determinação da contribuição da proteína microbiana para o animal é importante e sua estimativa está incorporada aos sistemas de avaliação de proteína adotados em diversos países (BARBOSA et al., 2006).

Pesquisas ao longo dos últimos anos confirmaram a relação entre produção de proteína microbiana e excreção urinária de derivados de purina (PEREZ et al., 1996). A estimativa do suprimento de proteína microbiana a ruminantes tem sido uma importante área de estudo na nutrição de proteínas de ruminantes. O método descrito por Chen e Gomes (1992) estabelece a medição de derivados de purina (DP) na urina de uma maneira simples e não invasiva (não requer qualquer preparação cirúrgica do animal) como técnica para estimar a oferta de proteína microbiana ruminal.

Esta técnica recomenda conservar a amostra de urina acidificada para evitar que ocorra a destruição bacteriana dos DP. No entanto, não há informação na literatura sobre o grau de perda destes metabólitos em amostras de urina mantidas em temperatura ambiente sem conservante e alguns deles não são solúveis em meio ácido, o que implicaria em precipitação e subestimação de valores. Estruturas como xantina e ácido úrico, por exemplo, são solúveis em solução alcalina enquanto que hipoxantina, alantoína e creatinina são solúveis em meio aquoso. Também não há informação na literatura se a sonicação das amostras seria necessária como etapa prévia à análise, com o propósito de solubilizar metabólitos eventualmente precipitados.

Esse estudo teve como objetivo avaliar o impacto do método de conservação e processamento sobre a concentração de metabólitos em amostras de urina de bovinos e ovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os alimentos ofertados aos ruminantes, geralmente possuem baixos teores de purinas que, a nível ruminal, sofrem extensa degradação como resultado da fermentação microbiana. Chen e Gomes (1992) abordam que os ácidos nucleicos que saem do rúmen são essencialmente de origem microbiana e estão diretamente relacionadas à absorção das purinas. As purinas são degradadas e excretadas na urina como seus derivados, os mais importantes são hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína.

Com o conhecimento da relação purina-N:N total na biomassa microbiana, a absorção microbiana de N pode ser calculada a partir da quantidade de purina absorvida, que é estimada a partir da excreção urinária de DP (CHEN e GOMES, 1992).

De acordo com a técnica proposta por Chen e Gomes, (1992), para conservar a urina dos animais é essencial acidificar a urina dos animais com ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 10%, com o pH do meio abaixo de 3), para evitar a destruição dos DP por meio bacteriano.

A hipoxantina é a primeira estrutura aparecer, quando se trata de derivados de purinas, ela surge a partir da hidrólise da inosina. A hipoxantina é oxidada pela enzima xantina-oxidase formando xantina e depois em ácido úrico. O ácido úrico é, grande parte, é degradado e transformado em alantoína que é excretada pela grande maioria dos mamíferos (NELSON, 2014).

Existe uma diferença entre bovinos e ovinos com relação à excreção de derivados de purinas. Os bovinos possuem uma enzima, chamada de xantina oxidase, que transforma toda a xantina e hipoxantina em ácido úrico que mais tarde será convertida, em grande parte, em alantoína. Já os ovinos, a atividade dessa enzima é bem mais baixa, sendo assim a xantina e hipoxantina são excretadas na urina (CHEN e GOMES, 1992).

A excreção de uréia é feita naturalmente pelos animais, oriunda da quebra da proteína a nível intestinal, liberando amônia que no fígado é metabolizada em ureia para ser excretada na urina. Em ruminantes, a amônia também é produzida a nível ruminal, pela degradação da proteína, pelas bactérias proteolíticas. Do total de

amônia sintetizada apenas 33% da amônia sintetizada no fígado é excretada na urina (BERCHIELLI, et. all 2011; KOZLOSKI, 2011).

A excreção de creatinina é relativamente constante em função do peso vivo do animal e usada como indicador da produção urinária, podendo estimar a excreção dos derivados de purina e de outros compostos nitrogenados (CHEN et al., 1995; RENNÓ et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; SILVA et al., 2001; RENNÓ et al., 2003, ANALÍVIA et al., 2006).

Buscando na literatura, como que são essas estruturas: creatinina, ureia e derivados de purinas (Xantina, Hipoxantina, ácido úrico e alantoína) quimicamente e como se comportam essas estruturas em meios acidificados identificou-se que algumas dessas estruturas metabólicas presentes na urina não são solúveis em meios acidificados.

A xantina ($\geq 99,5\%$) é solúvel em soluções de hidróxido de sódio (NaOH 1 M, 50 mg/mL, com sonicação por menos de 5 minutos, produzindo uma solução límpida) e em soluções ácidas. É também ligeiramente solúvel em água (1 g / 14,5 L, 16°C) e em etanol (SIGMA-ALDRICH, 2015).

Já os compostos hipoxantina ($\geq 99\%$) e alantoína ($\geq 98.0\%$) são solúveis em meio aquoso (SIGMA-ALDRICH, 2015). Já o ácido úrico ($\geq 99\%$) é solúvel em NaOH 1 M (25 mg/mL), produzindo uma solução amarela clara a ligeiramente turva, fraca (SIGMA-ALDRICH).

A ureia é solúvel em água (480 mg/mL, 8 M ou em 1 g/mL em água) produzindo uma solução clara ou incolor. Também é solúvel em álcool (100 mg/mL), metanol (166 mg/mL) e glicerol (500 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH, 2015).

A creatinina ($\geq 98\%$) é solúvel em meio aquoso, produzindo uma solução clara (SIGMA-ALDRICH, 2015).

O banho ultrassônico é utilizado na limpeza, preparo de amostras e degaseificação de soluções (ANALÍTICA, 1992). Por meio de vibrações e agitação por ondas sônicas transmitidas pela água ocorre o processo de cavitação ou seja, um colapso de milhões de pequenas bolhas (ou cavidades) microscópicas em um líquido. Esse processo limpa o objeto, prepara a amostra solubilizando compostos, ou retira gases solubilizados na amostra (GARCIA, 2015)

Quando se trata de coleta de urina de animais, leva-se em conta o tempo que essa amostra fica exposta em temperatura ambiente sem que ocorra interferência ou degradação dos metabólitos avaliados.

3. HIPÓTESE

O processamento e/ou tratamento químico das amostras de urina interfere no teor de creatinina, ureia e derivados de purinas em função da diferença de solubilidade desses nos diferentes meios de conservação.

O grau de perda de metabólitos da amostra de urina mantida em temperatura ambiente durante 12 horas varia com o tratamento químico aplicado.

4. OBJETIVOS

- Avaliar o impacto do uso de ácido ou base como conservante de amostras de urina de bovinos e ovinos sobre as concentrações de creatinina, ureia e derivados de purina, analisados por espectrofotometria;
- Testar se o uso de sonicação das amostras prévio às análises aumenta os valores de concentração dos metabólitos acima.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AVALIAÇÃO DO TIPO DE CONSERVANTE

5.1.1 Preparo dos reagentes conservantes

O método de conservação de urina de animais, proposto por Chen e Gomes (1992), é por meio de acidificação do reservatório de coleta de urina. Segundo o protocolo, utiliza-se ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 4 normal (N) ou 10% (de concentração) dentro do reservatório de coleta para conservar a urina dos animais no decorrer do tempo.

Utilizou-se essa mesma concentração de 4 N para o hidróxido de sódio para tentar equivaler a metodologia de acidificação. Também se utilizou o meio sem conservante na tentativa de ver o comportamento da amostra sem a interferência dos reagentes conservantes.

5.1.1.1 Preparo do reagente ácido (H_2SO_4 4 N)

Mediu-se aproximadamente 111 ml de ácido sulfúrico p.a. que foi lentamente adicionado em um becker contendo 500 ml de água destilada. Logo a seguir transferiu-se esta solução ácida para um balão volumétrico de um litro e completado o volume com água destilada.

5.1.1.2 Preparo da solução básica ($NaOH$ 4 N)

Pesou-se 160 g de hidróxido de sódio p.a. em um Becker que foi dissolvido em aproximadamente 800 mL de água destilada. A seguir a solução foi transferida para um balão volumétrico de um litro e completado o volume com água destilada.

5.1.1.3 Preparo da solução sem conservante

Utilizou-se apenas água destilada no preparo da solução neutra, com a finalidade de preservar a amostra sem nenhum tipo de conservante.

5.1.2 Ensaio com amostras de urinas de ovinos

Foram utilizadas 42 amostras de urina de ovinos machos castrados, pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria. A coleta das amostras ocorreu durante o período de outubro a dezembro de 2017.

As amostras de urina foram coletadas de ovinos mantidos em gaiolas de metabolismo, com uso de coletores de urina fixados no animal com uso de arreios. Foi coletada 1 amostra de urina por animal e logo levadas ao laboratório e subdivididas em 3 subamostras, cada uma contendo 9 ml de urina sendo transferidas para 3 balões volumétricos diferentes, sendo que cada balão continha no seu interior 1 ml de solução ácida, básica ou água destilada (sem conservante) e completado o volume com água destilada.

Antes das análises químicas todas as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, filtradas em um papel filtro qualitativo (80 g/m), com a finalidade de retirar partículas sólidas interferentes e congeladas novamente.

5.1.3 Ensaio com amostras de urina de bovinos

Foram utilizadas 112 amostras de urina de bovinos leiteiros, pertencentes a um Tambo de leite comercial localizado no município de Toropi (RS). A coleta das amostras ocorreu durante o período de setembro de 2017 a janeiro de 2018.

As amostras foram coletadas por estimulação vulvar. Foi coletada 1 amostra de urina por animal e logo depois subdividida em 3 subamostras, cada uma contendo 9 ml de urina e colocadas em frascos diferentes contendo previamente dentro 1 ml de solução ácida, básica ou água destilada (sem conservante). A seguir as amostras foram mantidas em refrigeração (aproximadamente 4°C) para conservação parcial das amostras até o deslocamento da propriedade até o laboratório. O tempo de conservação das amostras na geladeira variou de 24 a 48 horas, as amostras foram transportadas dentro de uma caixa de isopor para conservar até a chegada ao laboratório. No laboratório as amostras foram

transferidas para um balão volumétrico de 50 mL, completado o volume com água destilada e armazenadas em congelador (-20°C).

Antes das análises químicas todas as amostras foram descongeladas, filtradas e congeladas da mesma maneira que o procedimento das amostras de ovinos.

5.2 AVALIAÇÃO DA SONICAÇÃO NO PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram selecionadas aleatoriamente 30 amostras de urina de ovinos, previamente analisadas conforme o ensaio de ovinos descrito no item 5.1. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas in vortex de agitação e submetidas ao banho ultrassônico antes das análises químicas por espectrometria.

Esse procedimento serviu para testar o efeito da sonicação, na concentração dos derivados de purinas, creatinina e ureia, comparando os resultados das amostras que não foram submetidas ao procedimento de sonicação com as mesmas amostras que foram sonicadas.

5.3 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM TEMPERATURA AMBIENTE

As amostras de urina de ovinos segundo a metodologia descrita no item 5.1, antes de serem armazenadas passaram por outro procedimento. Cada amostra de urina de ovinos foi subdivididas em 2 subamostras com aproximadamente 25 mL, sendo que uma foi imediatamente armazenada em congelador (-20°C) e a outra foi mantida em temperatura ambiente por aproximadamente 12 h antes de armazenada em congelador a (-20°C). Esse procedimento ocorreu para se testar o tempo de conservação no decorrer de 12 horas, analisando se a amostra iria sofrer alteração na concentração dos metabólitos no decorrer desse tempo.

5.4 ANÁLISES QUÍMICAS

Todas as análises foram realizadas por espectrofotometria. As análises de ureia, creatinina e ácido úrico foram realizadas com uso de kits comerciais (Bioclin,

Quibasa) seguindo a bula do produto. Para análise de ácido úrico, as amostras de urina de ovinos foram previamente tratadas com xantina oxidase para que toda a hipoxantina e xantina da amostra fossem convertidas em ácido úrico. A análise de alantoína foi feita conforme o protocolo de análise e preparo dos reagentes, descrito por Young and Conway (1942).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os meios de conservação básico e sem conservante foram comparados ao meio de conservação ácida utilizando o modelo linear geral (GLM).

O modelo estatístico utilizado para amostras de urina para ambas as espécies trabalhadas, conservadas nos meio sem conservante versus meio ácido e descrito abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + C_{bi} + \epsilon_i$$

Y_{ij} = meio ácido

μ = média geral

C_{bi} = meio de conservação básico ou sem conservante.

ϵ_i = erro residual

O modelo estatístico utilizado para comparar efeito por tempo de exposição em temperatura ambiente também foi regressão linear utilizando modelo linear geral (GLM), é descrito abaixo:

$$Y_i = \mu + T_i + \epsilon_i$$

Y_i = efeito de tempo na hora zero

μ = média geral

T_i = efeito de tempo após 12 horas.

ϵ_i = erro residual

O modelo estatístico utilizado para comparar efeito por sonicação também foi uma regressão linear por modelo linear geral (GLM), é descrito abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \epsilon_i$$

Y_{ij} = Efeito sem sonicação

μ = Média geral

S_{ij} = Efeito com sonicação

ϵ_i = erro residual

O programa utilizado para analisar estatisticamente foi o sistema SAS University Edition 2018.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 EFEITO DO CONSERVANTE NAS AMOSTRAS DE URINA DE OVINOS

Os meios de conservação testados nesse estudo indicam que existe correlação com o método tradicional, por conservação ácida, proposto por CHEN e GOMES (1992).

Os teores de creatinina, ureia, ácido úrico e alantoína em amostras de urina de ovino em meio sem conservante e com conservante básico, obtiveram resultados lineares ($P < 0,05$), quando comparados com as amostras tratadas com ácido (figura 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

Nas figuras 1 e 2, pode-se observar que os valores dos coeficientes de determinação para amostras de creatinina foram de $R^2 = 0,8647$ para amostras com conservante básico e $R^2 = 0,8213$ para amostras sem conservante e o coeficiente de variação foi de 34,49 e 39,03 respectivamente. O coeficiente de regressão para o meio básico foi diferente de 1 e igual a 1 para o meio sem conservante, o intercepto para ambos os meios foi diferente de zero.

Com base nos dados analisados, os valores encontrados em meios básicos e sem conservante foi menor do que em meio ácido, indicando que aconteceu alteração na concentração de creatinina dentro desses meios de conservação. Uma possível explicação é que em meio sem conservante a creatinina pode ter sofrido uma possível degradação microbiana.

Observou-se também, que em meio sem conservante o coeficiente de regressão foi igual a 1, indicando que os valores são semelhantes aos valores encontrados em meio ácido, sendo esperado já que a solubilidade da creatinina se dá em meio aquoso.

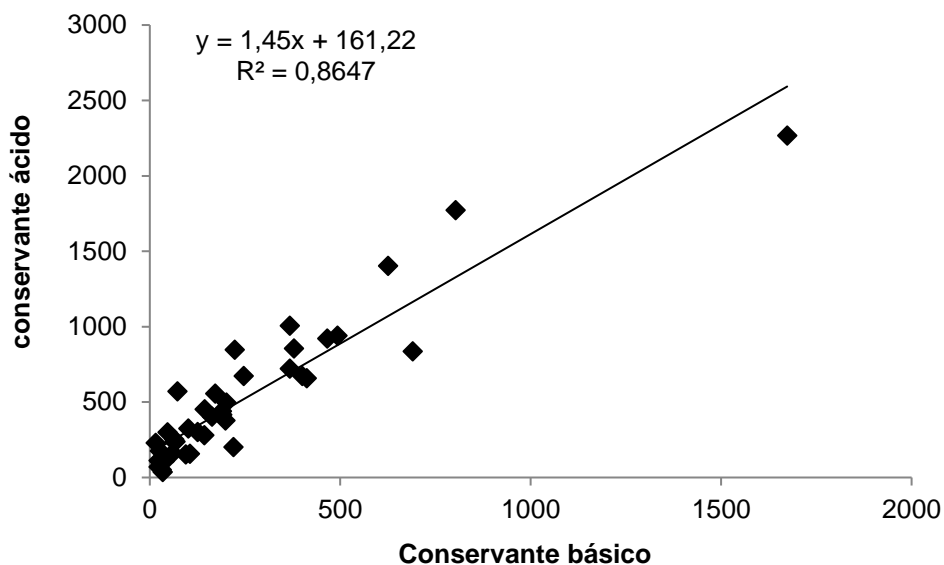


Figura 1 - Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=41; CV=34,49; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus conservante básico. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$

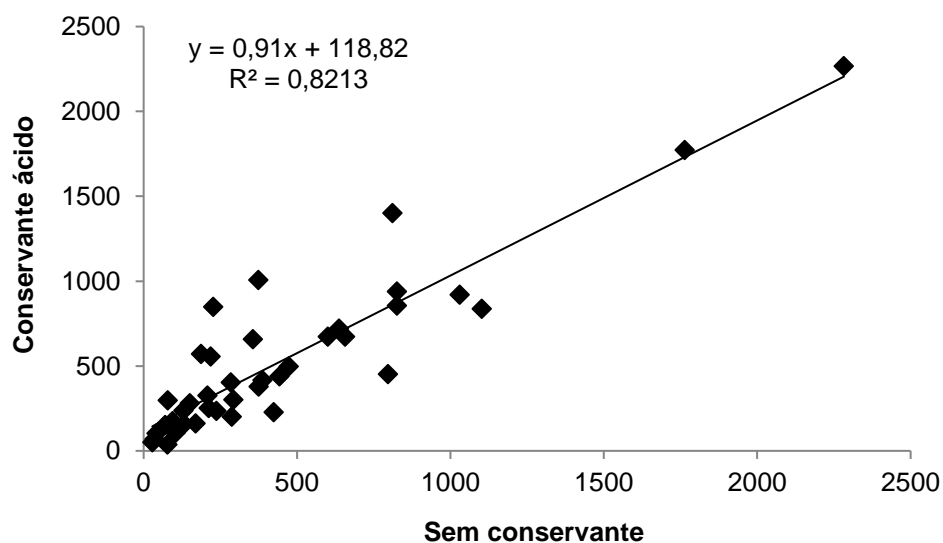


Figura 2 - Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=40; CV=39,03; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

Nas figuras 3 e 4, o coeficiente de determinação para análise de ureia foi de $R^2=0,90$ e $R^2=0,93$ para amostras com conservante básico e sem conservante, e o coeficiente de variação foi de 27,58 e 22,57 respectivamente. O coeficiente de regressão e o intercepto para ambos os meios de conservação foi igual a 1 e igual a zero ($P < 0,05$).

Isso indica que ambos os métodos de conservação avaliados possuem valores próximos da metodologia ácida para amostras de ureia, sendo que o meio de conservação que mais se destacou, por ter um coeficiente de determinação maior, foi o meio sem conservante. Esse resultado era esperado, já que na literatura a ureia se solubiliza em meio aquoso, podendo ser uma ótima alternativa quando se quer conservar amostras de urina de ovinos para analisar ureia.

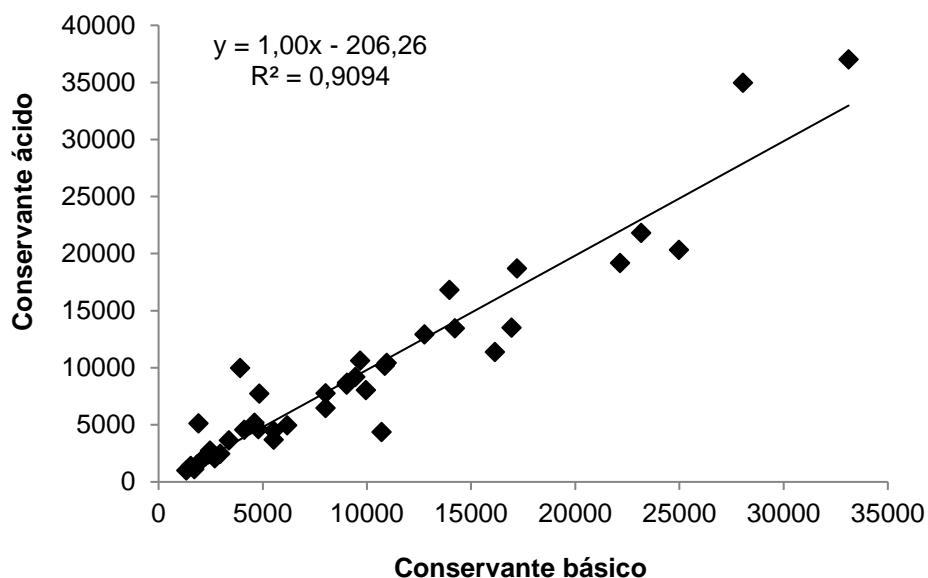


Figura 3- Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=41; CV=27,58; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.

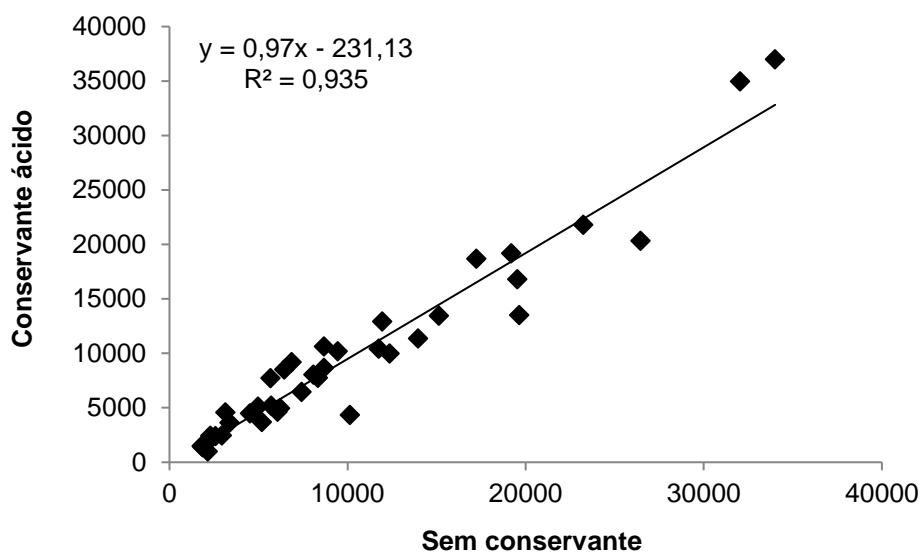


Figura 4- Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=39; CV=22,57; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.

Os teores de o ácido úrico em amostras de ovinos obtiveram coeficientes de determinação de $R^2=0,69$ e $R^2=0,86$ para amostras básicas e sem conservantes, com coeficiente de variação de 35,90 e 22,71; conforme a figura 5 e 6. O Intercepto para ambos os meios foi diferente de zero, mas o coeficiente de regressão para amostras básicas foi igual a 1 e para amostras sem conservante foi diferente de 1 ($P < 0,05$).

Ambos os meios de conservação avaliados obtiveram valores menores aos encontrados em meio ácido, indicando que aconteceu alteração na concentração de ácido úrico nesses meios. Pode-se tentar explicar, que em algum momento o meio básico deve ter interferido ou não ter conservando o ácido úrico e sendo possivelmente sendo degradando por ação microbiológica.

Um fato interessante foi que o coeficiente de regressão das amostras básicas foi igual 1, indicando semelhança com os valores encontrados em meio ácido, esse resultado era esperado, pois a solubilidade do ácido úrico ocorre em meio básico.

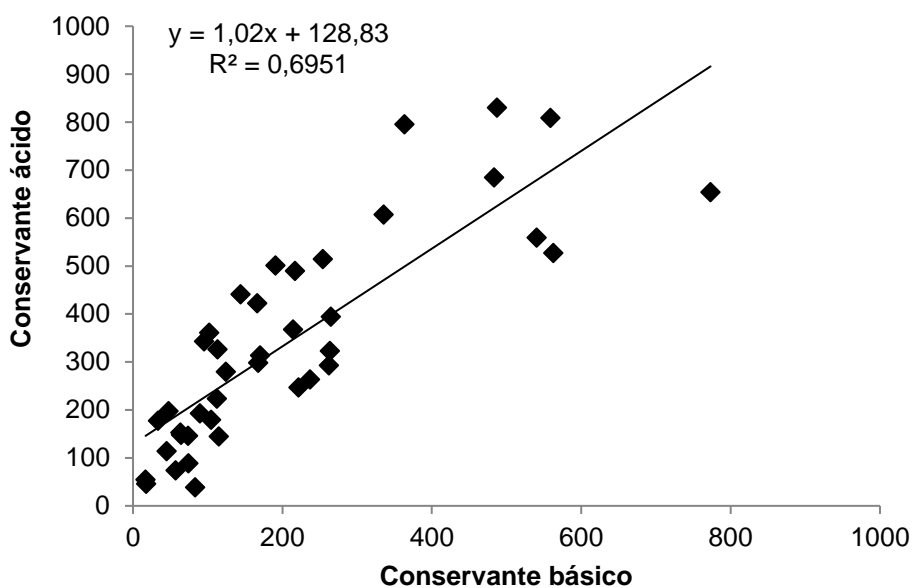


Figura 5- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=40; CV=35,90; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão =1.

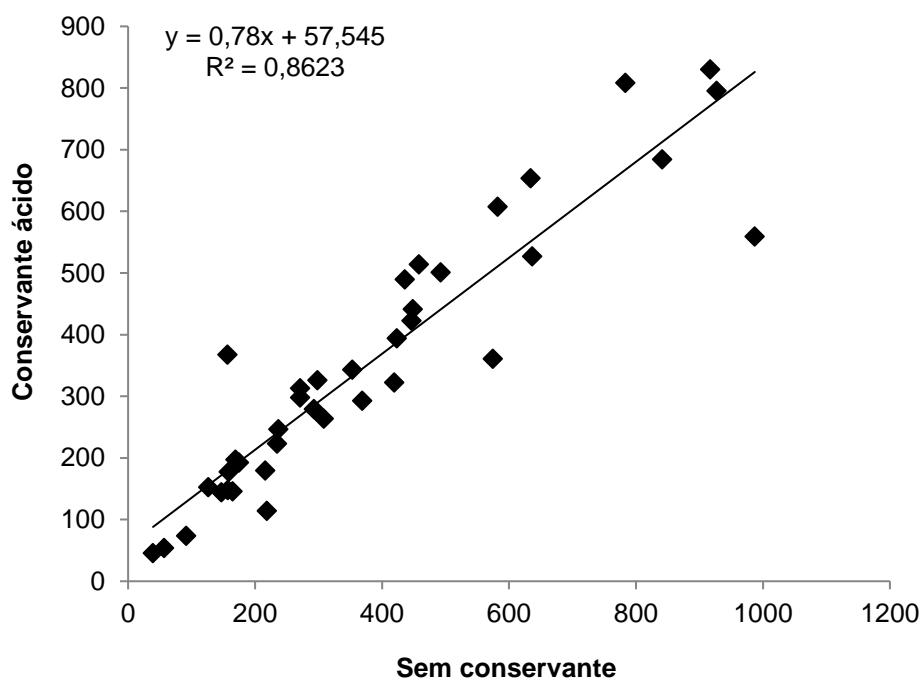


Figura 6- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=38; CV=22,71; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

Em amostras de urina de ovinos, os teores de alantoína obtiveram coeficientes de determinação de $R^2=0,93$ e $R^2=0,87$ para amostras básicas e sem conservantes, com coeficiente de variação de 21,71 e 29,72; conforme a figura 5 e

6. O Intercepto para ambos os meios foi igual a zero e o coeficiente de regressão foi diferente de 1 para amostras básicas e igual a 1 para amostras sem conservante ($P < 0,05$).

Conforme os resultados analisados o meio que mais se aproximou da metodologia por conservação ácida foi o meio sem conservante, o que era esperado dado que a alantoína se solubiliza em meio aquoso. Com base nisso, o meio sem conservante pode ser uma ótima alternativa para se conservar amostras de urina de ovinos para análise de alantoína.

Mas levando em consideração que para se estimar o teor de derivados de purinas em amostras de urina, é necessária a conservação dos metabólitos: ácido úrico e alantoína; o meio de conservação ácido, ainda continua sendo o mais indicado, dado a diferença nos resultados avaliados.

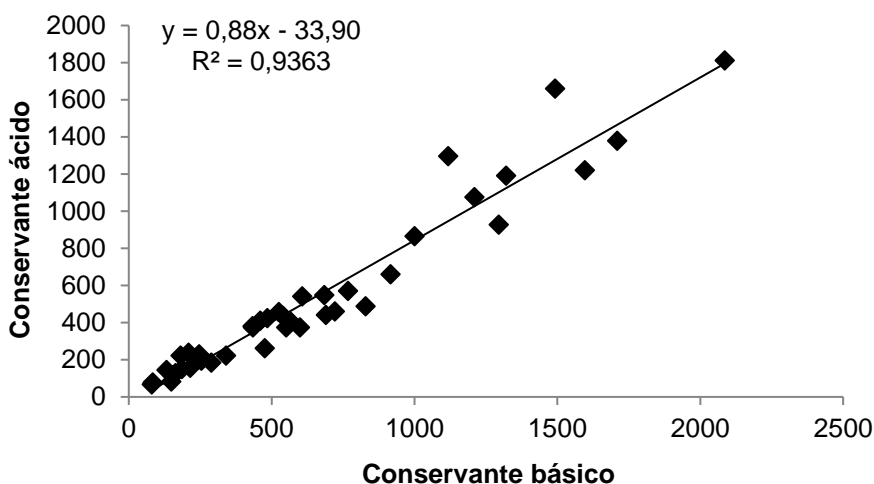


Figura 7- Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de URINA de ovinos ($n=40$; $CV=21,71$; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus conservante básico. Intercepto =0; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

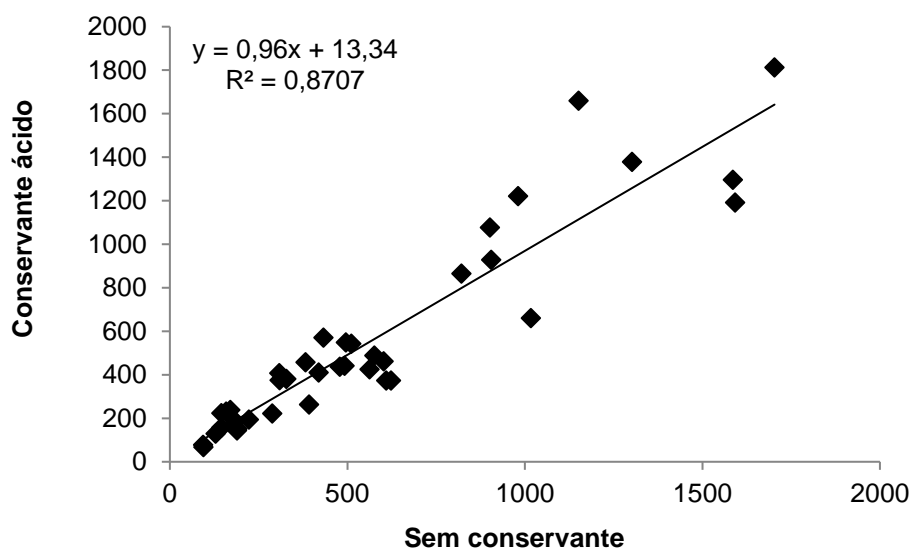


Figura 8- Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de urina de ovinos (n=38; CV=29,72; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto =0; Coeficiente de regressão=1.

6.2 EFEITO DO CONSERVANTE NAS AMOSTRAS DE URINA DE BOVINOS

Como descritos no item 6.1, os meios de conservação testados, também indicaram que existe correlação com o método tradicional, por conservação ácida, proposto por CHEN e GOMES (1992).

Os teores de creatinina, ureia, ácido úrico e alantoína em amostras de bovinos sem conservante e com conservante básico, obtiveram resultados lineares ($P < 0,05$), quando comparados com as amostras tratadas com ácido (figura 9, 10, 11, 12, 14, 15 e 16). Menos para os teores de ácido úrico em bovinos em meio básico cujo P ficou acima de 0,05.

Para teores de creatinina em amostras de urina de bovinos, foi observado que os valores dos coeficientes de determinação para o meio básico e sem conservante foram, $R^2=0,6508$ e $R^2=0,7755$ e o coeficiente de variação foi de 23,18 e 18,14, respectivamente (figuras 9 e 10). O coeficiente de regressão para ambos os meios de conservação foi diferente de 1 e o Intercepto foi diferente de zero ($P < 0,05$).

Os teores de ureia em amostras de bovinos conforme as figuras 11 e 12, o coeficiente de determinação foi de $R^2=0,90$ e $R^2=0,89$ para amostras nos meios de conservação básico e sem conservante, e o coeficiente de variação foi de 13,54 e 14,02, respectivamente. O coeficiente de regressão para ambos os meios de conservação foi diferente de 1 e o intercepto foi igual a zero ($P < 0,05$).

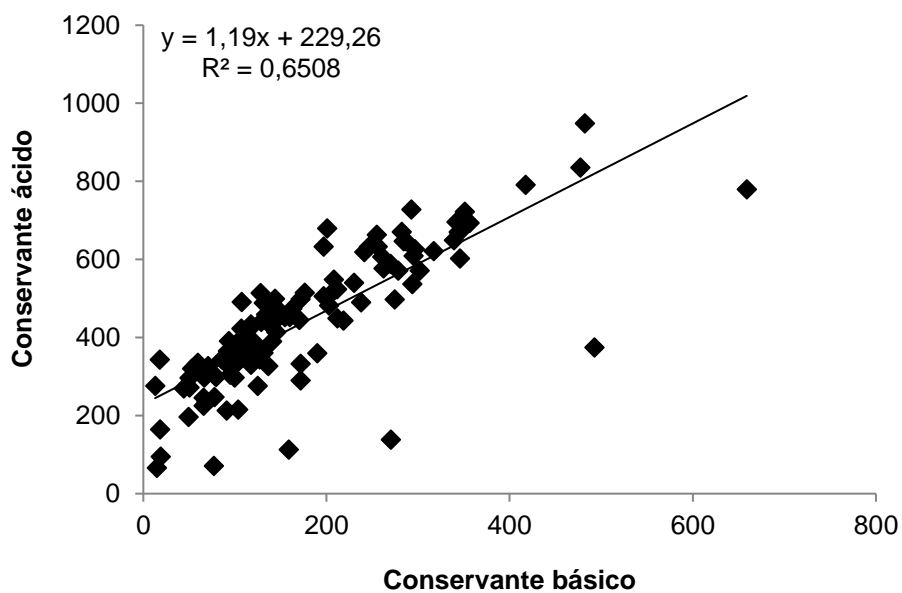


Figura 9- Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=109; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

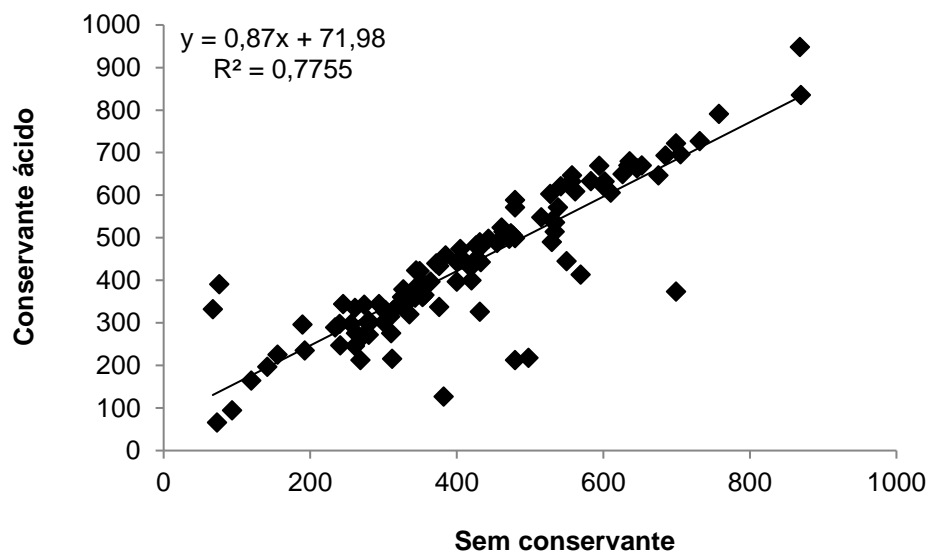


Figura 10- Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=106; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

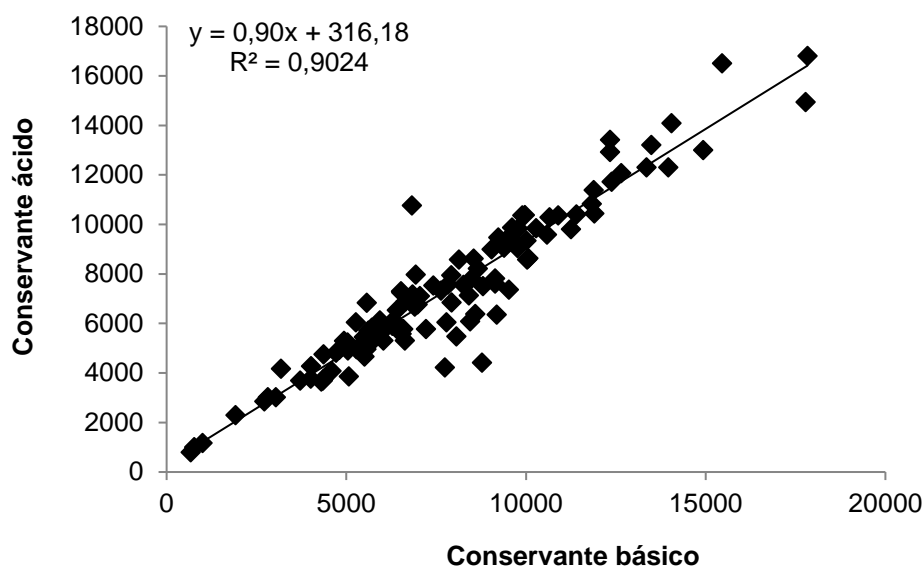


Figura 11 - Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=111; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto =0; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

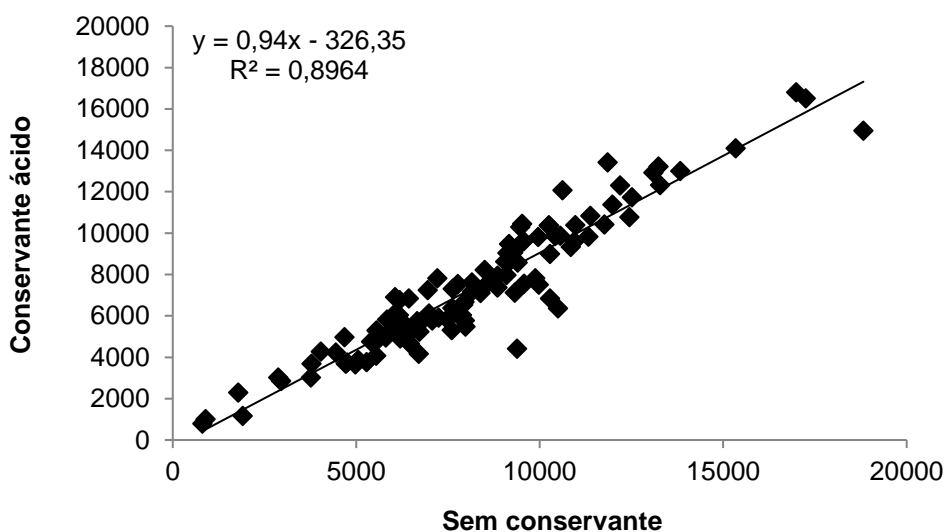


Figura 12- Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=110; $p < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto =0; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

Os teores de o ácido úrico em amostras de urina de bovinos obtiveram coeficiente de determinação de $R^2=0,58$ em amostras sem conservante, com coeficiente de variação de 21,42; conforme a figura 14. O Intercepto foi diferente de zero, e o coeficiente de regressão foi diferente de 1 ($P < 0,05$). Em amostras em meio

básico (figura 13) as amostras obtiveram resultados com o $P > 0,05$ não sendo estatisticamente significativa a análise.

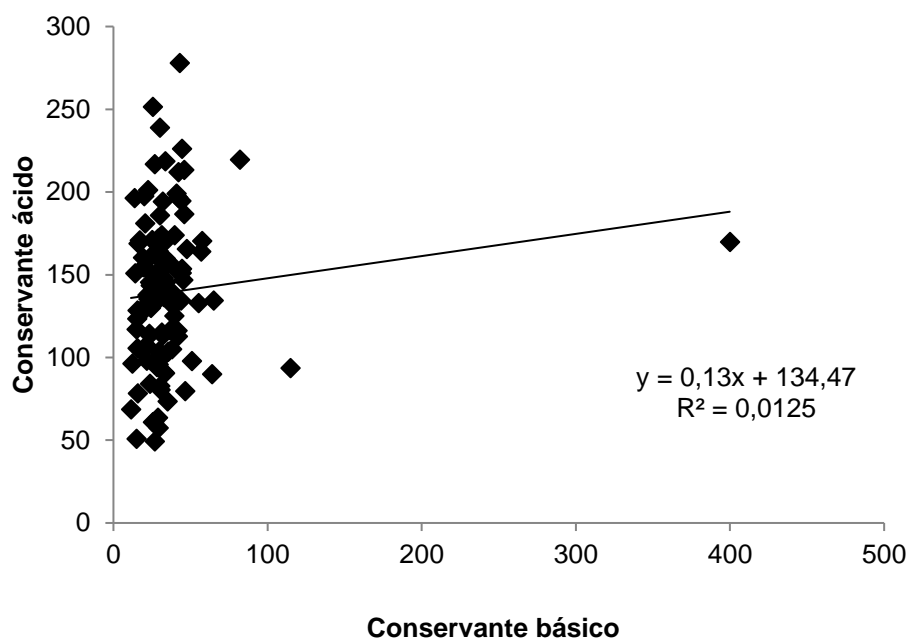


Figura 13- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=109; $P > 0,05$) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

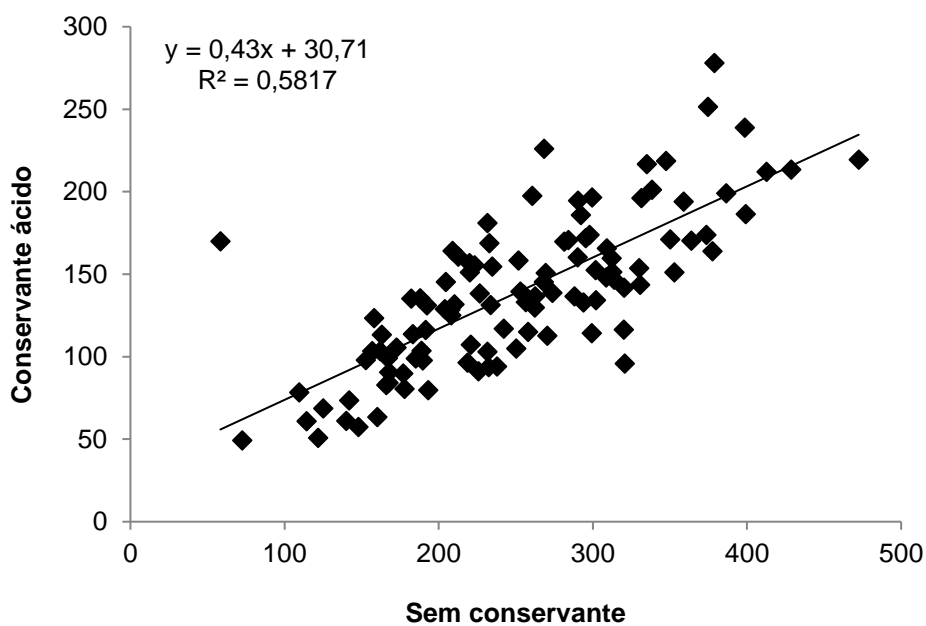


Figura 14- Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=108; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

Em amostras de urina de bovinos, os teores de alantoína obtiveram coeficientes de determinação para amostras básicas e sem conservantes de $R^2=0,50$ e $R^2=0,51$, com coeficiente de variação de 27,60 e 27,4; conforme a figura 15 e 16. O Intercepto para ambos os meios foi diferente de zero, e o coeficiente de regressão foi diferente de 1 ($P<0,05$).

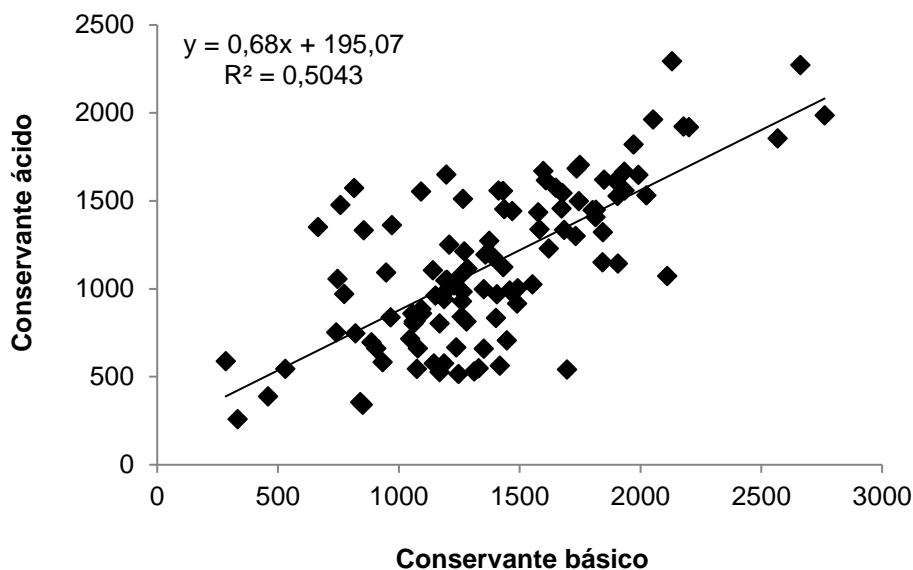


Figura 15 - Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de urina de bovinos ($n=110$; $P<0,05$) conservadas em meio ácido versus com conservante básico. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

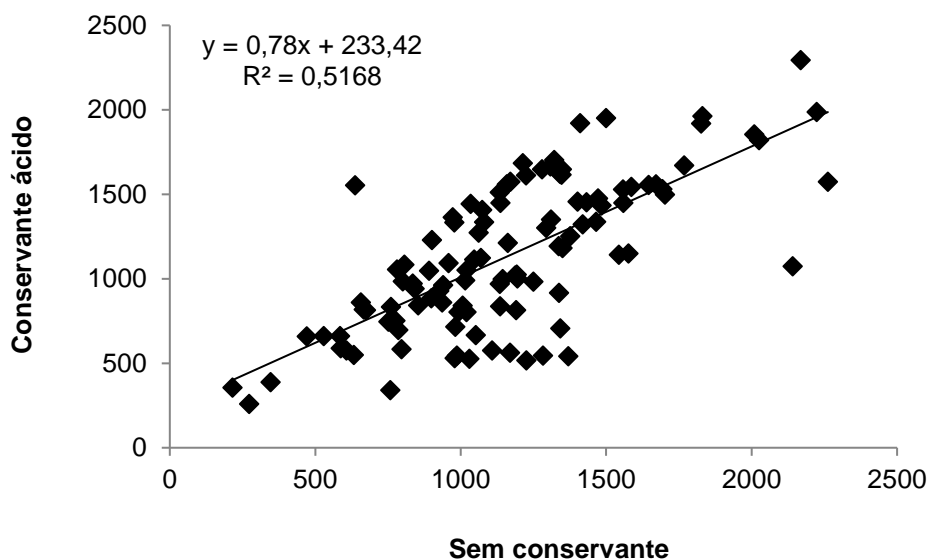


Figura 16- Relação entre os teores de alantoína (mg/L) em amostras de urina de bovinos (n=109; $P < 0,05$) conservadas em meio ácido versus sem conservante. Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

Segundo os resultados analisados, não foi encontrado relação nos meios de conservação ácida com os valores encontrados nos meios de conservação básica e sem conservante, em nenhum dos metabólitos avaliados nesse trabalho, indicando alteração na concentração de creatinina, ureia, ácido úrico e alantoína em amostras de urina de bovinos.

Esse resultado não era esperado, pois acreditávamos que aconteceria o mesmo comportamento que foi encontrado nas amostras de urina de ovinos. Uma possível explicação para esse fato pode ser a influência do tempo no preparo da amostra, transporte e armazenamento em baixa temperatura no laboratório, que não foi igual à metodologia aplicada as amostras urina de ovinos.

6.3 EFEITO DA SONICAÇÃO NAS AMOSTRAS DE URINA DE OVINOS

Os teores de creatinina, ureia, ácido úrico e alantoína em amostras que passaram por um processo de sonicação, obtiveram resultados lineares ($P < 0,05$), quando comparadas com as mesmas amostras que não passaram pelo processo de sonicação (Figura 17).

Os metabólitos creatinina, ureia, ácido úrico e alantoína obtiveram coeficientes de determinação de $R^2=0,95$; $R^2=0,93$, $R^2=0,88$ e $R^2=0,64$

respectivamente e o coeficiente de variação foi de 26,47; 22,55; 23,86 e 45,48 respectivamente. O coeficiente de regressão para creatinina, ureia e alantoína foi diferente de 1 e para ácido úrico foi igual a 1; e o intercepto para todos os metabólitos foi igual a zero ($P < 0,05$).

Podemos considerar que para os metabólitos creatinina e ácido úrico o uso do banho aumentou a concentração desses metabólitos nas amostras de urina de ovinos. Indicando que o banho ultrassônico auxiliou na melhora da solubilidade dos compostos metabólicos presentes na urina, buscando resultados mais confiáveis. Já para ureia e alantoína, o banho ultrassônico diminuiu a concentração desses metabólitos, piorando os resultados avaliados. Então, recomenda-se não utilizar esse procedimento, pois que pode ter acontecido alguma modificação ou destruição da estrutura da alantoína nas amostras de urina de ovinos.

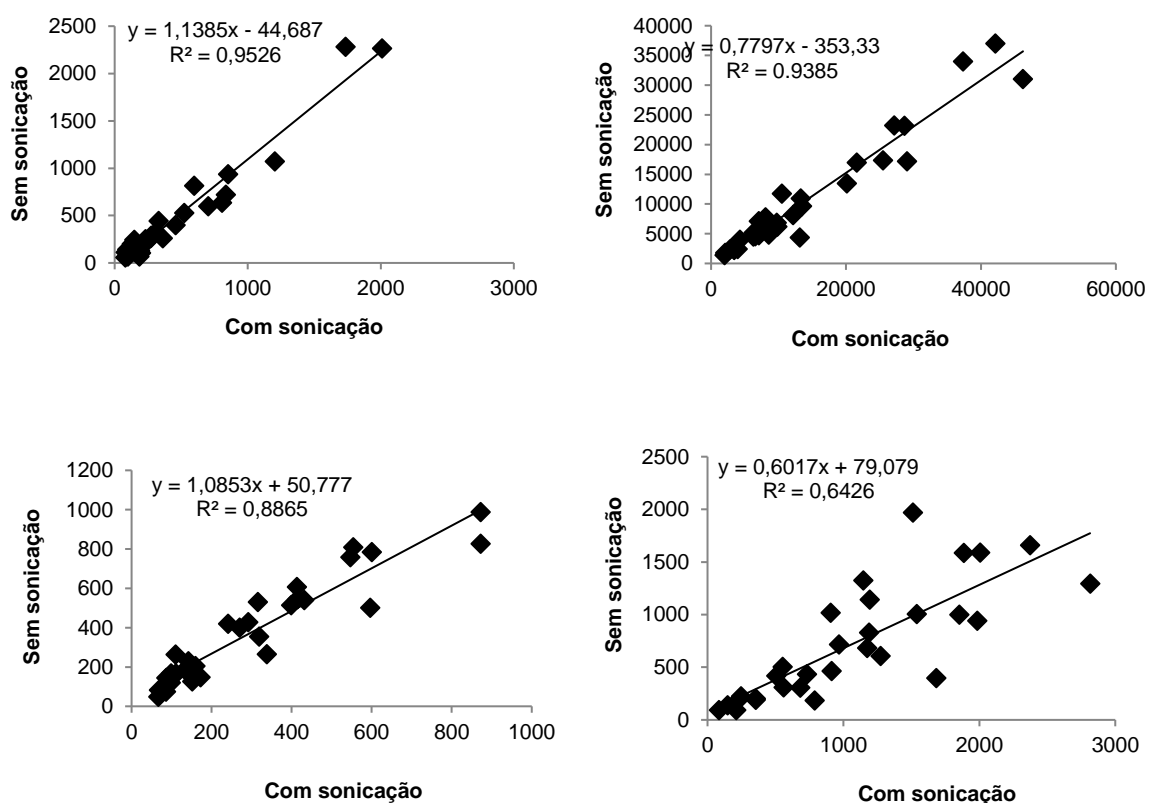


Figura 17 - Relação entre os teores (mg/L) de creatinina (A), ureia (B), ácido úrico (C) e alantoína (D) em amostras de urina de ovinos sonicadas ou não sonicadas. $n=30$ por metabólito. A: Intercepto =0; Coeficiente de regressão $\neq 1$; B: Intercepto =0; Coeficiente de regressão $\neq 1$; C: Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1; D: Intercepto =0; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

6.4 EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM TEMPERATURA AMBIENTE EM AMOSTRAS DE OVINOS

Os efeitos de tempo após 12 horas (12h) em amostras de urina de ovinos para creatinina, em ambos os meios de conservação, foram linearmente ($P < 0,05$) relacionados com aqueles obtidos nas mesmas amostras congeladas no tempo zero (0h) (Figura 18), os coeficientes de determinação para amostras ácidas, básicas e sem conservantes foram de $R^2=0,9613$; $R^2=0,8848$ e $R^2=0,696$, respectivamente, com coeficiente de variação de 20,39; 32,69 e 48,78. O coeficiente de regressão foi diferente de 1 em todos os meios de conservação, o intercepto foi igual a zero para amostras ácidas e diferente de zero para todos os meios de conservação.

No decorrer de 12 horas, foi observada uma diminuição na concentração de creatinina nas amostras de urina de ovinos nos meios de conservação ácido, básico e sem conservante (Figura 18). Esse resultado sugere que no decorrer do tempo, possivelmente, ocorreu a degradação desse metabólito por ação microbiológica, sendo mais acentuada nas amostras sem conservante.

No entanto, não era esperado que ocorresse redução na concentração deste metabólito para amostras conservadas em meio ácido, a qual pode ser explicado por uma possível alteração no pH das amostras. Segundo a literatura (CHEN e GOMES, 1992) o pH das amostras de urina quando conservadas e meio ácido deve permanecer em um valor de pH abaixo de 3, evitando assim a degradação do metabólito.

Em amostras de urina de ovinos para análise de conservação no decorrer do tempo para amostras de uréia, em ambos os meios de conservação, foram linearmente ($P < 0,05$) relacionados com aqueles obtidos nas mesmas amostras congeladas no tempo 0h (Figura 19), os coeficientes de determinação para amostras ácidas, básicas e sem conservantes foram de $R^2=0,8243$; $R^2=0,8387$ e $R^2=0,9378$, respectivamente, com coeficiente de variação de 37,04; 37,54 e 23,25. O coeficiente de regressão foi igual a 1 para amostras em meio ácido e sem conservante e diferente de 1 para amostras em meio básico, o intercepto foi igual a zero para ambos os meios de conservação.

Conforme os resultados observados, a concentração de uréia em amostras de urina de ovinos no decorrer de 12 horas, manteve-se igual para os tratamentos sem

conservante e em meio ácido. Conforme já abordado no item 6.1 fica evidente que o meio sem conservante além de manter os mesmos resultados do meio ácido, também mantém as amostras conservadas no decorrer do tempo, isso pode facilitar a coleta de amostras de urina, não necessitando a utilização de conservante ácido para manter essa estrutura intacta.

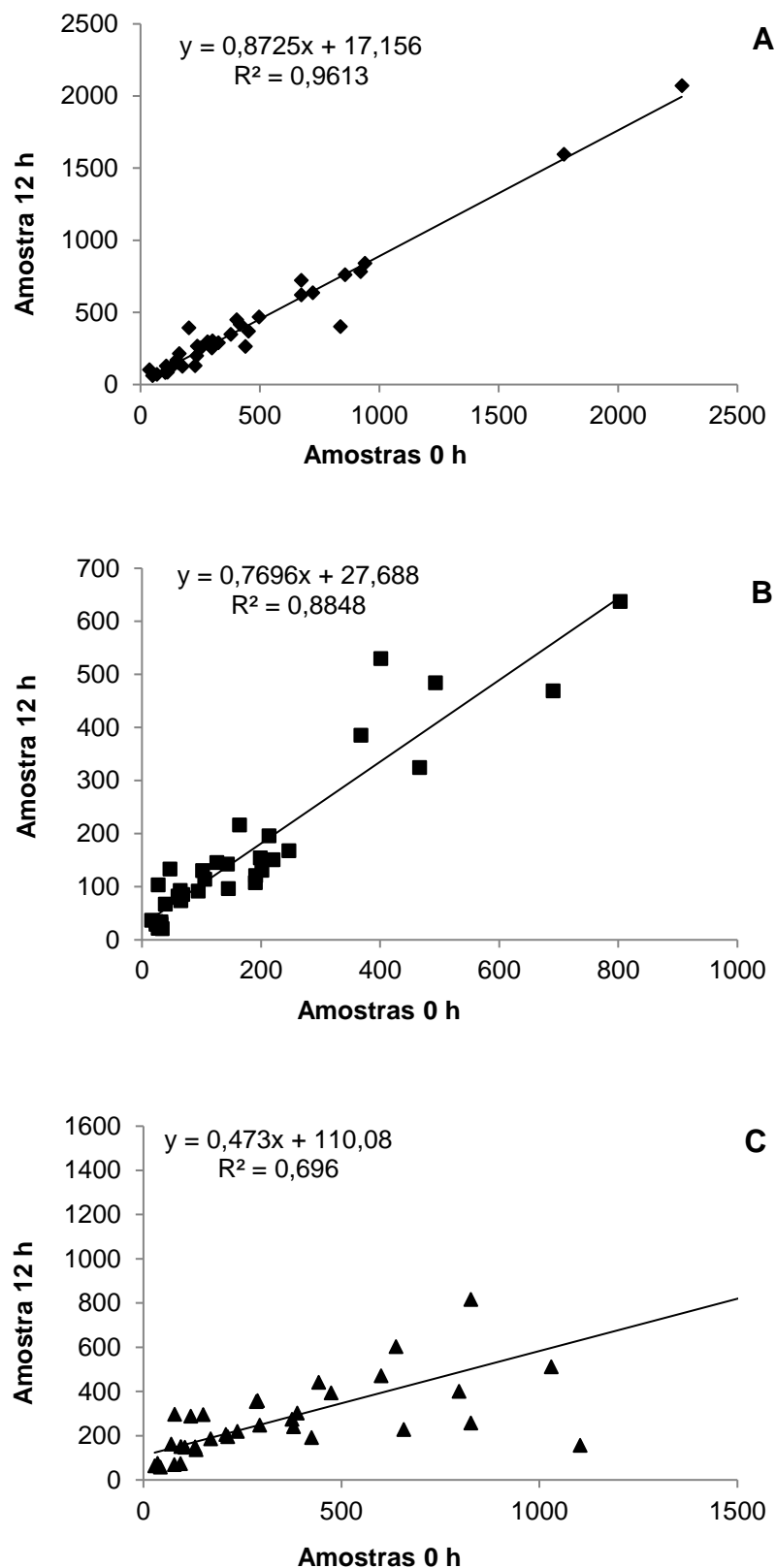


Figura 18 - Relação entre os teores de creatinina (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=35; Intercepto = 0; Coeficiente de regressão $\neq 1$; B: amostras em meio básico. n=34; Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$; C: amostras em meio sem conservante. n=36; Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$.

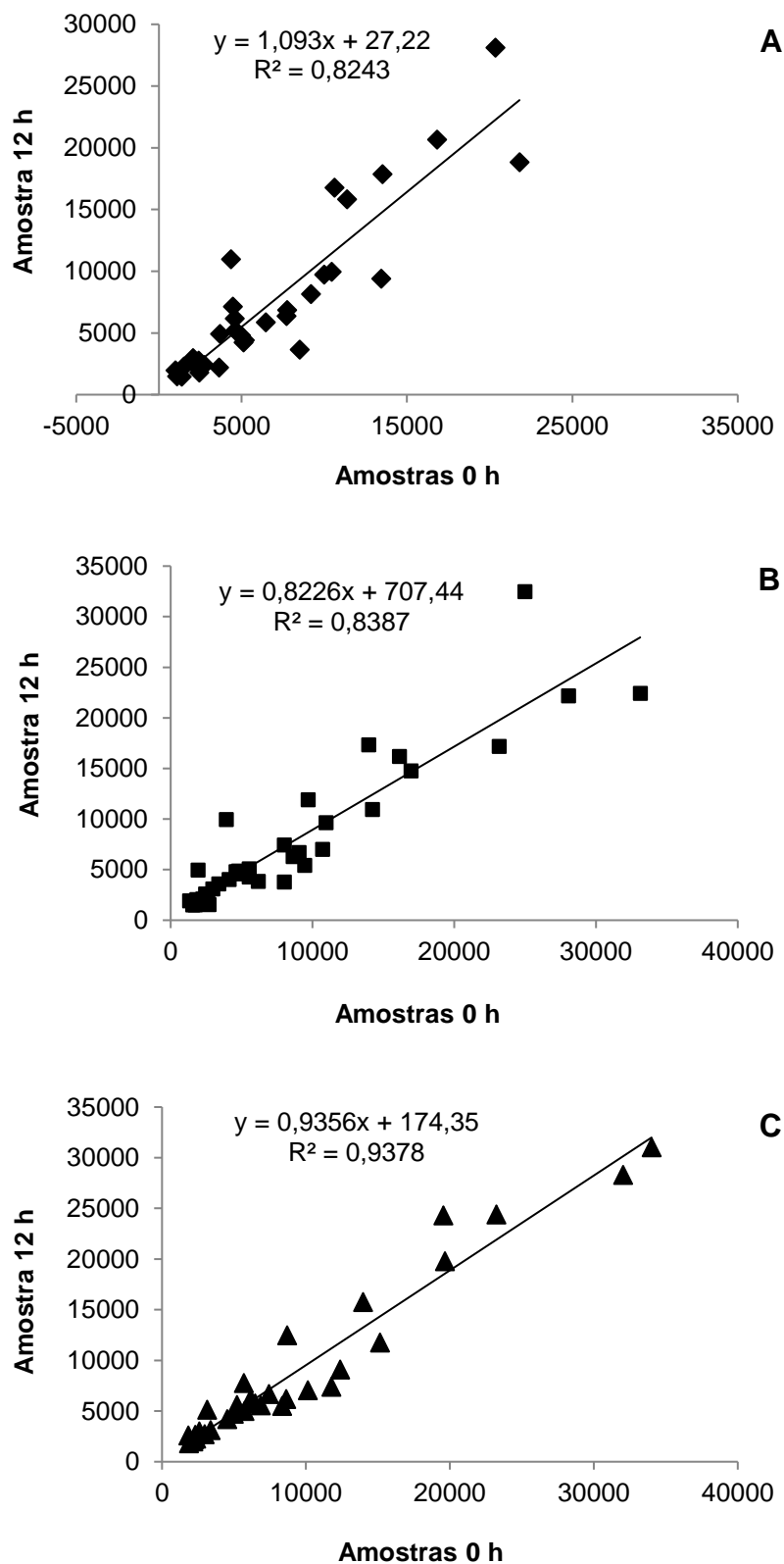


Figura 19- Relação entre os teores de ureia (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=33; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1; B: amostras em meio básico. n=36; Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1; C: amostras em meio sem conservante. n=33; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.

A conservação do metabólito ácido úrico no decorrer do tempo, em ambos os meios de conservação, foram linearmente ($P < 0,05$) relacionados com aqueles obtidos nas mesmas amostras congeladas no tempo 0h (Figura 20), os coeficientes de determinação para amostras ácidas, básicas e sem conservantes foram de $R^2=0,8859$; $R^2=0,8609$ e $R^2=0,8743$, respectivamente, com coeficiente de variação de 20,22; 23,97 e 23,92. O coeficiente de regressão foi igual a 1 para meios ácido e sem conservante, e diferente de 1 para o meio de conservação básico, o intercepto foi igual a zero para as amostras sem conservante e diferente de zero para amostras em meio ácido e básico.

Conforme a Figura 20, a conservação das amostras de urina de ovinos para ácido úrico no decorrer do tempo de 12h, o meio sem conservante obteve resultados iguais aos encontrados em meio ácido, indicando que consegue preservar o ácido úrico no decorrer de 12 horas. Entretanto, esse resultado entra em contradição ao encontrado no item 6.1, pois a concentração de ácido úrico diminuiu nas amostras sem conservante. Não foi encontrada explicação do porque aconteceu essa diferença nos resultados das amostras de urina de ovinos, podendo até mesmo ser uma subestimação dos resultados analisados, prevalecendo o método de conservação por acidificação das amostras de urina proposta por CHEN e GOMES, 1992.

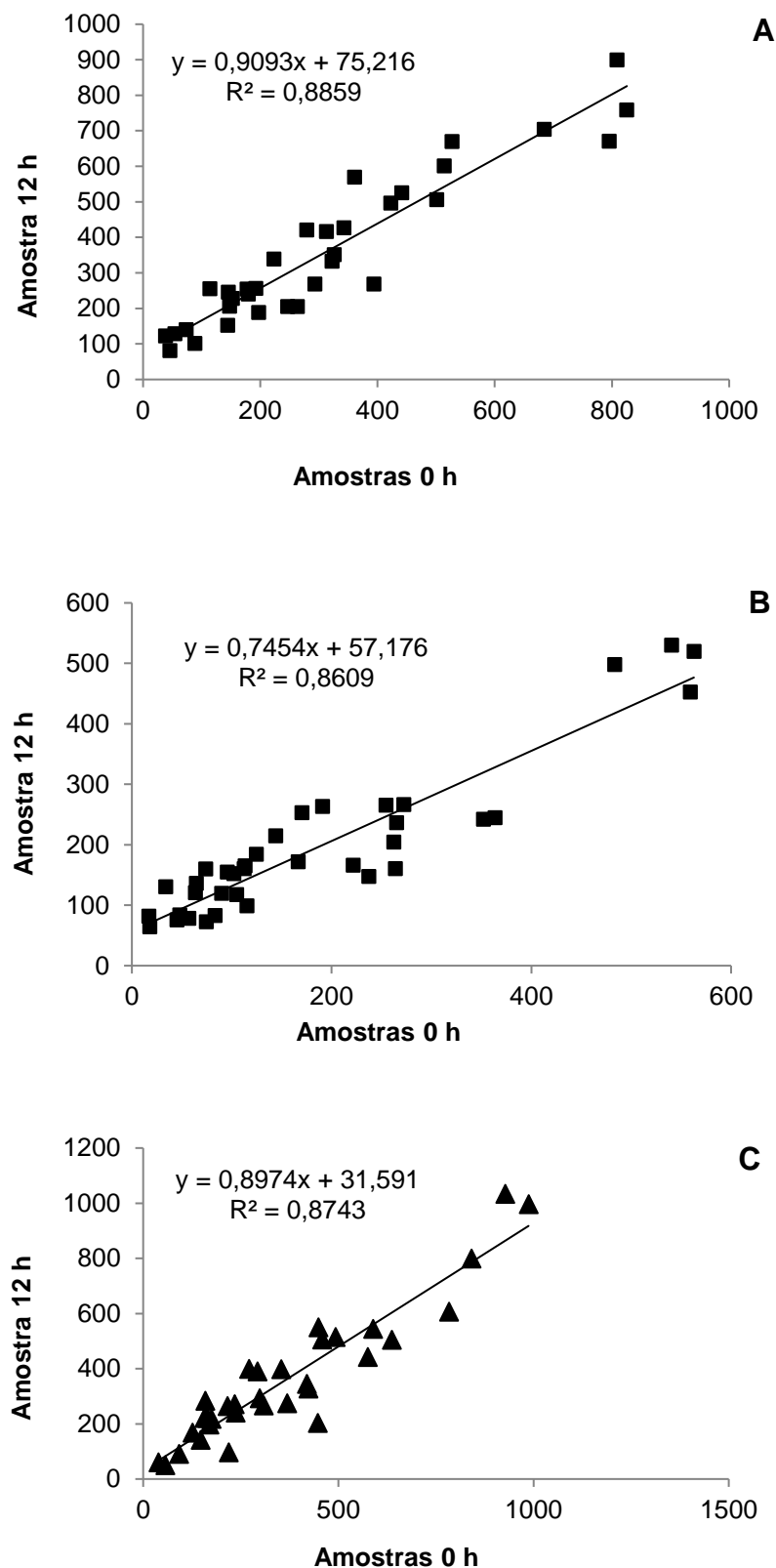


Figura 20 - Relação entre os teores de ácido úrico (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=34; Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão=1; B: amostras em meio básico. n=36; Intercepto $\neq 0$; Coeficiente de regressão $\neq 1$; C: amostras em meio sem conservante. n=33; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1.

O efeito de tempo após 12 horas, em amostras de urina de ovinos para alantoína, foi linearmente ($P < 0,05$) relacionado com aqueles obtidos nas mesmas amostras congeladas no tempo zero (Figura 21), os coeficientes de determinação para amostras ácidas, básicas e sem conservantes foram $R^2 = 0,8839$; $R^2 = 0,8362$ e $R^2 = 0,8842$, respectivamente, com coeficiente de variação de 32,14; 39,48 e 32,36. O coeficiente de regressão foi igual a 1 para amostras ácidas, e diferente de 1 para os meios básicos e sem conservante, o intercepto foi igual a zero para todos os meios de conservação avaliados.

A concentração de alantoína nas amostras de urina de ovinos no decorrer do tempo de 12 horas, somente o meio ácido manteve estável no decorrer do tempo. Tanto o meio básico quanto o meio sem conservante no decorrer do tempo não conseguiram conservar a alantoína, o que fica evidente que a metodologia por acidificação ainda é a mais aconselhada para conservar amostras de urina de ovinos no decorrer do tempo.

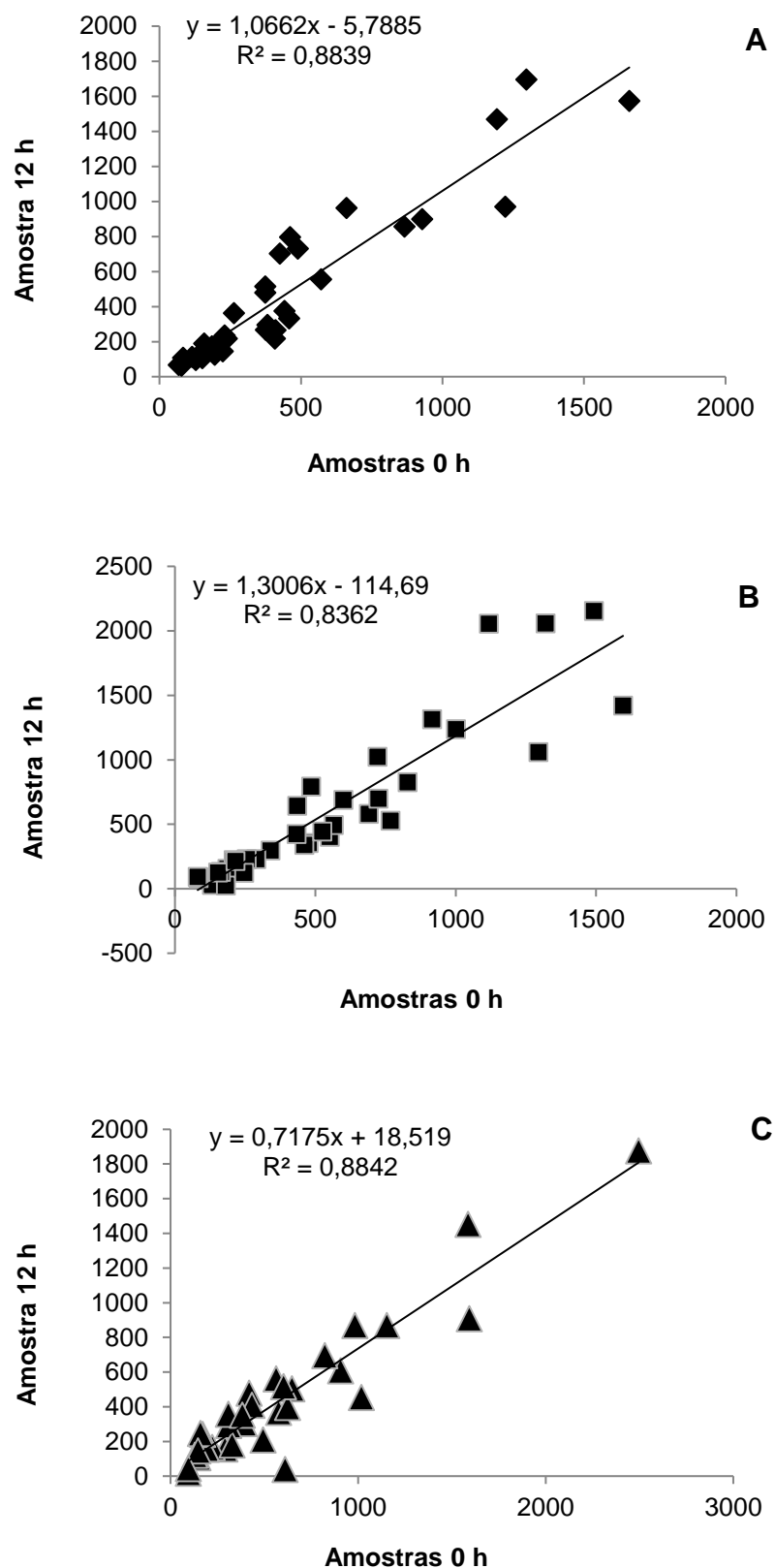


Figura 21 - Relação entre os teores de alantóina (mg/L) em amostras de urina de ovinos, tratadas ou não com conservantes, obtidas em temperatura ambiente nos tempos 0h versus 12h; A: amostras em meio ácido. n=34; Intercepto =0; Coeficiente de regressão =1; B: amostras em meio básico. n=35; Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1; C: amostras em meio sem conservante. n=34; Intercepto =0; Coeficiente de regressão ≠1.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, não há necessidade de adição de ácido ou base em amostras de urina para quantificar a excreção de creatinina, uréia ou ácido úrico, enquanto que uma base deve ser adicionada nas amostras para quantificação da excreção de alantoína. A sonicação de todas as amostras de urina antes da análise também é um procedimento recomendado, principalmente para análise de alantoína.

REFERÊNCIAS

- ANALITICA; Empresa de equipamentos para laboratório; banho ultrassônico. 1992. Disponível em <https://www.analiticaweb.com.br/produtos_detalhe.php?Bid=p589868da848bd.> Acesso em 11/11/2018.
- BARBOSA, ANALÍVIA MARTINS et al. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes protéicas sobre a excreção de creatinina, de uréia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore1. R. Bras. Zootec., v.35, n.3, p.870-877, 2006.
- BERCHIELLI, TELMA TERESINHA et.al. Nutrição de ruminantes. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011.
- CHEN, X. B.; e GOMES, M. J. Estimation o microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivates- Na overview of the technical details. **International Feed Resources Unit Rowett Research Institute**, Buckurn Aberdeen, UK, Ocasional publication, p.22, 1992.
- CHEN, X.B.; MEJIA, A.T.; ORSKOV, E.R. 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*, v.125, p.137-143, 1995.
- GARCIA, ALEXANDRE; gerente da ELMA. Informativo sobre banho ultrassônico e suas finalidades. Nova Analítica Imp e Exp Ltda. 2015. Disponível em <https://www.analiticaweb.com.br/informe/banhos-elma-03-2015/elma_aplicacoes_faq.pdf>. Acesso em 12/12/2018.
- KOZLOSKI, GILBERTO VILMAR. Bioquímica dos ruminantes.- 3. ed. Ver. E ampl. - Santa Maria : Ed da UFSM, 2011.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of beef cattle. 7.ed. Washington: National Academic Press, 1996, 242p.
- NELSON, DAVID L. Princípios de bioquímica de LEHNINGER/ David L Nelson, Michael M. Cox; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Viega... et al.]; revisão técnica: Carlos Termignoni... [et al.]-6. Ed. -Porto Alegre : 2014
- OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.5, p.1621-1629. 2001.
- PEREZ, J.F.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A. et al. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using ¹⁵N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenal. *British Journal of Nutrition*, v.75, p.699-709, 1996.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; LEÃO, M.I. et al. Estimativa da Produção de Proteína pelos Derivados de Purinas na Urina em Novilhos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.4, p.1223-1234, 2000.

RENNÓ, L.N.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Níveis de proteína na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: estimativa da produção de proteína microbiana por intermédio dos derivados de purinas na urina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. Anais... Santa Maria: 2003. CD-ROM.

SILVA, R.M.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Uréia para vacas em lactação. 2. Estimativas do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de uréia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.6, p.1948-1957, 2001.

SIGMA-ALDRICH. Informativo sobre alantoína. Catalog, Product Specification, Sigma-Aldrich. Saint Louis, Missouri 63103 USA. 2015. Disponível em <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 10/9/2018.

SIGMA-ALDRICH. Informativo sobre ácido urico. Catalog, Product Specification, Sigma-Aldrich. Saint Louis, Missouri 63103 USA. 2015. Disponível em <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 10/9/2018.

SIGMA-ALDRICH. Informativo sobre Creatinina. Catalog, Product Specification, Sigma-Aldrich. Saint Louis, Missouri 63103 USA. 2015. Disponível em <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 10/9/2018.

SIGMA-ALDRICH. Informativo sobre hipoxantina. Catalog, Product Specification, Sigma-Aldrich. Saint Louis, Missouri 63103 USA. 2015. Disponível em <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 10/9/2018.

SIGMA-ALDRICH. Informativo sobre ureia. Catalog, Product Specification, Sigma-Aldrich. Saint Louis, Missouri 63103 USA. 2015. Disponível em <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 10/9/2018.

SIGMA-ALDRICH. Informativo sobre xantina. Catalog, Product Specification, Sigma-Aldrich. Saint Louis, Missouri 63103 USA. 2015. Disponível em <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 10/9/2018.

Young, E. G. and Conway, C.F.,. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.*, 142:839-852; 1942.