



ARTIGO 286

METODOLOGIAS DE COLETA DE URINA PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS METABÓLICOS COM BOVINOS CONFINADOS E EM PASTEJO

Collection methodologies urine for application in metabolic trials with feedlot cattle and grazing

Hermógenes Almeida de Santana Júnior^{2*}, Elizângela Oliveira Cardoso Santana³, Antônio Hosmylton Carvalho Ferreira², George Abreu Filho³, Pablo Teixeira Viana³, Maurílio Souza dos Santos²

RESUMO: A investigação dos efeitos da dieta no metabolismo animal é o primeiro passo para a predição do desempenho animal, fator primordial ao planejamento nutricional. Dentre as técnicas investigativas do metabolismo animal, a avaliação de síntese bacteriana por meio da urina vem crescendo na nutrição de ruminantes. As técnicas utilizadas são os métodos com técnicas de uso de marcadores e o método de excreção de derivados de purinas na urina são exemplos de métodos utilizados para estimar a síntese bacteriana. Na coleta de urina para aplicação em ensaios metabólicos em bovinos confinados e em pastejo recomenda-se a coleta *spot* por micção espontânea, podendo utilizar a estimulação manual quando necessário. A forma de coleta poderá variar em função do sexo, decorrente da localidade de saída da urina, mas sempre tendo acuidade para evitar contaminações. Para coleta de urina de animais em confinamento existem diversos materiais para coleta, entretanto para bovinos em pastejo, ainda são necessários mais estudos para elevar a praticidade e rapidez da coleta. Objetivou-se com esta revisão, compilar informações sobre a coleta de urina para aplicação em ensaios metabólicos com bovinos confinados e em pastejo.

Palavras chaves: Creatinina, metodologia, nutrição, proteína, purina, ruminante

ABSTRACT: The investigation of the effects of diet on animal metabolism is the first step for the prediction of animal performance, the primary nutritional planning factor. Among the investigative techniques of animal metabolism, evaluation of bacterial synthesis through the urine has been growing in ruminant nutrition. The techniques used are the methods with techniques for using markers and method of excretion of purine derivatives in urine are examples of methods used to estimate the bacterial synthesis. In collecting urine for application in metabolic trials in feedlot cattle grazing and the gathering spot for spontaneous urination is recommended and may use manual stimulation when needed. The fashion collection will vary according to sex, due to the locality of urine output, but always with accuracy to avoid contamination. To collect urine of animals in confinement are various materials for collection, however for cattle grazing, further studies are necessary to increase convenience and speed of collection. The objective of this review, compile information about collecting urine for application in metabolic trials with feedlot cattle and grazing.

Keywords: Creatinine, methodology, nutrition, protein, purine, ruminant

¹Graduando em Zootecnia na Universidade Estadual do Piauí, *Campus* Dep. Jesualdo Cavalcanti de Barros, Corrente/PI.

²Professor Adjunto da Universidade Estadual do Piauí, *Campus* Dep. Jesualdo Cavalcanti de Barros, Corrente/PI. *E-mail: hsantanajunior@hotmail.com

³Doutorando em Zootecnia na Universidade Estadual do Sudoeste Bahia, *Campus* Juvino Oliveira, Itapetinga/BA



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) (Barbosa et al., 2006).

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. Considerando que o objetivo básico nos estudos de alimentação de ruminantes é maximizar a síntese de proteína microbiana (Pmic), em virtude de seu excelente balanceamento de aminoácidos (Valadares Filho & Valadares, 2001), torna-se fundamental o estudo de métodos para coleta de urina com o intuito de nortear o metabolismo de N.

A urina é um dos principais fluídos de excreção de substâncias nocivas ao organismo. Ela é produto de seletiva e específica filtração do sangue pelos rins, acrescida de células e porventura bactérias presentes nos ureteres, bexiga, uretra e da genitália, resultando normalmente num fluído de coloração amarelada, variando seu tom de acordo com a concentração da urina (Ortolani, 2003).

Considerando que a maior parte do rebanho brasileiro é criada a pasto, é praticamente impossível proceder-se à coleta total de urina. Segundo Valadares et al. (1997), é possível simplificar a coleta de urina utilizando-se a excreção de creatinina na urina como indicador da produção urinária diária. Assim, sugere-se coletar uma amostra isolada, denominada amostra spot, o que pode simplificar a estimação da produção de urina em condições de campo.

Chen et al. (1992) avaliaram a variação da concentração de creatinina e derivados de purina no soro e na urina e

quatro novilhas, com peso médio de 204 kg, e detectaram variações nas concentrações urinárias de creatinina de derivados de purina ao longo do dia (08h00-12h00, 12h00-16h00, 16h00-20h00, 20h00-00h00, 00h00-08h00). Sobretudo Pereira (2009) não encontrou variações avaliando os períodos do dia (00h00-04h00, 04h00-08h00, 08h00-12h00, 12h00-16h00, 16h00-20h00, 20h00-00h00).

Objetivou-se com esta revisão, compilar informações sobre a coleta de urina para aplicação em ensaios metabólicos com bovinos confinados e em pastejo.

REVISÃO DE LITERATURA

Por muitos anos, utilizaram-se os métodos com técnicas utilizando marcadores para estimar a produção de proteína microbiana estão relacionados com a quantidade de nitrogênio microbiano. Em uma revisão com marcadores microbianos, Broderick & Merchen (1992) recomendaram a utilização de bases purinas e ^{15}N como indicadores para medir a produção de biomassa microbiana, porém alertaram para o problema da relação purinas:N diferir entre bactérias e protozoários.

Em contrapartida, todos os métodos supracitados necessitaram de animais com a presença de fístulas, entretanto métodos recentes baseados na utilização da excreção de derivados de purinas na urina não requerem o uso de animais fistulados, mas indicaram uma necessidade da coleta de urina total. Como vantagem dos métodos recentes cita-se a eliminação de possíveis efeitos não atribuídos ao tratamento, decorrentes de desconfortos ou infecção pela presença das fístulas, com potencial para condições de uso a campo (Bezerra et al., 2010).

O uso da excreção de derivados de purina como marcador metabólico da síntese microbiana tem sido uma alternativa moderna às técnicas invasivas, sendo a mesma proposta em 1962 por Blaxter & Martin.

As pesquisas ao longo dos últimos anos confirmaram a relação entre produção de proteína microbiana e excreção urinária de



derivados de purinas (Perez et al., 1996; Mendonça et al., 2004; Ojeda et al., 2005; Bezerra et al., 2010). Chen & Gomes (1992) afirmaram que, para reduzir erros atribuídos a variações na produção urinária, as coletas de urina deveriam ser feitas durante pelo menos cinco dias, o que tinha como pré-requisitos a disponibilidade de mão-de-obra e tempo para coleta.

Segundo Fleming et al. (1991), período de coleta com duração de 24 horas poderia ser representativo da produção urinária. De acordo com os citados, Valadares et al. (1997), utilizando quatro vacas em blocos ao acaso com sete períodos de coleta de urina (2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas), observaram que não houve diferença significativa em termos de excreção de creatinina entre as coletas com duração de 24, 48 ou 72 horas, e que as coletas com duração de 96 horas resultaram em menores excreções de creatinina, provavelmente devido a lesões de graus variáveis do trato urinário, vazamento de urina do cateter ou obstrução do cateter, que são problemas frequentemente relacionados ao emprego dessa técnica por longos períodos. Com isso os autores concluíram que amostras representativas de urina poderiam ser obtidas por período de 24 horas, acarretando em maior aplicabilidade da técnica.

Para Leal et al. (2007), a ausência de efeito de número de dias sobre a excreção de creatinina tem grande aplicação prática, pois, além de reduzir o trabalho, permite a diminuição dos custos da pesquisa, dispensando a coleta de urina durante períodos longos, sugerindo que as coletas sejam feitas durante 24 horas. Já para Mendonça et al. (2004), o volume urinário produzidos em 24 horas podem ser estimados a partir da coleta parcial de oito horas quando o estudo for com vacas leiteiras em lactação.

Além da utilização do método não invasivo para medir a produção de proteína microbiana utilizando coletas de urina com duração de 24 horas, outro grande avanço é a possibilidade de se estimar o volume urinário

com uma única amostra de urina, denominada amostra *spot*, geralmente obtida por micção espontânea, quatro horas após a alimentação, conforme descrito por Valadares et al. (1999). A estimação do volume urinário de 24 horas obtida a partir de amostra *spot* baseia-se na relativa constância da excreção de creatinina, descrita por Palmer et al. (1914), citados por Orskov & Macleod (1982).

A metodologia de coleta de uma amostra *spot* de urina, ou seja, de uma única amostra diária de urina, possibilita estimar o volume urinário produzido diariamente por um animal. Geralmente, a amostra é obtida quatro horas após a alimentação, período em que a concentração plasmática e urinária destes compostos já tenha alcançado o platô e nela se determina a concentração de creatinina, cuja excreção é constante (Bezerra et al., 2010).

A maioria dos experimentos tem usado animais machos em gaiolas de metabolismo, onde o procedimento é relativamente simples. No entanto, a coleta total de urina de fêmeas e a de animais em pastejo é mais difícil ou até mesmo impraticável (Bezerra et al., 2010). Alguns pesquisadores, entre eles, Susmel et al. (1994), Vagnoni et al. (1997) e Mendonça et al. (2004) realizaram coletas de urina, em fêmeas, utilizando cateteres, sendo que o tempo de coleta variou de cinco dias, três dias, um a quatro dias e um dia, respectivamente. Contudo, Chen & Gomes, (1992) constataram que a mensuração desses derivados numa única amostra de urina coletada em qualquer horário, desde que corrigida pela creatinina, também refletia a quantidade total urinária excretada dessas substâncias em 24 horas. Todavia, esta informação facilitou e disponibilizou esta técnica para análise de perfil fermentativo ruminal em rotina laboratorial, mas, infelizmente, verifica-se poucos artigos científicos neste aspecto, o que poderia consolidar ainda mais os experimentos nutricionais em bovinos.

Segundo Barbosa et al., (2006), a excreção de creatinina é relativamente



constante em função do peso vivo pelo fato de ser pouco ou não afetada por fatores dietéticos. Essa determinação torna possível a simplificação de métodos que requerem a coleta total de urina. Utilizando-se a concentração de creatinina na urina como indicador da produção urinária, pode-se estimar a excreção dos derivados de purina e de outros compostos nitrogenados (Chen et al., 1995; Rennó et al., 2000a; Oliveira et al., 2001; Silva et al., 2001; Rennó et al., 2003).

Rennó et al. (2000b), trabalhando com novilhos encontraram valor médio para excreção diária de creatinina de 27,4 mg/kg peso corporal. Os autores afirmaram que a partir da concentração de creatinina na amostra *spot* de urina, o volume de urina (expressa em L) pode ser estimado, dividindo-se a excreção diária de creatinina (mg) pela concentração de creatinina (mg/L).

Barbosa et al. (2006) não observaram diferenças entre as médias da produção de compostos nitrogenados microbianos (Nmic), expressa em g N/dia, obtidos pela coleta total e pela estimativa via coleta *spot* de urina nos dois níveis de concentrado e nas quatro categorias de bovinos (novilhas, machos inteiros e não inteiros ou vacas em lactação). Esta ausência de diferença para a produção de Nmic obtida pelas coletas total e *spot* de urina também foi verificada por Silva et al. (2001), trabalhando com vacas leiteiras. Os mesmos autores verificam também que o período de coleta de 24 horas é suficiente para trabalhos com bovinos Nelore, independente da categoria.

A creatinina é um produto metabólico do qual o corpo já não necessita, não sendo utilizada para formação de novas moléculas, portanto, excretada em grandes quantidades pelos rins. A produção diária de creatina, por conseguinte, a excreção de creatinina, é dependente da massa muscular e é proporcional ao peso do animal (Bezerra et al., 2010).

Dados da literatura têm demonstrado que a excreção de creatinina é constante, em função do peso corporal dos animais (Susmel

et al., 1994; Vagnoni et al., 1997; Oliveira et al., 2001; Silva et al., 2001). De outra forma, foi observado também que a relação entre a concentração dos derivados das purinas e creatinina em amostra de urina é relativamente constante ao longo do dia (Chen & Gomes, 1992). Com base nisso, tem sido sugerido o uso da concentração de creatinina em amostras pontuais de urina como um indicador da excreção urinária total dos animais. Para Kozloski et al. (2005) a estimativa da produção urinária dos animais, com base na concentração de creatinina em amostras pontuais de urina, pode ser confiável somente se, em pelo menos um animal representativo de um grupo experimental, for realizada coleta total de urina para medida da excreção média deste metabólito por unidade de peso corporal. Além disso, amostras pontuais de urina devem ser coletadas em diferentes horários para construir uma amostra composta representativa de um ciclo de 24 horas.

Oliveira et al. (2001), Barbosa et al. (2006), Chizzotti et al. (2006) e Leal et al. (2007) também encontraram resultados semelhantes, e confirmaram que a coleta de amostra *spot* de urina é satisfatória, substituindo a coleta de 24 horas, para estimativa da produção de proteína microbiana em novilhas, inteiros ou castrados e vacas lactantes da raça Nelore.

Apesar das vantagens acima citadas na coleta *spot*, a criação desse novo método de estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purina surgiu com algumas limitações. No cálculo da estimativa, assume-se que pequena porção do ácido de nucléico dietético alcança o intestino delgado (Chen & Gomes, 1992).

Bezerra et al. (2010) afirmaram que é importante o desenvolvimento de metodologias que permitam o menor tempo possível de coleta de urina para estimar o volume urinário e que sejam menos invasivas, ou até mesmo que tornem desnecessária a coleta total de urina, como é o caso da coleta de urina *spot*, que pode ser utilizada como



estimativas baseadas na excreção de creatinina, excreções de derivados de purina e da produção de proteína microbiana.

Neste sentido, a utilização da excreção total de derivados de purina para estimar a produção de proteína microbiana, parece ser uma alternativa viável, quando comparada com as técnicas invasivas, com é o caso da utilização da fístula em animais, principalmente, por se tratar de uma técnica que não necessita de intervenção cirúrgica, o que resulta em melhor bem-estar para os animais (Bezerra et al., 2010).

Cao et al. (2009) recomenda a utilização de um aparelho para coleta de urina composto por três componentes (Figura 1, 2 e 3): canal (posicionando seu início antes da uretra até o exterior do animal), copo coletor e tambor de armazenamento. Observa-se que este equipamento só é viável sua utilização em bovinos confinados, devido à

impossibilidade de deslocamento durante a coleta. Salienta-se que apesar dos autores afirmarem que o equipamento não incomoda os animais em coleta, verifica-se que é necessário várias amarrações para maior segurança do equipamento, acarretando em situação não comum aos bovinos.

Lascano et al. (2010) sugeriram alteração do método de coleta não invasivo para bovinos fêmea, embasado na argumentação que a coleta total de urina de bovinos fêmeas requer a uso de cateteres urinários ou um dispositivo externo exigindo uma fixação segura com adesivo à animal. O dispositivo de coleta de urina foi feita a partir de polipropileno com dimensões máximas (altura x largura x profundidade) de $17,5 \times 11,0 \times 6,0$ cm e uma abertura de aproximadamente 42 cm^2 para cobrir a vulva, conforme figura 4..



Figura 1 – Visão da porção interna do equipamento

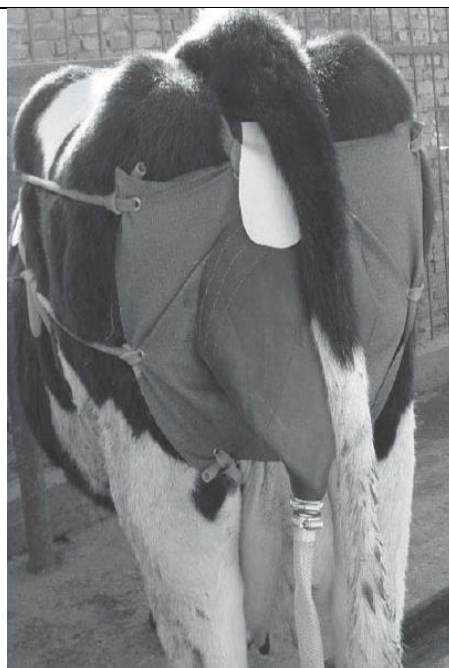


Figura 2 – Visão do copo coletor de urina

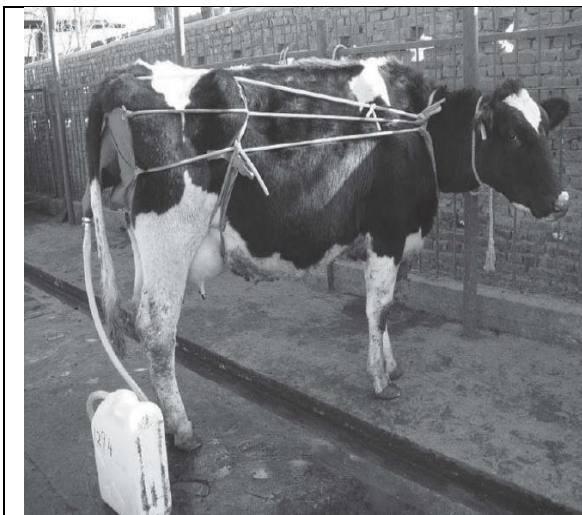


Figura 3 – Visão do tambor de armazenamento

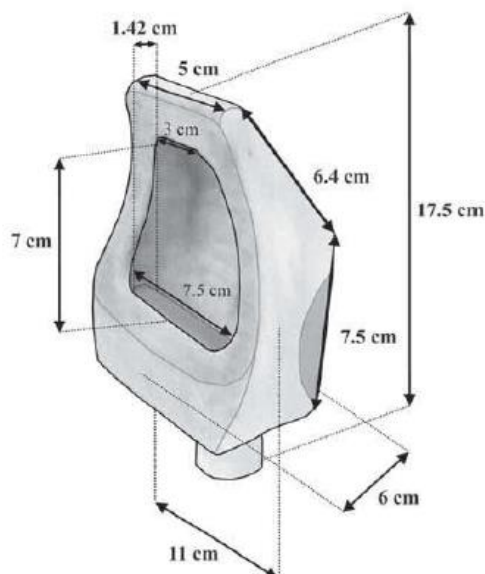


Figura 4 – Copo coletor de urina adaptado da versão de Fellner de 1988.

Destacam-se algumas maneiras de estimular a micção de bovinos, sendo nos machos, a massagem prepucial e o ruído de marulhar de agitação de água num balde estimulam fortemente a micção. Nas fêmeas, este fenômeno ocorre com a massagem suave na região perineal e vulvar (Ortolani, 2003).

Segundo Ortolani (2003), caso o animal tenha dificuldade de urinar pode ser empregado o uso de diuréticos, tal com a furosemida (0,8 a 1,5 mg/kg de peso corporal). A primeira micção geralmente ocorre, em média, 17 minutos após o tratamento com furosemida [iv.]. Contudo, a urina obtida com o uso de furosemida, já na 1ª coleta, é significativamente mais ácida e com menor osmolaridade que obtida por meio de estimulação manual.

Apesar de não conter na literatura é corriqueira, nos estudos com bovinos a pasto no Brasil, a coleta de urina ser no último dia experimental, quando em delineamento inteiramente ao acaso ou blocos casualizados,

e no último dia de cada período quando em delineamento em quadrado latino. Isso ocorre em virtude da necessidade de modificação da rotina normal dos animais, onde os mesmos são condicionados em local restrito, possibilitando assim a coleta de urina via micção espontânea.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na coleta de urina para aplicação em ensaios metabólicos com bovinos confinados e em pastejo recomenda-se a coleta *spot* por micção espontânea, podendo utilizar a estimulação manual quando necessário.

A forma de coleta poderá variar em função do sexo, decorrente da localidade de saída da urina, mas sempre tendo acuidade para evitar contaminações.

Para coleta de urina de animais em confinamento existem diversas materiais para coleta, entretanto para bovinos em pastejo, ainda são necessários mais estudos para elevar a praticidade e rapidez da coleta.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, A.M.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. 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 Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.870-877, 2006.

BEZERRA, L.R.; GONZAGA NETO, S.; OLIVEIRA, J.S. et al. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purina. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v.6, n.3, p.7-14, 2010.

BRODERICK, G.A.; MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2618-2632, 1992.

CAO, Z.J.; MA, M.; YAN, X.Y. et al. A simple urine-collecting apparatus and method for cows and heifers. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5224-5228, 2009.

CHEN, X.B., GRUBIC, G., ORSKOV, E.R. et al. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **Animal Production**, v.55, p.185-191, 1992.

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

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.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, F.H.M. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1813-1821, 2006.

FLEMING, S.A.; HUNT, E.L.; RIVIERE, J.E. et al. Renal clearance and fractional excretion of electrolytes over four 6-hour periods in cattle. **American Journal Veterinary Research**, v.52, n.1, p.5-8, 1991.

KOZLOSKI, G.V.; FIORENTINI, G.; HARTER, C.J. et al. Uso da creatinina como indicado da excreção urinária em ovinos. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.98-102, 2005.

LEAL, T.L.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.896-904, 2007.

MENDONÇA, S.S.; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Balanço de compostos nitrogenados, produção de proteína microbiana e concentração plasmática de uréia em vacas leiteiras



alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.493-503, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington: National Academic Press, 1996, 242p.

OJEDA, A.; PARRA, O.; BARCELLS, J. Urinary excretion of purine derivative in *Bos indicus* x *Bos Taurus* crossbred cattle. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.6, p.821-828, 2005.

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.

ORSKOV, E.R.; MACLEOD, N.A. The determination of minimal nitrogen excretion in steers and dairy cows and its physiological and practical implications. **British Journal of Nutrition**, v.47, p.625-636, 1982.

ORTOLANI, E.L. 2003. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. González, F.H.D.; Campos, R. (eds): Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Porto Alegre. **Anais...** Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.91-102, 2003.

PEREIRA, V.S.A. **Influência do peso corporal e das características de carcaça sobre a excreção de creatinina e utilização de coleta spot de urina para estimar a excreção de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas Nelore**. 2009. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

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 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. Nutrição de ruminantes.

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, 2000a.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Concentração plasmática de ureia e excreções de ureia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1235-1243, 2000b.



SILVA, R.M.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Ureia 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.

SUSMEL, P.; STEFANON, B.; PLAZZOTA, E. et al. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. **Journal of Agricultural Science**, v.123, p.257-266, 1994.

VAGNONI, D.B.; BRODERICK, G.A. Effects of supplementation of energy or ruminally undegraded protein to lactating cows fed alfafa hay or silage. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1703-1712, 1997.

VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. Teores de proteína em dietas de vacas de leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GADO DE LEITE, 2.,2001, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001.

VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Effect of replacing alfalfa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v.8, p.2686-2696, 1999.

VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M. et al. Níveis de proteína em dietas de bovino. 4. Concentrações de amônia ruminal e uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.6, p.1270-1278, 1997.