



Vítor Augusto Silveira

**Substituição parcial de farelo de soja por ureia de
liberação lenta para vacas leiteiras**

Lavras – MG

2013

VÍTOR AUGUSTO SILVEIRA

**SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE FARELO DE SOJA POR UREIA DE
LIBERAÇÃO LENTA PARA VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Marcos Neves Pereira

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silveira, Vitor Augusto.

Substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta para vacas leiteiras / Vitor Augusto Silveira. – Lavras : UFLA, 2013. 90 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Marcos Neves Pereira.
Bibliografia.

1. Nitrogênio não proteico. 2. Optigen®II. 3. Ureia encapsulada. 4. Gado leiteiro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.208557

VÍTOR AUGUSTO SILVEIRA

**SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE FARELO DE SOJA POR UREIA
DE LIBERAÇÃO LENTA PARA VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de maio de 2013

Dr. Gustavo Augusto Andrade

IFSULDEMINAS/ Machado

Dr. José Camisão de Souza

UFLA

Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira

EPAMIG

Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

LAVRAS - MG

2013

Ao meu pai, José Ananias, principalmente por ter adquirido dele essa vontade pela atividade e o amor ao que faço. À minha mãe, Maria Madalena, pelos conselhos, atenção e constante apoio.

A minha irmã, Bianca, pelo companheirismo.

Aos meus avós, José Augusto Silveira Neto (Fiote) e Maria Zilda Queiroz que, mesmo não estando presentes, tenho certeza de que sempre iluminaram meus passos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao senhor Deus todo poderoso, pela iluminação nesta caminhada.

A todos os meus familiares, principalmente meus pais, pela educação e exemplo de vida.

Ao professor e orientador Marcos Neves Pereira, pela intensa paciência e contribuição, com seus ensinamentos, exemplo de amizade e profissionalismo. Ao professor Rodrigo Almeida, pela colaboração e suporte a este experimento.

Aos membros da banca, Gustavo, José Camisão e Renata, que, sem dúvida, foram essenciais na minha formação.

Aos companheiros de trabalho, Alexandre, Paulão, Karina, Rafael e Bruno.

À grande amizade e companheirismo da Naina, sem dúvida uma verdadeira irmã durante todos esses anos de convívio e pela intensa contribuição a este projeto.

Ao Grupo do Leite, Fazenda São Francisco e FAEPE, uma escola para mim, onde conquistei grandes amigos e conhecimentos que levarei por toda a vida.

Aos moradores da República Labirinto, pela amizade e companheirismo. Principalmente ao Lucas e ao Tiel, pela sincera amizade desde criança e pelo convívio durante todos esses anos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão da bolsa de estudos durante a graduação e à CAPES, durante o período de pós-graduação.

À empresa Alltech, que proporcionou a condução deste experimento, principalmente a Winston, Flavia, Emanuelle e Andrea que, além de excelentes profissionais, são pessoas pelas quais tenho muita admiração e, de certa forma, me ajudaram muito no sucesso deste trabalho.

Às Fazendas Rhoelandt e Frank'Anna, que abriram as portas para nós, possibilitando a condução deste experimento.

A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste sonho.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Nutrição proteica em vacas leiteiras	16
2.2	Modelos nutricionais para balanceamento de proteína em vacas leiteiras	18
2.3	Metabolismo proteico em ruminantes.....	21
2.3.1	Ureia como fonte de NNP e seu metabolismo.....	21
2.3.2	A reciclagem de N em vacas leiteiras	25
2.3.3	Concentrações de amônia para a maximização da síntese de proteína microbiana.....	27
2.3.4	Proteína degradável e carboidratos na síntese de microbiana	30
2.3.5	Eficiência na utilização de nitrogênio em vacas leiteiras.....	34
2.3.6	Avaliação do nitrogênio ureico no leite como diagnóstico ao uso de proteína.....	37
2.3.7	Mecanismo de depressão de consumo causado por fontes de NNP ...	42
2.3.8	Balanceamento por proteína degradável no rúmen e respostas ao uso de ureia.....	52
2.4	Ureia de liberação lenta no rúmen para vacas leiteiras	55
2.5	Proteína e reprodução	65
2.6	Estudos realizados em rebanhos comerciais.....	68
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	70
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.	CONCLUSÃO	87
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação do consumo, segundo a Teoria da Oxidação Hepática. Fonte: adaptado de Allen et al. (2009).....47

Figura 2: Mecanismo proposto para controle da ingestão pela oxidação hepática. NTS = núcleo do trato solitário. AMPK = proteína quinase ativada pela adenosina-5'-monofosfato. Fonte: adaptado de Allen et al. (2009).49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da dieta basal em ingredientes (% da MS). Experimento 2	75
Tabela 2: Composição das pré-misturas nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2.....	76
Tabela 3: Composição da dieta oferecida e da sobra alimentar nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 1.....	78
Tabela 4: Composição da dieta oferecida e da sobra alimentar nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2.....	80
Tabela 5: Produção, composição do leite, relação entre alantoína e creatinina na urina e descrição dos animais nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 1.....	83
Tabela 6: Produção, composição do leite, relação entre alantoína e creatinina na urina e descrição dos animais nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2.....	84
Tabela 7: Consumo e eficiência leiteira do grupo de vacas nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 1.....	86
Tabela 8: Consumo e eficiência leiteira do grupo de vacas nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2.....	86

RESUMO

Dois experimentos foram conduzidos para se avaliar a substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta (Optigen®II, Alltech do Brasil, Curitiba, PR). Na dieta Controle, 1 kg de farelo de soja foi substituído por mistura isonitrogenada que continha 160 g de Optigen®II + 2,5 kg de silagem de milho, no Exp.1 ou 150 g de Optigen®II + 850 g de milho moído fino, no Exp.2. No Exp.1, 61 vacas Holandesas foram blocadas e alocadas em um tratamento, por 21 dias e as medidas da mesma variável, no final da padronização, utilizadas como covariável. No Exp.2, 97 vacas foram alocadas em uma sequência dos dois tratamentos, por 21 dias, em delineamento de reversão simples. A resposta aos tratamentos foi avaliada do dia 17 ao dia 21. Em ambos os experimentos, não houve diferenças entre os tratamentos na composição, em nutrientes, da dieta oferecida e das sobras, nas sobras como % do oferecido, no peso vivo e no escore de condição corporal dos animais. A produção diária de leite foi de 38,4 kg/dia, no Controle; de 38,9 kg/dia no Optigen (P=0,62), no Exp.1 e de 27,0 kg/dia e 27,2 kg/dia, no Exp.2 (P=0,64). A ureia encapsulada reduziu a porcentagem de gordura no leite no Exp.2 (P=0,04). O Optigen®II aumentou o nitrogênio ureico no leite, de 16,3 para 17,3 mg/dL, no Exp.1 (P<0,01) e as relações entre o leite produzido e o alimento consumido (P=0,08) e entre a alantoína e a creatinina urinárias (P=0,03), no Exp.2. A substituição parcial de farelo de soja por Optigen®II não induziu queda no desempenho.

Palavra-chave: nitrogênio não proteico, Optigen®II, ureia encapsulada.

ABSTRACT

Partial replacement of soybean meal by slow release urea for dairy cows

Two experiments evaluated the partial replacement of soybean meal by encapsulated urea (Optigen[®]II, Alltech do Brasil, Curitiba, Brazil). From a Control diet, 1kg of soybean meal was replaced by an isonitrogenous mixture containing 160g of Optigen[®]II + 2.5kg of corn silage in Exp.1, or 150g of Optigen[®]II + 850g of finely ground corn in Exp.2. In Exp.1, 61 Holstein cows were blocked and allocated to a treatment for 21 days, and measures of the same variable at the end of the standardization period were used as covariate. In Exp.2, 97 cows were allocated to a sequence of two treatments for 21 days, in a simple reversal (crossover) design. Response to treatments was evaluated from day 17 to 21. In both experiments, the nutrient composition of the offered diet andorts, orsts as a % of the offered, body weight, and body condition score of the animals did not differ across treatments. Daily milk yield was 38.4kg/dia for Control and 38.9 for Optigen in Exp.1 ($P=0.62$), and 27.0kg/dia and 27.2 in Exp.2 ($P=0.64$), respectively. Encapsulated urea decreased milk fat content in Exp.2 ($P=0.04$). Optigen[®]II increased milk urea nitrogen from 16.3 to 17.3mg/dL in Exp.1 ($P<0.01$) and the ratios of milk produced to feed consumed ($P=0.08$) and allantoin to creatinine in urine ($P=0.03$) in Exp.2. Replacing soybean meal with Optigen[®]II did not induce lower performance.

Keywords: non-protein nitrogen, Optigen[®]II, encapsulated urea.

1. INTRODUÇÃO

A forma de utilizar alimentos ricos em proteína na dieta pode determinar o desempenho animal, a eficiência reprodutiva, o impacto ambiental e a eficiência financeira da atividade leiteira. O alto custo de fontes de proteína verdadeira viabiliza sua substituição parcial por concentrados ricos em nitrogênio não proteico (NNP), como a ureia. Como o teor de nitrogênio (N) em ureia é mais alto que o teor em concentrados proteicos, a substituição isonitrogenada de proteína verdadeira por NNP cria espaço na formulação, possibilitando maior inclusão dietética de subprodutos fibrosos, concentrados energéticos ou forragens. A substituição de proteína verdadeira por NNP também explora a capacidade dos ruminantes de sintetizar proteína microbiana de alta qualidade a partir de ureia (VIRTANEN, 1966), sendo eficiente, biologicamente.

Entretanto, a hidrólise da ureia à amônia no rúmen pode ocorrer a uma taxa superior à capacidade de utilização de amônia para síntese de proteína microbiana, resultando em acúmulo intrarruminal de N amoniacal e perda de N para o sangue e o meio ambiente (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). Em dietas baseadas em silagem de milho e farelo de soja, apenas cerca de 26% do N ingerido foram secretados como N no leite (SANTOS et al., 2011), e perdas urinárias e fecais de N superiores a 70% do ingerido são observáveis em vacas leiteiras (TAMMINGA, 1992). Além dos possíveis impactos negativos sobre o ambiente (ARRIAGA et al., 2009; SMITH; FROST, 2000), o aumento excessivo de N amoniacal e ureico no sangue pode reduzir a eficiência reprodutiva de

vacas leiteiras (BUTLER, 1998; BUTLER et al., 2004) e aumentar a proporção de NNP na proteína do leite (BRODERICK; REYNAL, 2009). Alimentos contendo ureia de liberação lenta no rúmen podem propiciar o uso de NNP em dietas para vacas leiteiras, sem a indesejável perda acentuada de N amoniacal do rúmen para o sangue e melhor eficiência da utilização de N pelas bactérias ruminais.

Uma opção de ureia de liberação lenta é o Optigen®II, no qual a ureia é fisicamente encapsulada por ceras vegetais. Trabalhos *in vitro* sugerem que houve tendência de aumento na síntese microbiana quando Optigen®II substituiu ureia (HARRISON; TRICARICO; DAWSON, 2006). Santos et al. (2011) observaram tendência de aumento na eficiência leiteira, mensurada pela relação entre a produção de leite e o consumo de matéria seca, quando farelo de soja foi substituído por uma mistura isoproteica de Optigen®II e polpa cítrica. Souza et al. (2010) também avaliaram a substituição parcial de farelo de soja por Optigen®II mais subproduto fibroso, neste caso a casquinha de soja, e não detectaram diferença significativa na produção de leite e em seus componentes. Inostroza et al. (2010) observaram que houve aumento na produção de leite por vaca em rebanhos leiteiros que substituíram farelo de soja por Optigen®II e silagem de milho, majoritariamente.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a resposta de vacas leiteiras à substituição parcial de farelo de soja por Optigen®II. Duas estratégias alimentares foram avaliadas. No Experimento I, o farelo de soja foi substituído por uma mistura isoproteica de Optigen®II e

silagem de milho. No Experimento II, a substituição foi por Optigen® II e milho maduro finamente moído.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nutrição proteica em vacas leiteiras

As fontes proteicas, geralmente, representam alto custo na nutrição de vacas leiteiras e, muitas vezes, essas fontes são indispensáveis. Elas fornecem os aminoácidos necessários para a manutenção de funções vitais, como reprodução, crescimento e lactação.

Monogástricos ou não ruminantes precisam de aminoácidos pré-formados presentes nas dietas, para suprir suas exigências proteicas. Por outro lado, ruminantes, diferentemente de monogástricos, têm a capacidade de transformar produtos de baixo valor nutricional, tais como fontes de NNP, em proteína microbiana de alto valor biológico (VIRTANEN, 1966). Essa particularidade está associada à presença de microrganismos ruminais que são capazes de utilizar o N disponível e sintetizar os aminoácidos requeridos pelo animal.

As proteínas são compostas de uma ou grandes cadeias de aminoácidos, podendo ser sequenciada de vinte ou mais aminoácidos diferentes encontrados nas proteínas, que são determinados pelo código genético. Esta sequência de aminoácidos determina a estrutura e a função de cada proteína presente no corpo do animal.

Alguns aminoácidos são essenciais, os quais devem estar presentes na dieta e outros, não essenciais, os quais podem ser sintetizados pelas bactérias ruminais ou pelo próprio animal. De outra

forma, quando o N não está presente na estrutura da proteína, como, por exemplo, N na forma de amônia e ureia, chamam-se estas fontes de NNP.

O NNP não é muito utilizado como valor nutritivo para não ruminantes, porém, em ruminantes podem ser uma fonte de N disponível para as bactérias sintetizarem os aminoácidos e as proteínas necessárias para alcançar o requerimento proteico de vacas leiteiras. O NNP é composto por N presente em estruturas de pequeno peso molecular, como DNA, RNA, amidas, aminas, amônia, aminoácidos livres e pequenos peptídeos. Por outro lado, a proteína verdadeira ingerida representa uma fonte de N oriunda de aminoácidos e peptídeos.

Em 1883, o químico J.C Kjeldhal desenvolveu um método para quantificar o nitrogênio presente nos alimentos, no qual o teor de proteína bruta (PB) de cada alimento equivale ao seu teor de N, multiplicado pela constante 6,25, com exceção das proteínas em leite e trigo, cujas constantes são 6,38 e 5,70, respectivamente (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2005). A constante para cálculo da PB se baseia na premissa de que a proteína nos alimentos contém, em média, 16% de N ($100/16 = 6,25$).

Laboratorialmente, o teor de NNP nos alimentos pode ser mensurado pelo N remanescente em solução, após precipitação da proteína verdadeira com ácido tricloroacético ou tungstênio (LICITRA; HERNANDEZ; SOEST, 1996). Alimentos como gramíneas e leguminosas contêm uma proporção maior e mais variável da PB como NNP. As forragens frescas têm cerca de 10% a 15% da PB como NNP; em forragens ensiladas, este valor varia de 30% a 65% da PB e, em fenos,

é de 15% a 25% (GARCIA et al., 1989; GRUM; SHOCKEY; WESS, 1991; SOEST, 1994).

O NNP contido em forragens frescas é composto, principalmente, por peptídeos, aminoácidos livres e nitratos, e, em forragens fermentadas, é majoritariamente presente como aminoácidos livres, amônia e aminas (SOEST, 1994). A proteólise ocorrida durante o processo de ensilagem e fenação é responsável pelo aumento na proporção da PB como NNP (GARCIA et al., 1989). A partir disso, obter agilidade no processo de ensilagem ou fenação garante uma silagem ou feno de melhor qualidade, devido a uma redução na proporção da PB de NNP. Já em concentrados, o NNP representa cerca de 12% ou menos da PB (LICITRA; HERNANDEZ; SOEST, 1996).

2.2 Modelos nutricionais para balanceamento de proteína em vacas leiteiras

Vacas leiteiras de alta produção requerem consumo de nutrientes para atender às demandas metabólicas da gestação, do ganho de peso, da manutenção e da lactação acima daquele necessário para manter a perpetuação da espécie. Já as vacas modernas têm excreção de energia pela glândula mamária de três a quatro vezes maior que a exigência energética de manutenção. Paralelamente à exigência energética, a exigência proteica também passou a ser tratada de forma mais complexa e novos conceitos na utilização de N passaram a ser discutidos, como a maximização da eficiência de utilização do N dietético (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005; LAPIERRE; LOBLEY, 2001).

No passado (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 1976), a unidade adotada para definir a exigência proteica em dietas para vacas leiteiras era a PB, em vez da consideração simultânea da fração da PB em forma degradável e não degradável no rúmen (NRC, 1989). Mais recentemente, modelos nutricionais incorporaram o conceito de proteína e aminoácidos metabolizáveis aos sistemas de balanceamento proteico (FOX; TEDESCHI; TYLUTKI, 2004; NRC, 2001; TYLUTKI; FOX; MCMAHON, 2004).

Os modelos nutricionais para balanceamento proteico para vacas leiteiras evoluíram a partir do conceito de PB para sistemas que fracionam o teor de N nas dietas (AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC, 1992; NRC, 2001; TYLUTKI; FOX; MCMAHON, 2004). Nestes sistemas, a proteína dietética é dividida em proteína degradada no rúmen (PDR) e proteína não degradada no rúmen (PNDR). A PDR é composta de NNP e proteína verdadeira e a PNDR, por proteína que escapa da degradação ruminal.

O suprimento de quantidades adequadas de PDR e PNDR é necessário para suprir a demanda de N para a síntese de proteína microbiana e para suprir a exigência do animal de proteína metabolizável (PM). PM é o termo adotado pelo NRC (2001) para definir a proteína digerida e absorvida no intestino, tendo origem na PNDR oriunda dos alimentos, na proteína microbiana e na proteína endógena que chega ao intestino. A partir desses conceitos, o valor nutricional da PB de cada alimento é definido pela degradabilidade do N no rúmen, pela digestibilidade pós-ruminal da PNDR e pelo perfil de aminoácidos essenciais na PM oriunda de fonte proteicas (NRC, 2001).

Além disso, os modelos nutricionais consideram que a PB nos alimentos é dividida em frações variando na taxa fracional de degradação ruminal do N (FOX; TEDESCHI; TYLUTKI, 2004; NRC, 2001; TYLUTKI; FOX; MCMAHON, 2004). O desaparecimento ruminal destas frações da proteína é o resultado de duas atividades simultâneas: a primeira, por degradação por microrganismos ruminais a uma determinada taxa fracional de degradação (K_d) ou a segunda, que é determinada pela passagem com a fase fluida do rúmen para o omaso-abomaso a uma taxa fracional de passagem (K_p). A partir desse conceito, definiu-se que a proporção de cada fração proteica degradada no rúmen é dada pela equação $K_d / (K_d + K_p)$.

Atualmente, diversos modelos estão disponíveis e são utilizados no balanceamento de dietas para vacas leiteiras, sendo o NRC e o CNCPS os mais utilizados. A PB no modelo do NRC (2001) é dividida em frações A, B e C, enquanto o modelo de Cornell (CNCPS) divide a PB em cinco frações: A, B1, B2, B3 e C (FOX; TEDESCHI; TYLUTKI, 2004; TYLUTKI; FOX; MCMAHON, 2004).

Os modelos assumem que a fração A é degradada no rúmen a um K_d muito alto (100-200%/h), como no CNCPS, ou com valor tendendo a infinito, como no NRC (2001). Fontes de NNP se enquadram nessa categoria, pois a degradação no rúmen é muito alta, ou seja, a PB dessas fontes é representada, quase que na sua totalidade, pela fração A. A fração B do NRC (2001) corresponde à PB lentamente degradada no rúmen a K_d entre 1,4 e 29,2%/h. Já no CNCPS, a fração B1 representa a proteína verdadeira solúvel, degradada a K_d de 45%/h; a fração B2 representa a proteína solúvel em detergente neutro, degradada a K_d de 5 a

12%/h e a fração B3 representa a proteína insolúvel em detergente neutro, mas solúvel em detergente ácido, degradada a um Kd de 1 a 15%/h. Em ambos os modelos, a fração C corresponde à porção da proteína indigestível, ou seja, a taxa de degradação ruminal sendo igual a zero (Kd=0).

Pelo modelo do NRC (2001), a fração da PB em cada alimento não degradada no rúmen ($B [Kd / (Kd + Kp)] + C$) é assumida como tendo valores fixos de digestibilidade intestinal variando de 50% a 100%. O CNCPS utiliza metodologia diferente. Por este modelo, a digestibilidade intestinal da proporção de cada fração proteica passando pelo rúmen é assumida como 80% para a fração B3, 100% para as frações A, B1 e B2, e 0% para a fração A (SNIFFEN; O'CONNOR; SOEST, 1992). Fontes de NNP praticamente não contribuem para o fluxo de N para o intestino, devido ao alto Kd, servindo apenas para atender à demanda por N pelos microrganismos presentes no rúmen.

De acordo com uma revisão feita por Pacheco et al. (2012), todos os modelos atualmente utilizados por nutricionistas de várias partes do mundo são capazes de balancear corretamente os requerimentos proteicos para vacas leiteiras em campo. Estes mesmos autores ainda concluíram que estes modelos são úteis e indispensáveis quando o objetivo principal é a maximização da eficiência de utilização de N para vacas leiteiras, independente do sistema de produção.

2.3 Metabolismo proteico em ruminantes

2.3.1 Ureia como fonte de NNP e seu metabolismo

A ureia é a fonte de NNP mais utilizada nas dietas de vacas leiteiras e seu uso como ingrediente para ruminantes não é recente. Virtanen (1966) demonstrou a possibilidade de utilização de dietas para vacas leiteiras exclusivamente com fontes de NNP. Esse autor, por alguns anos, alimentou vacas leiteiras, alcançando produções máximas de 4.325 kg, em 305 dias, com dietas contendo sais de amônio e ureia, isentas de fontes de proteína verdadeira.

A ureia apresenta teor médio de N variando de 42% a 46,7%, equivalente a 262% a 292% de PB, sendo formada, na sua totalidade, por NNP. A ureia tem características específicas, como: é deficiente em todos os minerais, não tem valor energético próprio, é extremamente solúvel em água e no rúmen, sendo rapidamente degradada a amônia. A sua rápida liberação de amônia no rúmen é o grande limitante da utilização da ureia para ruminantes, por exceder a capacidade dos microrganismos ruminais em utilizar o N liberado para crescimento microbiano (RUSSELL et al., 1992), o que compromete a eficiência de utilização do N dietético.

A ureia que chega ao rúmen é rapidamente hidrolisada por ureases microbianas, ocasionando a sua rápida liberação de amônia (NH₃) (HRISTOV; BRODERICK, 1994). Essas ureases microbianas presentes no fluido ruminal são oriundas de bactérias anaeróbicas facultativas em menor número e presentes na parede ruminal (WALLACE et al., 1979), e bactérias estritamente anaeróbicas, presentes em maior número no rúmen (HOBSON; WALLACE, 1982). Ambos os grupos conferem atividade urealítica ao fluido, porém, as bactérias presentes na parede ruminal apresentam maior atividade de urease e estão mais relacionadas à hidrólise da ureia que flui do sangue para o rúmen (WALLACE et al.,

1979). Por outro lado, as bactérias estritamente anaeróbicas apresentam menor atividade de urease atuando sobre a ureia de origem dietética e a ureia oriunda via saliva. A atividade desta urease é controlada por concentrações de amônia e ureia presentes no fluido. Altas concentrações de amônia podem deprimir a atividade da urease (WALLACE et al., 1979); já a presença da ureia induz a atividade desta enzima (CZERKAWSKI; BRECKENRIDGE, 1982).

Além de a amônia ser oriunda da hidrólise da ureia dietética, sanguínea e salivar, ela também pode ser gerada por desaminação de AAs no interior das células microbianas (WALLACE, 1996). Algumas bactérias não apresentam mecanismos de transporte de AAs do citoplasma para o meio extracelular e os AAs absorvidos em excesso devem ser excretados do citoplasma como amônia (TAMMINGA, 1979), sendo este o principal mecanismo, visto que de 70% a 80% do N bacteriano passam pelo *pool* de amônia ruminal (HRISTOV; BRODERICK, 1994).

Owens e Bergen (1983) relataram que de 50% a 80% do N microbiano podem ser derivados de NH_3 ruminal, sendo apenas 20% oriundos de AAs pré-formados. A amônia liberada é utilizada como fonte para a síntese de proteína microbiana, mas uma porção que não é incorporada à proteína microbiana é absorvida pelo epitélio ruminal, podendo ser por difusão simples, na sua forma não protonada (NH_3), a pH acima de 6,0 ou na forma protonada (NH_4^+), em pH abaixo de 5,5, via canais de potássio, chegando ao fígado pela veia porta (REYNOLDS, 1995).

A amônia absorvida no rúmen, e que chega ao fígado pela veia porta, é convertida em ureia pela ureagênese hepática e pode ser reciclada para todo o trato digestivo (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). A amônia também pode ser assimilada para a síntese de glutamina a partir de glutamato, pela enzima glutamina sintetase, juntamente com gasto de ATP. Esse mecanismo é importante para bactérias, visto que glutamato é o composto central no metabolismo de N em bactérias. Outro possível destino da amônia é sua eliminação pelos rins e excreção via urina, como ureia (REYNOLDS, 1995).

A ureagênese inicia-se dentro da célula mitocondrial hepática, passando por duas reações. O dióxido de carbono condensa com a amônia, formando o carbamoil fosfato e, nesta reação, são gastos 2 moles de ATPs. Posteriormente, o carbamoil fosfato se liga à ornitina, originando a molécula de citrulina. A citrulina, juntamente com o aspartato e na presença de 1 mol de ATP, forma o arginosuccinato, o qual é quebrado e dá origem a duas moléculas, arginina e fumarato. Na presença de H₂O, a arginina forma ureia e ornitina, que retorna ao ciclo e o fumarato será utilizado no ciclo de Krebs. A utilização do fumarato gera 2 moles de ATPs, ou seja, o saldo para a conversão da amônia a ureia gera um déficit energético de 1 mol de ATP.

Em bovinos e ovinos, cerca de 33% do N-ureico hepático são eliminados pelos rins, enquanto cerca de 67% são reciclados para o trato digestivo pela ureagênese hepática (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). Dessa reciclagem, 40% são retornados ao ciclo de ureagênese, ou seja, reciclados novamente, 10% são excretados nas fezes e 50% são utilizados em processos anabólicos, principalmente na síntese de aminoácidos.

2.3.2 A reciclagem de N em vacas leiteiras

A reciclagem de N para o trato gastrointestinal pode contribuir de forma constante para o suprimento de N amoniacal para as bactérias do rúmen (REYNODS; KRISTENSEN, 2008). O fluxo de N oriundo da reciclagem pode aumentar de 50% a 60%, para o trato gastrointestinal, em vacas leiteiras e de 43% para 85%, em ovinos, sendo diretamente influenciado por quantidades de matéria orgânica digestível (MOD). O processo constante de reciclagem de N no metabolismo de ruminantes permite que concentrações de amônia ruminal não sejam limitantes para o crescimento bacteriano, e que um melhor sincronismo com outros nutrientes, como, por exemplo, fontes de carboidratos, possa ocorrer para a síntese de proteína microbiana (LAPIERRE; LOBLEY, 2001).

Em 315 mensurações obtidas em bovinos lactantes, observou-se aumento na absorção de amônia em resposta a aumento da ingestão de N (FIRKINS; REYNODS, 2005). Os fatores dietéticos, como a quantidade e o tipo de carboidratos, afetam a quantidade de amônia absorvida e a eficiência de utilização de N para a síntese de proteína microbiana, pois é sabido que a síntese de proteína microbiana é diretamente dependente de fonte de energia, principalmente carboidratos. Reynolds e Huntington (1988) infundiram amido direto no rúmen em novilhos de corte em crescimento, consumindo dietas com 11% de PB e observaram maior remoção da ureia reciclada para o trato digestivo e tendência de maior absorção de aminoácidos com a inclusão crescente de amido.

Reynolds e Kristensen (2008) relataram que a infusão de propionato no rúmen de novilhos de corte resultou em aumento na absorção de

aminoácidos pela veia porta, possivelmente pela maior produção de proteína microbiana no rúmen. Uma maior taxa de entrada de ureia oriunda da reciclagem para o rúmen, devido ao aumento de fonte de energia nele disponível, foi observado. Já em ovinos, a infusão abomasal de propionato aumentou o balanço de N, ou seja, menos N foi excretado via fezes e urina. O mecanismo para esta resposta não está claro, pois o propionato pode inibir a ureagênese hepática *in vitro* (RATTENBURY; JEACOCK; SHEPHERD, 1980), porém, alguns trabalhos mostram que *in vivo* isso não ocorre (KIM et al., 1999; REYNOLDS; KRISTENSEN, 2008).

Os mecanismos pelo qual a ureia é reciclada para o trato digestivo ainda não estão totalmente esclarecidos (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). No processo de reciclagem de N, o rúmen é o órgão mais ativo, em termos de taxa de entrada de N-ureico, e no qual a maioria da conversão de amônia em produtos microbianos irá ocorrer. A infusão abomasal e ruminal de propionato em ovinos aumentou a taxa de entrada de ureia para todo o trato digestivo e a conversão de proteína microbiana também foi aumentada (KIM et al., 1999).

Rémond et al. (1993) relataram a importância das ureases microbianas sobre a taxa de transferência de ureia para o rúmen e o positivo efeito da fermentação de carboidrato na atividade desta enzima microbiana. A inclusão de amido no rúmen proporcionou maior atividade das ureases microbianas presentes na parede ruminal. Essa importância foi relatada também por Huntington (1989), quando avaliou o efeito de carboidrato, do tipo e da quantidade de proteína na taxa de entrada de ureia em novilhos em crescimento. Dieta com 12% PB e alto amido

aumentou a quantidade de ureia transferida diretamente para o rúmen, quando comparada a uma dieta de alto concentrado com 17% PB e feno de alfafa.

Manipulações dietéticas, empregadas no intuito de explorar esse mecanismo de reciclagem, podem ser úteis, pois as recomendações que têm sido adotadas quanto à utilização de NNP pela indústria de alimentos para vacas leiteiras são expressos em limites máximos ao redor de 27% do N total da dieta, 3% do concentrado separado da forragem e 1% da MS em dieta total. No entanto, estas recomendações são para animais com produção de leite inferior a 20 kg. A necessidade de obter novas recomendações é pertinente, devido ao maior potencial produtivo de rebanhos modernos e à adoção de novas misturas dietéticas, como, por exemplo, dieta total, que permite um sincronismo maior entre carboidratos e proteína.

Além disso, o desenvolvimento de processos industriais, no intuito de reduzir a velocidade de degradação da ureia no rúmen (HARRISON; TRICARICO; DAWSON, 2006; TAYLOR et al., 2008) também comporta a ideia de reavaliação quanto ao uso de fontes de NNP na alimentação de vacas leiteiras. Isso porque, na maioria das vezes, quando ocorre substituição parcial de farelo de soja por fontes de NNP, o espaço criado na formulação é preenchido com fontes de carboidratos que podem contribuir para o aumento na síntese de proteína microbiana.

2.3.3 Concentrações de amônia para a maximização da síntese de proteína microbiana

O rúmen é um complexo ambiente habitado por diferentes espécies de bactérias, cada uma com sua particularidade, em termos de requerimentos de nutrientes e metabolismo (OWENS; BERGEN, 1983). As bactérias podem utilizar carboidratos (CHOs) e proteínas como fontes de energia. Apesar de CHOs serem a principal fonte de energia para as bactérias, eles também podem ser utilizados como esqueletos de carbono para síntese de proteína microbiana em combinação com a amônia, que é um intermediário neste processo de síntese. A síntese microbiana depende tanto da quantidade adequada quanto do tipo de fermentação dessas fontes de CHOs e de concentrações de amônia ideais para maximizar o crescimento microbiano (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

Outros relatos demonstram que fontes de CHOs prontamente fermentáveis, como amido, são mais efetivas do que a celulose, a sacarose e a pectina em promover crescimento microbiano (HALL; HEREJK, 2001; STERN; HOOVER, 1979).

Hall e Herejek (2001) demonstraram, *in vitro*, que a produção total de proteína microbiana foi maior na presença do amido do que a sacarose e a pectina. A sacarose e pectina produziram em torno de 12% a 14% a menos de proteína microbiana, comparados com a fonte de amido. Entretanto, nas primeiras 6 horas de incubação, a quantidade de produção de proteína microbiana foi maior para a pectina e a sacarose do que para o amido. A resposta para a maior produção de proteína microbiana com o amido está relacionada ao balanço de massas. A glicose do amido tem 180 g por mol e 6 carbonos disponíveis; já a pectina tem 203 g por mol de ácido galacturônico e 6,6 carbonos, porém, o grupo metil da pectina é quebrado e transformado em metanol. O número de carbonos disponíveis

para o processo anabólico de produtos é maior no amido que na pectina, ou seja, o número de carbonos por peso molecular é maior no amido.

No entanto, a relação ótima de CHOs, principalmente carboidratos não fibrosos (CNF) e N amoniacal, ainda não tem sido determinada. Além disso, a concentração de amônia no rúmen é dependente do catabolismo de proteínas, peptídeos, aminoácidos e NNP de origem alimentar ou endógena e também do anabolismo microbiano que sintetiza aminoácidos e proteína a partir da amônia. A concentração ótima de amônia no rúmen deve ser a menor quantidade necessária para não deprimir a síntese microbiana e a degradabilidade de carboidratos.

Na literatura, as concentrações ruminais de N amoniacal consideradas ideais para suportar a máxima síntese microbiana e a máxima taxa de fermentação ruminal variam entre 2 a 13 mg/dL e 3 a 25 mg/dL, respectivamente (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005; SATTER; SLYTER, 1974). Satter e Slyter (1974) relataram que, em concentrações ruminais de N amoniacal maiores que 2 a 5 mg/dL, não deve ocorrer ganho adicional na produção de proteína microbiana quanto à suplementação com NNP. Porém, de acordo com Soest (1994), o nível ótimo de concentração de amônia ruminal seria 10 mg/dL, com possibilidade de ganhos na síntese microbiana, quando adotadas maiores concentrações de amônia. Boucher et al. (2007) relataram que concentrações ruminais de amônia deveriam ficar entre 11 e 13 mg/dL, para a máxima síntese e eficiência microbiana, respectivamente.

Para alguns pesquisadores, é difícil estabelecer um número fixo de concentração de amônia ruminal para a maximização da síntese microbiana e de captação de amônia pelas bactérias ruminais. Estes

valores de concentração de amônia são dependentes de esqueletos de carbono disponíveis da fermentação de CHOs e do tipo de CHOs (SOEST, 1994). Odle e Schaefer (1987) observaram que a concentração de NH_3 requerida para a degradação da cevada foi maior, comparada com a do milho. Estudos *in vitro* (HENNING; STEYN; MEISSNER, 1991; STERN et al., 1978) e *in vivo* (CAMERON et al., 1991) demonstraram que o aumento da quantidade de CHOs altamente fermentáveis no rúmen diminuiu a concentração de N amoniacal, devido a uma maior absorção do N para crescimento bacteriano.

Entretanto, estes dados de concentrações ruminais de amônia são frequentemente discutidos, pois experimentos conduzidos em fermentadores contínuos, para avaliar esta concentração ótima, não permitem a reciclagem da amônia, a absorção dos ácidos graxos voláteis e a manutenção constante da fermentação pela infusão do tampão e da ureia, diferentemente das condições *in vivo*. Além disso, o total de proteína no efluente, mensurado pela técnica de precipitação proteica em ácido tungstênio, não permite a distinção entre proteína microbiana e proteína alimentar (BRODERICK et al., 2009).

2.3.4 Proteína degradável e carboidratos na síntese de microbiana

Encontrar diretrizes ou valores da concentração ideal de N e de CHOs, para atender às necessidades ruminais e maximizar a síntese de proteína microbiana, é bastante difícil, como mencionado anteriormente. Do ponto de vista prático, os modelos nutricionais estimam valores que são úteis e simples de serem utilizados, empregando-se os requerimentos

adequados de PDR e balanceamento de carboidratos. Hoover e Stern (1991) sugeriram que, em pH controlado, utilizando fermentadores contínuos, o máximo de crescimento microbiano é alcançado, em média, com a relação CNF:PDR de 2:1.

O NRC (1989) sugere um valor de 10,4% de PDR como a concentração mínima necessária para o crescimento microbiano em dietas para vacas de alta produção. Já Boucher et al. (2007) observaram que, para máxima resposta, o fluxo de proteína microbiana e a eficiência de síntese de proteína microbiana devem ser de 10,8% e 10,0% de PDR na MS, respectivamente.

Na versão mais recente do NRC (2001), o fluxo de proteína microbiana é predito a partir do consumo de MOD no trato digestivo total ou de nutrientes digestíveis totais (NDT). A produção de proteína microbiana (PPM) pode ser calculada a partir do consumo de NDT, em que o valor de PPM será igual a 130 g/kg de consumo de NDT. A partir disso, definimos que a exigência de PDR é dada pela fórmula $PDR = 1,18 \times PPM$, sendo 1,18 a relação entre PDR e N microbiano, assumindo zero de balanço ruminal de N. Por outro lado, quando o balanço ruminal de N é positivo, a PDR está em excesso ao N capturado pelos microorganismos. E diferentemente, em balanço negativo, ocorre ganho líquido de N via reciclagem de N dos tecidos para o rúmen. Assim, em balanço positivo, tem-se que PPM é igual a 0,130 vezes o teor de NDT e, em balanço negativo, PPM é igual a 0,85 vezes o consumo de PDR. O modelo assume uma eficiência de captura de PDR por microorganismos do rúmen como sendo de 85%.

Outro aspecto discutido é balancear dietas procurando proporcionar um sincronismo entre CHO e proteína, para maximizar a produção microbiana. O termo de sincronismo no rúmen refere-se à degradação simultânea de energia e N produzido por substrato requerido para o crescimento microbiano (REYNOLDS; KRISTENSEN, 2008). O efeito benéfico desta sincronização pode ser um possível caminho para melhorar a eficiência de utilização de N no rúmen. Acredita-se que o sincronismo entre diferentes fontes de CHO e concentrações de NH₃ seja o grande determinante da síntese de proteína microbiana.

Existe uma relação direta entre matéria orgânica digestível (MOD) no rúmen e o fluxo de N bacteriano ($r^2=0,59$). Modelos assumem que a síntese de proteína microbiana é, em média, de 20 g/100g de MOD. Entretanto, Cabrita et al. (2006) revisaram um grande número de trabalhos com vacas leiteiras e não observaram um efeito positivo de sincronismo entre fermentação de carboidrato e utilização de NH₃ para fornecimento de proteína microbiana disponível para esses animais. A extensa e contínua reciclagem de N para o rúmen e fornecimento de N amoniacal para as bactérias presentes no rúmen podem superar esse curto período de assincronismo (REYNOLDS; KRISTENSEN, 2008).

Além de suprimentos adequados de CHOs altamente fermentáveis no rúmen e N oriundo da PDR, outros fatores, nutricionais ou não, como pH e taxa de passagem, também desempenham um importante papel na síntese de proteína microbiana. A atividade proteolítica tem pH ótimo entre 5,5 a 7,0 (SOEST, 1994) e existe correlação positiva entre a taxa de passagem da digesta e a eficiência de crescimento microbiano (RUSSEL, 1992).

Saint-Pierre et al. (2001) fizeram uma meta-análise de 187 trabalhos *in vivo* e concluíram que a relação negativa entre pH e fluxo microbiano é consequência do aumento do fornecimento de CHOs altamente fermentáveis para atender às necessidades de vacas de alta produção. Alguns aspectos, como nível de ingestão, proporção de forragem na dieta e tamanho de partícula, podem provocar alterações na taxa de passagem ruminal, afetando a fermentação ruminal e o crescimento bacteriano.

A relação positiva entre a taxa de passagem e a eficiência de crescimento microbiano pode ser justificada pela diluição da manutenção, a redução da autólise de bactérias e a fagocitose por protozoários, além da redução por inibição por produtos e da densidade celular. Devido a essas várias respostas obtidas na maximização de proteína microbiana, um bom indicador pode ser a avaliação da eficiência na síntese de proteína microbiana (EPM) (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

Em uma revisão feita por Robinson (1996), a EPM (g de proteína microbiana/kg de ingestão de MS) diminuiu quando concentrações ruminais de N amoniacal foram de 11,0 mg/dL. Já Boucher et al. (2007) encontraram valores de queda na eficiência quando valores de N amoniacal atingiram 17,4 mg/dL.

Estudos em fermentadores contínuos indicaram aumento na síntese e na EPM, quando ocorreu aumento na taxa de passagem (SCHADT et al., 1999; SHRIVER et al., 1986). Meng et al. (1999) relataram que o aumento na taxa de passagem de 0,025 a 0,20%/h *in vitro* representou um acréscimo de 2,2 vezes na EPM, enquanto, no fluxo de proteína microbiana, o aumento foi de 1,5 vezes. Estes autores ainda relataram que a digestibilidade da matéria orgânica caiu de 62,5% para 44% com o

aumento da taxa de passagem. Na revisão feita por Bach, Calsamiglia e Stern (2005), foi constatado que altas taxas de passagem selecionam espécies de bactérias com maiores taxas de crescimento e maior proporção de bactérias na fase exponencial de crescimento. Além disso, alta taxa de passagem permitiu menor lise de bactérias e menor predação de bactérias por protozoários (FIRKINS; WEISS; PIWONKA, 1992). Entretanto, Bach, Calsamiglia e Stern (2005) sugeriram que, com o aumento da taxa de passagem ruminal, a degradação da MOD poderá diminuir e menos energia disponível para o crescimento microbiano poderá ocorrer. Em geral, o fluxo de N está negativamente correlacionado com o pH ruminal, mas não há relação entre pH ruminal e EPM.

Resultados encontrados em experimentos *in vivo*, muitas vezes, não se correlacionam aos valores *in vitro*. Este problema pode estar associado às mudanças na taxa de passagem *in vivo*, causando efeito nas outras variáveis e, assim, resultar em valores de EPM diferente daqueles encontrados em experimento *in vitro* (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

2.3.5 Eficiência na utilização de nitrogênio em vacas leiteiras

Apesar de respostas positivas em produção de leite serem relatadas quando dietas são fornecidas com altos teores de PB, em detrimento das de baixos teores, o custo econômico e o impacto ambiental devem ser levados em consideração. A determinação adequada dos requerimentos de proteína para vacas leiteiras é criticamente importante

para maximizar a produção de leite e minimizar a entrada de N em dietas para vacas leiteiras.

Ruminantes apresentam baixa eficiência na utilização de N. Cerca de 26% do N ingerido são secretados como N no leite (SANTOS et al., 2011) e perdas de N, na urina e nas fezes, superiores a 70% do ingerido, são comuns em vacas leiteiras (TAMMINGA, 1992). Este fato é preocupante quando são considerados os possíveis impactos negativos do N excretado no ambiente (ARRIAGA, 2009; SMITH; FROST, 2000).

Além da excreção de N no ambiente e do aumento no custo da alimentação, o excesso de PB nas dietas, normalmente, está ligado à baixa eficiência do uso de outros nutrientes e da própria eficiência da utilização de N. Para cada grama de N excretado, são gastos 13,3 kcal de energia digestível (ED) (BRODERICK, 2003). Para se ter uma ideia, para uma vaca consumindo 23 kg de MS diário, um excesso de 1% de PB na dieta total representa 230 g/dia de ingestão de proteína, sendo perdidos 27,8 MJ de ED para excreção de N, quantidade de energia necessária para a produção de 2 kg de leite.

Várias fazendas em torno do mundo trabalham com dietas nas quais a relação forragem e concentrado varia em torno de 65/35 a 30/70, com uma grande variedade de matérias-primas e eficiência alimentar variando de 1,5 a 1,8. Ao analisar a degradabilidade da PB de vários ingredientes utilizados para vacas leiteiras, uma meta-análise revelou valores médios de eficiência da utilização de N em torno de 22% e 24% (gramas de proteína do leite/gramas de proteína ingerida) (HUHTANEN; HRISTOV, 2009).

Em muitas dietas para vacas de alta produção, a relação entre PDR/PNDR fica em torno de 62/38%. A quantidade de proteína bruta para a produção de 1 kg de leite varia em torno de 108 a 125 g. A partir disso, nosso objetivo tem sido alcançar a eficiência de utilização de N em torno de 30% e uma excreção de proteína no leite em torno de 95 a 105 g de proteína.

Toda a cadeia láctea, bem como empresas de outros tipos de produção animal, tem sido identificadas como contribuidoras de poluição ambiental. Nos EUA e em grande parte da Europa há relatos de que as principais fontes de N excretado no ambiente são oriundas de fertilizantes e de esterco de vacas leiteiras (HOWARTH et al., 2002). O N excretado na urina representa mais do que a metade de todo o N excretado e é rapidamente convertido em amônia por ureases microbianas do meio (TAMMINGA, 1992). A amônia pode ser volatilizada para a atmosfera e, conseqüentemente, causar acidificação dos solos, poluição por nitratos em lençóis de água subterrânea e eutrofização dos rios, lagos e estuários (GALLOWAY, 2002).

O mecanismo da amônia é a simples conversão em nitrato (NO_3^- -N) que pode lixiviar para águas subterrâneas ou em superfícies por meio do fornecimento de adubos para plantas (TAMMINGA, 2002).

Há preocupação em relação ao teor de N no estrume e seus efeitos negativos sobre esses ambientes, à medida que sai das fazendas, principalmente em sistemas intensivos, nos quais o volume de estrume é significativamente expressivo. O método de redução do excesso de N produzido nas fazendas leiteiras é pela manipulação de dietas, de modo que a proteína nestas dietas seja utilizada de forma mais eficiente,

reduzindo, assim, a perda de N (SPEARS; KOHN; YOUNG, 2003). A eficiência deste método pode vir a beneficiar o produtor, do ponto de vista ambiental, mas também melhorar a economia de toda a cadeia, ajudando os produtos a entrarem nas novas normas ambientais.

2.3.6 Avaliação do nitrogênio ureico no leite como diagnóstico ao uso de proteína

Dietas para vacas leiteiras com excesso de proteína em relação aos requerimentos aumentam a emissão de N no ambiente, conforme já ressaltado anteriormente (TAMINGA, 1992). Consequentemente, existe uma necessidade urgente no diagnóstico da proteína dietética e na monitoração da proteína oferecida, no intuito de melhorar a eficiência da utilização do N e diminuir os danos ao meio ambiente.

O nitrogênio ureico no leite (NUL) tem sido frequentemente utilizado como ferramenta indicadora do aporte proteico da dieta, uma vez que conhecer valores do NUL pode ser uma diretriz para melhorar a eficiência da utilização do N, pois esta variável contabiliza todo o N presente no leite. Conhecer estes valores tem alta aplicabilidade, visto que, dificilmente, consegue mensurar o N nas fezes e na urina.

O nitrogênio ureico no sangue (NUP) é o produto final do metabolismo de N em ruminantes e altas concentrações também são indicativas de uma utilização ineficiente do N dietético. No sangue, o N ureico estabelece um equilíbrio rapidamente com outros fluidos corporais, incluindo o leite, e isso pode explicar a alta relação entre NUP e o NUL, pois estas duas variáveis estão fortemente associadas (BRODERICK; CLAYTON, 1997; SANTOS et al., 2011). No entanto, NUP dificilmente

consegue ser medido rotineiramente, devido a dificuldades de amostragem e ao elevado custo. Além disso, o leite é facilmente recolhido e pode ser determinado com precisão para o teste de ureia ou NUL, seja em métodos enzimáticos ou físicos.

O valor de NUL mensurado, seja no tanque ou em cada animal, pode ser utilizado como uma medida não invasiva para monitorar o nível de proteína dietética e da eficiência da utilização de N, mas também representa uma ferramenta prática e confiável para prever N urinário excretado (BRODERICK; CLAYTON, 1997). Uma redução de 4 mg/dL de NUL implica na redução de N excretado de 77,5 g por vaca/dia (NOUSIAINEN; SHINGFIEL; HUHTANEN, 2004).

Hojman et al. (2004) fizeram um levantamento em 42 rebanhos israelenses, no intuito de avaliarem relações entre NUL e variáveis nutricionais em vacas Holandesas sob sistema intensivo de produção. A média de NUL apresentada por vaca foi de 14,4 mg/dL, em rebanhos variando em torno de 6,9 e 21,5 mg/dL, com média de lactação de 10,412 kg, em 305 dias. Uma relação positiva foi encontrada entre NUL e produção de leite e porcentagem de gordura ($P < 0,01$). O pico máximo de produção de leite (34,5 kg/dia) foi alcançado no grupo de animais com NUL médio maior que 16,90 mg/dL. Entretanto, uma relação negativa foi encontrada para porcentagem de proteína e contagem de células somáticas.

Em um segundo levantamento, Hojman et al. (2004) associaram variáveis nutricionais adotadas nos rebanhos (EL₁, PB, PDR, PNDR, FDN, FDN e CNF) com concentrações de NUL. Um total de 90 dietas distintas foi utilizado na análise de regressão, representando os 42

rebanhos avaliados. A produção de leite média nesta análise foi de 35,0 kg/dia por vaca e o NUL médio foi de 15,1 mg/dL. Entre as 90 dietas relatadas, 71 utilizavam fontes de NNP (ureia ou sulfato de amônia). As fontes de NNP, embora incorporadas às dietas em baixas quantidades (0,5% a 1,4% na MS), foram associadas com altos níveis de NUL ($r^2=0,11$, $P<0,01$). Por outro lado, fontes alimentares, como aditivos alimentares, proteínas de origem animal, gordura, proteína de média degradabilidade ruminal e amido de alta degradabilidade ruminal, foram associadas com baixos níveis de NUL. Em relação às variáveis nutricionais, NUL foi positivamente associado igualmente com níveis de PB e PDR ($r^2=0,12$, $P<0,02$) e teores de FDN na dieta ($r^2=0,07$, $P<0,01$). Já as variáveis nutricionais que apresentaram relação negativa com NUL foram a relação CNF:PDR e CNF:PB ($r^2=0,16$ e $0,13$, respectivamente) e energia líquida EL_1 ($r^2=0,13$, $P<0,01$). Um dado interessante relatado neste experimento foi que PNDR não apresentou nenhuma relação com NUL.

Noisiainen et al. (2004), similarmente, avaliaram valores de NUL como diagnóstico de proteína dietética de vacas leiteiras, utilizando dados médios de 306 tratamentos de 50 trabalhos conduzidos na Finlândia. O teor de proteína médio das dietas foi de 16% na MS (variação de 11,1% a 24,9% na MS) e NUL médio de 13,3 mg/dL (variação de 5,8 a 27,0 mg/dL). As variáveis foram correlacionadas por meio de uma regressão, utilizando elementos fixos ou modelos mistos. A variável PB foi fortemente correlacionada com o NUL ($R^2=0,77$). Além disso, foi relatado que, mantendo-se a PB constante, aumento na quantidade de FND da dieta foi fortemente associado com acréscimo no NUL

(inclinação de 0,007 mg/dL por 1 g/kg de MS de FDN), enquanto acréscimo na quantidade de CNF foi relacionado com decréscimo no NUL (inclinação de -0,007 mg/dL por 1 g/kg de MS de CNF).

Estes autores ainda relataram que, quando o balanço de N foi zero, sem absorção líquida de amônia no rúmen, a estimativa de NUL ficaria em torno de 12 mg/dL. Analisando de forma diferente, a relação entre PB dietética e energia metabolizável (EM) da dieta foi correlacionada positivamente com valores de NUL ($R^2=0,94$), enquanto uma correlação negativa entre NUL e eficiência da utilização do N para a síntese de proteína no leite foi observada. Para ambos os modelos, fixos e mistos, testados, a concentração de PB dietética foi a variável mais correlacionada como preditor do NUL, similarmente com os achados de Broderick e Clark (1997). Porém, em outros trabalhos já foi relatado que a relação PB da dieta e EM é o fator mais importante na predição de NUL.

Como relatado nos trabalhos citados, a concentração de NUL é principalmente influenciada pela concentração de PB e PDR da dieta, porém, um aumento no excesso de PDR teve um efeito maior na concentração de NUL do que um aumento na PB dietética (NOUSIAINEN; SHINGFIEL; HUHTANEN, 2004). Kalscheur et al. (2006) avaliaram níveis crescentes de PDR aumentado por inclusão de ureia em dietas para vacas leiteiras. Os resultados mostraram que o NUL aumentou linearmente, de 9,5 para 16,4 mg/dL, quando PDR na dieta para vacas leiteiras passou de 6,8% a 11% na MS ($P<0,001$).

Analisando do ponto de vista prático, definimos que cada grama de N absorvido derivado de AAs foi menos participativo na concentração do

NUL, comparado com a absorção de amônia no rúmen, em dietas com altos teores de PB. A contribuição da PDR é, aproximadamente, 50% mais participativa que ingestão de PNDR (DE-PETERS; FERGUSON, 1992).

Além de avaliar o teor de PB na dieta, as mensurações de NUL também podem fornecer informações úteis sobre a utilização da PDR, visto que a correlação é alta e positiva ($R^2=0,78$) (BRODERICK; CLARK, 1997). Essa avaliação sugere que, para dietas à base de silagem de capim, um valor de NUL de 11,7 mg/dL é suficiente para atender as necessidades de N para as bactérias ruminais (NOUSIAINEN; SHINGFIEL; HUHTANEN, 2004). Além disso, se for considerada a reciclagem de N no rúmen, uma concentração mais baixa de PDR pode atender aos requerimentos de N para as bactérias ruminais, porém, a dificuldade de mensurar a contribuição desta reciclagem de N ainda não está clara (LAPIERRE; LOBLEY, 2001).

A relação quadrática entre NUL e produção de proteína no leite ($R^2=0,83$, $n=188$ trabalhos), apresentada por Nousiainen, Shingfiel e Huhtanen (2004), indica que os aumentos de rendimentos de proteína poderiam ser esperados em resposta à alta qualidade de suplementos proteicos, além das concentrações de NUL em torno de 11,7 mg/dL. Respostas de ganho em produção podem ser atingidas com valores acima de 16 mg/dL, mas esse efeito positivo ocorre à custa de uma redução na eficiência de utilização de N (HOJMAN et al., 2004).

A implicação é que o estabelecimento de valores recomendados para NUL é fortemente dependente de critérios que estão sendo considerados para a sua otimização, ou seja, recomendações para a

máxima produção de proteína no leite não coincidem, necessariamente, com valores considerados eficientes em relação às emissões ambientais de N e metabolismo reprodutivo de vacas de alta produção.

Balancear a formulação da dieta no intuito de não exceder o requerimento de PDR para otimizar crescimento bacteriano, reduzir a excreção de N e melhorar a eficiência da utilização de N em vacas leiteiras é um grande desafio que deve ser buscado por nutricionistas e produtores de leite (KALSCHEUR et al., 2006).

2.3.7 Mecanismo de depressão de consumo causado por fontes de NNP

Pesquisadores têm mostrado que dietas ou concentrados com alta inclusão de ureia podem reduzir o consumo de vacas leiteiras por induzir queda na palatabilidade (HUBER; COOK, 1972; KERTZ et al., 1982). Huber e Cook (1972) testaram palatilizantes, como melão de cana e polpa de beterraba, em concentrados contendo alta inclusão de ureia (3,5% de ureia na MN) e observaram um aumento no consumo de concentrado em 5,6 kg/dia em vacas de corte. Em outro experimento, estes autores testaram a administração de ureia em diferentes locais, para avaliar o consumo de concentrado. Os tratamentos foram: controle, ureia oral, ureia infundida no rúmen e ureia infundida no abomaso. O consumo de concentrado foi menor quando ureia foi administrada via oral, 10,6 kg/dia ($P < 0,05$), comparado com o observado em outros tratamentos que apresentaram consumo médio de 12,9 kg/dia. Esse achado reforça a ideia inicial de que alta inclusão de ureia em concentrados pode deprimir o consumo por baixa palatabilidade.

Entretanto, a redução de consumo por baixa palatabilidade da ureia pode não ser o mecanismo principal. Um possível mecanismo sistêmico responsável pela queda no consumo foi proposto por Wilson et al. (1975), que avaliaram o desempenho de vacas Holandesas em dietas com 1%, 1,65%, 2,3% e 3,0% de ureia na MN. O teor de ureia excedente a 1% foi infundido no rúmen três vezes ao dia, em solução aquosa 1:5. Os mesmos autores observaram correlação negativa e linear com o aumento do teor de ureia sobre o consumo de matéria seca. Os animais que receberam a dieta contendo 1% e 3,0% de ureia apresentaram consumo de matéria seca de 24,0 e 18,7 kg/dia, respectivamente. A adição de ureia em quantidade superior a 1% da dieta deprimiu o consumo, independente do método de fornecimento. Entretanto, a ureia infundida diretamente no rúmen deprimiu mais o consumo que a ingestão oral. Esses resultados observados sugerem que a infusão intrarruminal de ureia deprimiu mais o consumo quanto à incorporação da ureia diretamente à dieta, demonstrando que a palatabilidade não é o único mecanismo pelo qual a ureia pode induzir depressão no consumo. A possibilidade de ocorrência de um mecanismo sistêmico pode estar envolvida.

Santos et al. (2011) avaliaram o desempenho de 18 vacas Holandesas, em um quadrado latino 3x3, com períodos de 21 dias. Os tratamentos foram substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta ou ureia, ambos acrescidos de polpa cítrica e dieta controle. O teor de proteína bruta nas dietas foi de 15,5% na MS, sendo 1,5% oriundos de NNP. O uso de fontes de NNP reduziu o consumo diário de matéria seca em 0,8 kg ($P=0,04$), comparado com a dieta controle. Estes autores ainda observaram que a queda de consumo

induzida por NNP foi acompanhada por alteração no comportamento ingestivo. Nos animais que receberam ureia e ureia de liberação lenta foram observados maiores números de refeições matinais, comparados com o grupo controle ($P < 0,01$) e tendência de queda no tempo da primeira ingestão foi observado apenas no tratamento com ureia. A hipótese de redução de consumo por baixa palatabilidade da ureia também pode não ter sido o mecanismo prevalente neste estudo, já que o teor dietético das fontes de NNP foi baixo, além do fato de a ureia ter sido administrada em dieta completa.

O encapsulamento da fonte de ureia de liberação lenta seria outro fator desfavorável à argumentação de que fatores sensoriais estariam envolvidos quanto à resposta em consumo. Forero, Owens e Lusby (1980) utilizaram ureia de liberação lenta revestida por gordura em vacas de corte e observaram um aumento no consumo de concentrado de 200 g/dia, comparado com a ureia convencional. Estes autores concluíram que o fator sensorial negativo da ureia poderia ter sido perdido quando ureia foi revestida por gordura e isso ter proporcionado aumento no consumo.

Kertz et al. (1982), durante uma sequência de experimentos, testaram o efeito da ureia em concentrados fornecidos no momento da ordenha, tanto na forma de pellets de ureia quanto na forma farelada, sobre o consumo de vacas em lactação. Esses autores demonstraram que o odor e o sabor da ureia não são uma explicação depressora de consumo, pois, quando a escolha foi entre duas rações contendo ureia, as vacas preferiram os pellets de ureia, nas quais sabor e odor foram mais evidentes, isto em um primeiro instante. No entanto, estes animais na alimentação subsequente o consumo foi evitado. Estes autores concluíram

que a amônia liberada e rapidamente absorvida no rúmen em momentos de pH próximos a 6,0 poderia favorecer a absorção da amônia não ionizada pela parede ruminal e causar intoxicação subletal em bovinos. Neste caso, a capacidade de ureagênese hepática poderia ser excedida, induzindo acúmulo de amônia no plasma e afetando o sistema nervoso, principalmente o local controlador da saciedade e isso pode ter causado um *feedback* negativo estabelecido pelos animais, que poderiam identificar a ração contendo alta inclusão de ureia na próxima refeição (SYMONDS; MATHER; COLLIS, 1981).

Alguns mecanismos, além da baixa palatabilidade, também têm sido propostos para explicar o efeito depressor de NNP sobre o consumo. Segundo Visek (1968), a acidificação tóxica das células epiteliais pela rápida hidrólise da amônia pode reduzir o consumo de concentrados e diminuir a absorção de metabólitos intermediários. Uma explicação plausível seria uma possível danificação no tecido intestinal ou ruminal, ou uma desordem no metabolismo intermediário, em âmbito tecidual e alteração da motilidade ruminal (JUHÁSZ; SZEGEDEDI, 1983).

Recentemente, Allen, Bradford e Oba (2009), em uma revisão, relataram que a queda de consumo ocasionada por dietas contendo altos níveis de NNP pode ser explicada, indiretamente, pela Teoria da Oxidação Hepática (*Hepatic Oxidation Theory*, ou HOT). Esta teoria parte da premissa de que o metabolismo hepático está envolvido no controle da ingestão de alimentos.

Os produtos gerados pela oxidação de alguns substratos no metabolismo hepático podem afetar a ingestão de alimentos, alterando a refeição, tanto no tamanho como na frequência. Resultados de vários

trabalhos, principalmente com não ruminantes, comprovam que as refeições podem ser incentivadas por sinais realizados a partir do fígado para o cérebro através dos nervos vagos e que estes sinais são afetados pela oxidação de ácidos graxos voláteis (AGVs) e propionato (FORBES, 1992). A aplicação desta teoria para ruminantes apresenta alguns desafios, devido à particularidade da ocorrência de fermentação ruminal, ou seja, a interligação entre os ingredientes altera determinados produtos e, muitas vezes, o perfil das dietas de ruminantes difere das de não ruminantes pela presença de volumosos, subprodutos fibrosos e forragens. Porém, esta teoria tem mostrado ser o caminho para a explicação da queda de consumo em dietas com alta inclusão de NNP.

O propionato e os ácidos graxos não estereificados (NEFA) são considerados os substratos primários extensivamente utilizados pelo fígado de ruminantes (AIELLO; ARMENTANO, 1987), que causam hipofagia em ruminantes (ALLEN, 2000). Quando o fluxo de propionato para o fígado ultrapassa a capacidade de gliconeogênese, o propionato, possivelmente, será oxidado (BRADFORD; ALLEN, 2007b). O propionato pode ser oxidado no ciclo do ácido tricarbóxico (AIELLO; ARMENTANO, 1987) ou estimular a oxidação de acetil-CoA derivado de outros metabólitos (ALLEN, 2000). A oxidação do propionato durante a ingestão aumenta o *status* energético hepático, gerando saldo positivo de ATP que, por meio de reações múltiplas, desencadeia um sinal de saciedade que cessa a sensação de fome, ocasionando a interrupção na refeição (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009) (Figura 1).

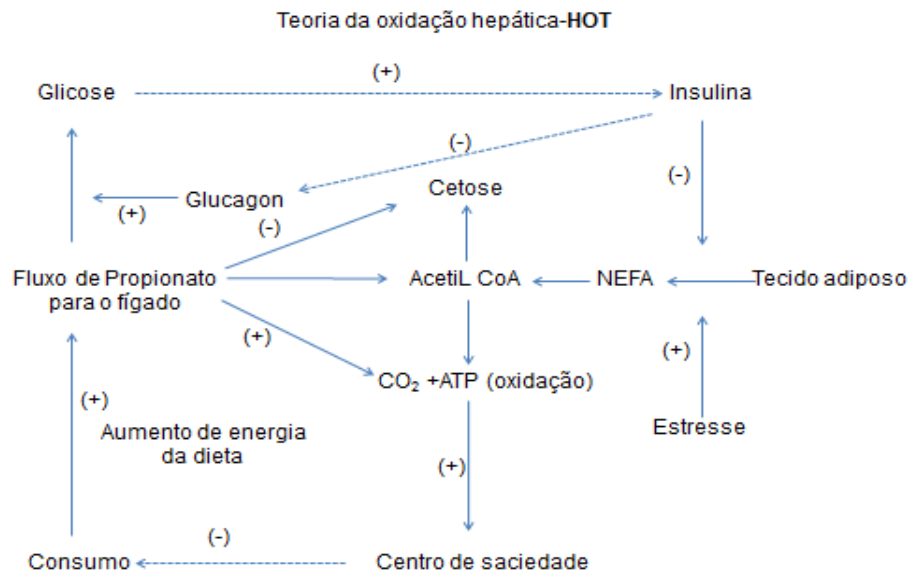


Figura 1. Regulação do consumo, segundo a Teoria da Oxidação Hepática. Fonte: adaptado de Allen et al. (2009).

Relatos na literatura não são claros sobre este mecanismo de oxidação do propionato, capaz de deprimir o consumo de matéria seca. Porém, em algumas pesquisas realizadas, principalmente, com animais não ruminantes, sugere-se que o *status* energético do animal seja transmitido do fígado ao sistema nervoso central através dos nervos vagos aferentes e eferentes (BERTHOUD, 2004). A explicação plausível para esse mecanismo sistêmico é que a oxidação hepática de substratos aumenta durante a ingestão. Essa maior oxidação aumenta o aporte energético aos hepatócitos, onde estes emitem sinais quando ocorre um saldo positivo de ATP, diminuindo a taxa de descarga dos nervos vagais aferentes, possivelmente pelo aumento na atividade da bomba de sódio e potássio e a hiperpolarização do potencial de membrana das células

nervosas. Essa menor taxa de descarga afeta o lócus do Sistema Nervoso Central, que controla o comportamento alimentar, causando saciedade e finalizando a refeição (ANIL; FORBES, 1988). A retomada do processo ocorre quando a oxidação hepática é diminuída, principalmente depois da ingestão, reduzindo, assim, a taxa de descarga dos nervos e causando fome no animal novamente (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009) (Figura 2)

Além de propionato e NEFA serem os principais substratos causadores de hipofagia em ruminantes, os aminoácidos (AAs) também são extensivamente metabolizados no fígado e, especialmente em dietas contendo altos teores de proteína, maior absorção de amônia parece causar um efeito indireto no catabolismo de AAs, podendo deprimir o consumo por esse mecanismo sistêmico, semelhante ao propionato (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009).

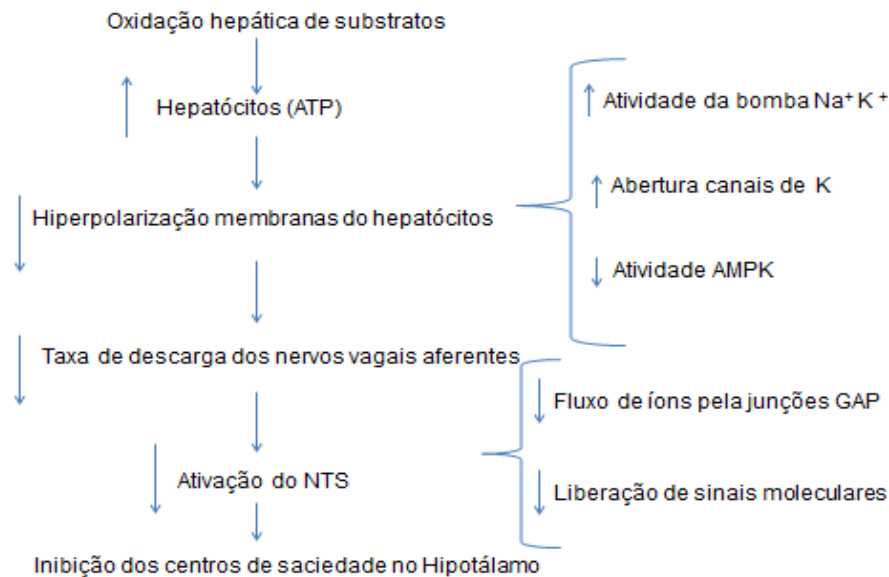


Figura 2: Mecanismo proposto para controle da ingestão pela oxidação hepática. NTS = núcleo do trato solitário. AMPK = proteína quinase ativada pela adenosina-5'-monofosfato. Fonte: adaptado de Allen et al. (2009).

O fornecimento de dietas ricas em PB, geralmente, resulta em maior absorção de AAs na veia porta de vacas em lactação (REYNOLDS et al., 1992). Embora a remoção hepática de AAs fosse proposta, pela primeira vez, como um regulador de anabolismo do tecido periférico, outras evidências sugerem que o catabolismo hepático de AAs pode responder às necessidades dos tecidos periféricos (RAGGIO et al., 2006; REYNOLDS et al., 1992). Até que ponto o catabolismo de AAs pelo fígado pode ser diminuído, ou quanto da extração de AAs é obrigatória para manter a síntese de proteína plasmática ou gliconeogênese, ainda não está claro.

Lobley et al. (1995) relataram que a infusão de cloreto de amônio (NH_4Cl) diretamente na veia mesentérica de ovelhas aumentou a oxidação de leucina por tecidos esplâncnicos. Este aumento da oxidação da leucina pode estar relacionado com o ciclo hepático da ureia, que pode ter estimulado indiretamente o metabolismo oxidativo no fígado a partir de carbonos oxidáveis oriundos do catabolismo de AAs, já que a desintoxicação de amônia através da síntese de ureia requer a remoção de N α -amino (PARKER et al., 1995; REYNOLDS et al., 1992), e o carbono oriundo do catabolismo de AAs torna-se disponível para metabolismo oxidativo no fígado, pois um dos carbonos na conversão da amônia a ureia vem do aspartato (OBA; ALLEN, 2003e). A síntese de ureia pode ter aumentado a produção de ATP no fígado pelo aumento na oxidação hepática de AAs, pois cada turno do ciclo do ácido tricarboxílico gera 12 mols de ATP, enquanto cada ciclo da ureia consome 3 mols de ATP.

Oba e Allen (2003a, 2003c, 2003d) iniciaram uma série de estudos para testar essa hipótese do efeito hipofágico causado pela amônia. Inicialmente, estes autores hipotetizavam a seguinte ideia: como são consumidos 3 mols de ATP para sintetizar ureia, espera-se que infusão de propionato de amônio possa aumentar o consumo de matéria seca, comparado com propionato de sódio ou potássio, pois a infusão de amônia deve ser sintetizada a ureia e o saldo negativo desse processo deveria ser recompensado pelo aumento da ingestão de matéria seca. Porém, neste estudo, numericamente, propionato de amônio deprimiu o consumo de matéria seca.

Mais tarde, Oba e Allen (2003b), na dificuldade de determinar se a queda de consumo de matéria seca foi causada pela infusão de propionato

ou acetato de amônia ou se o consumo foi aumentado pelos tratamentos com propionato de sódio ou potássio, foram utilizadas as mesmas vacas com similar protocolo de infusão, aumentando as taxas de infusão de propionato ou acetato de amônia e sódio. Estes autores demonstraram que a infusão intrarruminal do propionato de amônia equivalente a 0,875 kg de PB (16,7 mmol/min) diminuiu a ingestão e o número de refeições, sem afetar o tamanho da refeição, indicando que a amônia atrasa a sensação de fome. A infusão de propionato de amônio foi o mais depressor ($P < 0,04$), comparado com propionato de sódio e potássio: 11,0, 14,0 e 13,9, respectivamente. O consumo em 12 horas, no tratamento propionato e amônio, foi de 4,3 kg e, no tratamento propionato e sódio, foi de 12,1 kg. O consumo com acetato de amônio foi de 13,5 kg e, com acetato de sódio, foi 15,3 kg. O número de refeições em 12 horas, com infusão de propionato de amônio, foi menor, 3,9 para 7,2, comparativamente a propionato de sódio, e o tempo de alimentação também foi reduzido de 135 para 55 minutos. Estes autores ainda concluíram que a infusão de amônio não diminuiu o efeito hipofágico de propionato, mas resultou em maior efeito hipofágico, comparada com a infusão de sódio e potássio.

Os efeitos hipofágicos de compostos de amônio foram exacerbados quando infundidos com propionato comparado com acetato (OBA; ALLEN, 2003f). Amônia diminui a utilização do carbono oriundo do propionato para a gliconeogênese e aumenta a oxidação do propionato (OVERTON et al., 1999). Portanto, o metabolismo oxidativo no fígado pode ter sido aumentado para um maior grau, quando amônia foi infundida com propionato (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009). Alternativamente, propionato pode ter efeitos negativos sobre a síntese de

ureia no fígado (CHOUNG; CHAMBERLAIN, 1995), permitindo a captura temporária de excesso de N amoniacal como glutamina em hepatócitos perivenoso e na geração de amônia a partir de glutamina em hepatócitos periportais ao longo do tempo após as refeições. Essa extensa síntese de ureia e oxidação de carbono a partir do catabolismo de Aas, durante um período longo de tempo, pode explicar a falta da ocorrência de fome causada pela amônia (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009).

Estes dados evidenciam que a amônia pode diminuir o consumo de matéria seca por aumento líquido de ATP produzido no fígado, pela maior síntese de ureia e oxidação hepática. Embora várias explicações sejam possíveis, também a hipofagia causada por propionato e amônia é consistente com a Teoria da Oxidação Hepática, como uma explicação plausível sobre a depressão de consumo em vacas sendo suplementadas com dietas ricas em NNP.

2.3.8 Balanceamento por proteína degradável no rúmen e respostas ao uso de ureia

Apesar de o nível de PDR ser um valor simples e prático de ser adotado, resultados de desempenho em vacas leiteiras quanto à suplementação com diferentes níveis de PDR têm mostrado respostas variadas. O comitê de pesquisadores do *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (NRC, 2001) fez uma regressão para avaliar a resposta desses animais quanto a PDR na MS, selecionando 38 estudos com 206 tratamentos variando no teor de PDR. Com base nesta regressão, a máxima produção de leite (33,2 kg/dia) e a produção de proteína no leite ocorreram quando PDR foi de 12,2% na MS, admitindo consumo de

matéria seca (CMS) no valor de 20,6 kg/dia e 6,2% de PNDR. O aumento na produção de leite com aumentos na PDR pode ser explicado pelo aumento do consumo de MS. O aumento de 2 unidades percentuais de PDR resultou em ingestão de MS em torno de 1,1 kg/dia (assumindo 72% de NDT) e um aumento de produção de 2 kg/dia é esperado, visto que aumentar a PDR pode resultar em aumento de CMS.

Reynal e Broderick (2005) avaliaram concentrações crescentes de PDR (7,7%, 9,2%, 10,2% e 12,6% da MS) em dietas para vacas leiteiras. O aumento da PDR foi proporcionado pelo aumento da inclusão de ureia (0%, 0,17%, 0,33% e 0,5% na MS). O consumo de MS foi numericamente menor ($P=0,17$) e a produção de leite corrigida para gordura também tendeu a uma queda com o aumento da inclusão de ureia. Os animais que receberam a dieta com inclusão de ureia 0,5% da MS alcançaram produção de leite de 38,4 kg/dia; já na dieta controle, essa produção foi de 39,4 kg/dia. Entretanto, estes autores observaram um aumento linear no fluxo de proteína microbiana com o aumento das concentrações de PDR na dieta. A maior concentração de PDR resultou em maior concentração de N amoniacal no rúmen (12,3 mg/dL).

Santos et al. (1998) relataram o desempenho de vacas leiteiras em 23 trabalhos estudados, quando farelo de soja e outros concentrados proteicos foram substituídos por ureia (0,4% a 1,8% na MS). O consumo de MS não foi afetado com a suplementação de ureia em 17 trabalhos avaliados, porém, diminuiu em 5 e aumentou em 2 dos 23 trabalhos avaliados. Entretanto, destes 23 trabalhos, apenas em 3 foi observada queda na produção de leite com o aumento da inclusão de ureia. Além disso, para a produção de leite corrigida para gordura, dos 20 trabalhos

que não foram relatados queda na produção de leite, em apenas 6 foi observada queda na produção. A média de produção de leite ao utilizar ureia como suplementação foi de 32,7 kg/dia e, na dieta controle, a média de produção foi de 33,3 kg/dia. A menor produção de leite observada foi com a adição de ureia de 1,8% na MS. Quanto aos teores de proteína no leite, dos 23 trabalhos avaliados, em 17 trabalhos o teor de proteína não foi afetado e em 5 foi observado um aumento com a adição de ureia. Apenas em um trabalho foi observada queda no teor de proteína no leite.

Boucher et al. (2007) avaliaram a crescente inclusão de ureia (0%, 0,3%, 0,6% e 0,9% na MS) em dietas à base de silagem de milho. A produção de leite, a eficiência alimentar, o teor de gordura e a produção de gordura e de proteína no leite não foram afetados pela suplementação de ureia. A produção de leite foi de 33,9; 30,7; 34,6 e 33,0 kg/dia, para a crescente inclusão de ureia. Entretanto, o teor de proteína no leite diminuiu linearmente e o NUL aumentou linearmente com a inclusão de ureia, apesar de as dietas com teor máximo de ureia apresentarem 41,6% de CNF altamente fermentável. Alguns trabalhos mostram que a inclusão de 1 a 2% de ureia na MS têm sido utilizados em dietas com altos teores de grãos, sem efeitos adversos de toxicidade (POOS; BULL; HEMKEN, 1979).

É provável que o modelo do NRC (2001) superestime a necessidade de PDR para vacas leiteiras, devido aos imprecisos valores de PDR dos alimentos e pelo fato de a reciclagem de N para o rúmen não ser considerada (REYNAL et al., 2007). Agle et al. (2010) concluíram que uma redução na PB dietética reduzindo PDR não deveria afetar a produção de leite, se o requerimento de PM fosse alcançado. Alguns

estudos demonstraram que as concentrações de PDR entre 12% e 10,7% na MS são suficientes para suprir os requerimentos das bactérias ruminais.

2.4 Ureia de liberação lenta no rúmen para vacas leiteiras

O desenvolvimento de produtos que promovam a liberação de amônia lentamente no rúmen, sem limitar a extensão da degradação da ureia, tem sido um desafio para a indústria de nutrição animal. Numerosas tentativas têm sido feitas para controlar a liberação de ureia no rúmen, como, por exemplo, revestimentos à base de óleo (GARRETT et al., 2005; OWENS et al., 1980), amireia (BARTLEY; DEYOE, 1975), ureia tratada com formaldeído (PROKOP; KLOPFENSTEIN, 1977), ureia líquida e cloreto de Ca^+ (CASS; RICHARDSON, 1994) ou polímeros inertes (GALO et al., 2003; HARRISON; TRICARICO; DAWSON, 2006).

A Alltech (Alltech, Inc., Nicholasville, KY), em 2005, lançou comercialmente o Optigen[®]1200, uma ureia de liberação lenta revestida por polímero inerte. Neste produto, a liberação da ureia solúvel em água ocorre pela presença de pequenos poros biodegradáveis na cápsula de polímero inerte que reveste a ureia, formando uma barreira física e diminuindo a velocidade de degradação (SICILIANO JONES; DOWNER, 2005).

Taylor-Edwards et al. (2009) verificaram que ureia de liberação lenta diminuiu a concentração ruminal de amônia em novilhos de corte, comparados com os do grupo controle, quando receberam dietas contendo

85% de silagem de milho. A concentração de amônia no rúmen nos animais tratados com ureia de liberação lenta em relação aos tratados com ureia convencional foi de 8,9 vs. 14,1 mM ($P=0,02$), respectivamente. Entretanto, concentrações ruminais de AGVs não foram afetadas pelo tratamento ($P > 0,20$).

Siciliano-Jones e Downer (2005), com o objetivo de encontrar um limite de segurança da utilização do Optigen[®]1200, estabeleceram a recomendação máxima de consumo diário de Optigen[®]1200 de 360 g/animal/dia. Neste estudo, o máximo consumo foi de 788 g/dia, associado a uma queda de 25% no consumo de matéria seca. Similarmente ao encontrado por Owens (1980), quando utilizaram ureia de liberação lenta revestida à base de óleo em bovinos de corte, sinais clínicos de intoxicação por amônia, como tetania, salivação excessiva, timpanismo, anorexia ou letargia não foram observados quando ureia de liberação lenta foi substituída por ureia comum até 2% da MS.

Segundo Akay et al. (2004), a degradabilidade ruminal *in situ* do N da ureia de liberação lenta (Optigen[®]1200) foi similar à do N no farelo de soja. Estes autores relataram que, nas três primeiras horas, a taxa de degradação do Optigen[®]1200 foi maior que a do N do farelo de soja. Porém, entre 16 e 30 horas, a taxa de desaparecimento foi menor e constante. Em outro experimento utilizando fermentadores contínuos, estes autores relataram que essa liberação lenta de nitrogênio, que pode chegar de 24 a 36 horas após ingestão, proporciona um efeito benéfico no sincronismo com a liberação de energia da dieta. Neste estudo, substituição de ureia por ureia de liberação lenta permitiu um aumento de 6% na síntese de proteína microbiana e a utilização mais eficiente de

nutrientes, avaliada pelo aumento da digestibilidade do FDA, FDN e matéria orgânica, em 16,8%, 6,8% e 8,0%, respectivamente.

Akay et al. (2004) avaliaram dados de desempenho de vacas Holandesas em dois experimentos utilizando ureia de liberação lenta (Optigen[®]1200) em rebanhos comerciais. No primeiro experimento, 120 vacas receberam Optigen[®]1200 mais milho moído, substituindo parcialmente o farelo de soja ou a ureia da dieta, por 40 dias. Os animais tratados com Optigen[®]1200 tiveram um aumento na produção de leite de 37,9 para 41,6 kg/dia. No segundo experimento, 240 vacas foram avaliadas por 30 dias. A estratégia foi a substituição parcial de farelo de soja por Optigen[®]1200 mais milho moído ou silagem de milho. Nesse estudo, foi observada uma redução de 0,89 kg no consumo de MS, sem afetar a produção de leite (média 40,2 kg/dia, $P=0,48$), proporcionando um aumento na eficiência alimentar de 4,2% na dieta com o Optigen[®]1200.

Entretanto, Galo et al. (2003) não observaram diferença quanto ao consumo de MS, à produção de leite, aos compostos do leite e à excreção de derivados de purina na urina, quando avaliaram a substituição de ureia e fontes de proteína vegetal por ureia de liberação lenta (0,77% da MS) em duas dietas isoproteicas com teores de 16% e 18% de PB. A produção de leite foi numericamente maior no tratamento contendo ureia comum e dieta com 18% de PB (35,6 kg/dia); já no tratamento contendo 18% de PB com ureia de liberação lenta, a produção de leite foi de 34,8 kg/dia e, na dieta contendo 16% de PB com ureia de liberação lenta, foi de 33,8 kg/dia.

Valinote et al. (2005) avaliaram a utilização de Optigen®1200 em dietas à base de cana-de-açúcar em búfalos. Não foi observada alteração na digestibilidade da MS, MO, PB, FDN e FDA das dietas suplementadas com Optigen®1200, comparadas com as dietas contendo ureia convencional ($P>0,40$). O valor observado para a digestibilidade da MS e a concentração de amônia no rúmen para a ureia, comparado com o Optigen®1200, foi de 69,6% vs 68,9% da MS e 12,6 vs 10,0 mg/dL, respectivamente.

A partir do Optigen®1200, foi desenvolvido o Optigen®II, um produto contendo ureia de liberação lenta, encapsulada fisicamente por ceras vegetais. Harrison, Tricarico e Dawson (2006) avaliaram o efeito deste produto em fermentadores contínuos, variando a inclusão de Optigen®II de 0,20% a 1,25% na MS. Neste experimento, houve um aumento na produção de proteína microbiana, tanto no fluxo de bactérias microbiano (g/dia) como na eficiência (g de bactérias/kg de MS), quando o Optigen®II substituiu completamente a ureia em dietas contendo 18% de PB na MS e forragem em torno de 50%. O aumento na produção de proteína microbiana (Pmic) nas dietas tratadas com Optigen®II, comparado com as dietas tratadas com ureia de liberação lenta em fermentadores contínuos, também foi relatado por Chalupa et al. (2007) e Tikofsky e Harrison (2007).

Harrison, Meyer e Dawson (2008b) avaliaram o uso de nitrogênio de liberação lenta (Optigen®II) em dietas de diferentes níveis de FDN em fermentadores contínuos. Os fermentadores foram alimentados com dietas contendo duas fontes de NNP (ureia a 58% e Optigen®II a 0,66% na MS) e três níveis de FDN (baixo=36,5%; médio=43,8%; alto=51,1% na MS).

Foram utilizados 12 fermentadores contínuos em um fatorial 3x2, com 6 tratamentos e 2 ensaios experimentais. As dietas foram formuladas para obter 16% de PB e 75% de forragem na MS, sendo os teores de FDN aumentados por mudanças nas proporções de silagem de milho, feno e palha. Nas dietas de baixo e alto teor de FDN houve menor produção de proteína microbiana quando se substituiu Optigen®II por ureia. Entretanto, nas dietas de médio teor de FDN, foi relatado um aumento de 9,7% na produção de proteína microbiana, quando ureia foi substituída por Optigen®II.

Stewart et al. (2008) avaliaram dois experimentos para comparar o balanço de N e a degradação *in situ* da MS, FDN e N de dietas isoproteicas com 16,7% de PB contendo 150 g/dia de Optigen®II substituindo parcialmente farelo de soja. No primeiro experimento, utilizaram 6 vacas Holandesas em delineamento reversão simples, com 14 dias de adaptação e 7 dias de resposta. O total de N excretado nas fezes, na urina e no leite não diferiu entre as dietas ($P>0,49$; média de 483 g/dia), quando houve substituição parcial de Optigen®II por farelo de soja, promovendo um balanço de N similar ($P>0,91$; 36g/dia). No segundo experimento, duas vacas canuladas ruminalmente, em delineamento similar ao primeiro, foram utilizadas para comparar a degradabilidade *in situ* das dietas. As características de degradabilidade da MS, FDN e N foram avaliadas utilizando-se 8 tempos de incubação (0, 2, 4, 6, 8, 16, 24 e 48 horas). Estes autores demonstraram que a degradabilidade da MS da fração A (33,0%), fração B (52,5%) e desaparecimento da taxa de B (8,0%/h) para MS foi similar entre Optigen®II e farelo de soja ($P>0,21$). Além disso, relataram que as

frações A, B e C do N foram similares ($P > 0,33$) entre as dietas Optigen®II e farelo de soja (valores médios de 28,3%, 61,3% e 9,3%/h, respectivamente). No entanto, a fração degradável total da MS (A+B; $P < 0,06$) tendeu a ser maior na dieta tratada com Optigen®II, comparada com a da dieta com farelo de soja (86,55% vs 83,3% da MS). Já a digestibilidade da FDN tendeu a ser maior na dieta com Optigen®II até 24 horas de incubação (48,7% vs 39,9%; $P < 0,14$), mas similar entre 24 e 48 horas (média de 61,1%, $P > 0,24$).

Santos et al. (2011) substituíram, parcialmente, farelo de soja por fontes de NNP mais polpa cítrica. Similarmente ao observado por Stewart et al. (2008), o balanço de N não respondeu aos tratamentos, ou seja, a substituição de proteína de farelo de soja por NNP não resultou em aumento na perda de nitrogênio urinário e fecal, sendo, portanto, similares ambientalmente. Garcia-Gonzales et al. (2007) relataram menor concentração de amônia no plasma quando novilhos em crescimento foram alimentados com Optigen®II, comparada à da ureia desprotegida utilizada na dieta controle. A taxa de desaparecimento de nitrogênio *in situ* do Optigen®II foi de 0,237%/h.

Sinclair et al. (2008) avaliaram o desempenho de 42 vacas Holandesas suplementadas com ureia de liberação lenta (Optigen®II) ou ureia substituindo parcialmente farelo de soja. Os animais receberam a mesma dieta basal, mas com a substituição de 1,1 kg de farelo de soja/vaca/dia por 100 g de ureia e 110 g de Optigen®II. A ingestão de MS e a produção de leite não foram afetadas pela inclusão de fontes de NNP (valores médios de 22,5 e 33,9 kg/dia, respectivamente). Entretanto, os animais tratados com Optigen®II relataram maior ($P < 0,01$) eficiência na

utilização do N (kg de N no leite/kg de N ingerido) e eficiência alimentar (kg leite corrigido para gordura/kg de ingestão de MS). Estes autores avaliaram parâmetros sanguíneos e não observaram diferenças nos níveis de N-ureico no plasma entre os tratamentos.

Harrison, Meyer e Dawson (2008a) avaliaram o efeito de três diferentes fontes de N (proteína vegetal, ureia convencional e ureia de liberação lenta (Optigen®II)) e 4 níveis de PDR (2,1; 2,3; 2,5 e 2,7g/d) utilizando fermentadores contínuos. A PDR foi aumentada por N de proteína vegetal, ureia ou Optigen®II. A fonte de N afetou a fermentação e o fracionamento de N, porém, não houve efeito na digestão e na produção de N de origem bacteriana. Para a digestibilidade da MS, PB, produção de proteína microbiana e eficiência (g de N bacteriano/kg de MS), foi observado um aumento linear com maior nível de PDR ($P<0,001$), sendo numericamente maior para Optigen®II e proteína vegetal. Segundo estes autores, os microrganismos ruminais podem responder a diferentes níveis de PDR, dependendo da fonte de N.

Em outro estudo, Harrison, Meyer e Dawson (2008c) avaliaram o efeito de inclusão de Optigen®II substituindo parcialmente farelo de soja em dietas isoproteicas com 18% PB, aumentando a PDR (62,5% a 65%) ou o teor de forragem (50% a 53%) em fermentadores contínuos. Esse estudo não foi observado efeito negativo sobre o nível de forragem em dietas com o uso de Optigen®II. O aumento de PDR obtido com a utilização de Optigen®II não surtiu efeito sobre a fermentação e a digestão da MS. Os autores concluíram que essa estratégia de formulações com aumento no teor de forragem, em dietas tratadas com Optigen®II, parece não ter um impacto negativo no desempenho ruminal.

Santos et al. (2011) avaliaram a substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta (Optigen[®]II) mais polpa cítrica. As dietas continham 16,4% PB, sendo 1,54% de Optigen[®]II, e teor de silagem de 41,9% na MS. A inclusão de Optigen[®]II reduziu o consumo diário de MS de 23,2 para 22,4 kg ($P=0,04$), sem afetar a produção de leite (31,5 kg, $P=0,98$). Uma melhor eficiência alimentar foi observada no tratamento Optigen[®]II, comparado à dieta controle ($P<0,09$). Entretanto, o NUL foi maior (15,5 vs 15,4 mg/dL) nos tratamentos com Optigen[®]II. Vargas e Ishler (2008) também relataram resultados similares de eficiência alimentar, quando substituíram 0,9 kg de farelo de soja tratado com calor e 0,5 kg de farelo de canola por 112 g de Optigen[®]II.

Souza et al. (2010) avaliaram a substituição parcial de nitrogênio oriundo do farelo de soja por uma mesma quantidade de N oriundo de Optigen[®]II mais casca de soja, em vacas de alta produção, por 60 dias experimentais. As dietas eram à base de silagem de milho, com 18,35% de PB e inclusão de Optigen[®]II 0,4% da MS. Não houve diferença significativa nas produções diárias de leite, média de 37,7 kg/dia e componentes do leite. Os percentuais de gordura e sólidos totais foram reduzidos nas vacas tratadas com Optigen[®]II ($P<0,05$), no entanto, não afetaram a produção de gordura e de sólidos totais. Os valores de NUL também não foram afetados com a suplementação de Optigen[®]II (média de 11,9 mg/dL).

Abreu (2010) avaliou níveis de inclusão de Optigen[®]II em dois experimentos, utilizando vacas mestiças. No primeiro experimento, oito vacas mestiças, distribuídas em dois quadrados latinos 4x4, com quatro períodos de quatorze dias cada, quatro níveis foram avaliados (40, 80, 160

e 320 g/animal/dia), em dietas à base de cana-de-açúcar. Não houve efeito dos níveis de ureia ($P>0,05$) sobre CMS e FDN. A produção de leite aumentou ($P<0,05$) em 0,396 kg, para cada 100 g de Optigen[®]II (média de 11,1 kg/dia), sem nenhum efeito dos níveis sobre compostos do leite. No segundo experimento, utilizaram 21 vacas mestiças distribuídas em três quadrados latinos incompletos com três períodos de 21 dias cada. Três concentrados, com níveis de 2%, 4% e 6% da MS de Optigen[®]II, foram testados em substituição ao farelo de soja, além do tratamento controle, com apenas farelo de soja em pastos de capim-elefante. Não foi observado efeito ($P>0,05$) de fonte de PB, fonte de NNP, nível de NNP e interação entre NNP e nível de NNP sobre produção de leite (10,0 kg/dia) e compostos.

Highstreet, Robinson e Robison (2010) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras em rebanho comercial, quando ureia de liberação lenta foi substituída por ureia em dietas de alta proteína solúvel. Quatro currais foram utilizados, dois com animais no início de lactação e dois com animais no meio de lactação. A ingestão de MS, a produção de leite e os compostos urinários não diferiram entre os tratamentos, para ambos os grupos de animais. Os animais no início de lactação suplementada com ureia de liberação lenta aumentaram a gordura do leite em 0,068 kg/dia ($P=0,01$), a proteína no leite em 0,041 kg/dia ($P=0,01$) e a energia secretada no leite em 4,2 MJ/dia ($P=0,01$). Entretanto, não houve influência na composição do leite para os animais no meio da lactação.

Inostroza et al. (2010) avaliaram a substituição parcial de farelo de soja por Optigen[®]II, em dezesseis rebanhos comerciais, na região do estado de Wisconsin, EUA. Os rebanhos continham, em média, 148

animais, variando entre 58 a 550 vacas. A inclusão foi de 114 g/vaca de Optigen®II, acrescidos de silagem de milho em substituição a uma quantidade equivalente de PB, oriundo de farelo de soja, para fornecer dietas isoproteicas. O teor de forragem nas dietas foi de $56\pm 3\%$ e o de silagem de milho no controle e no Optigen®II, de 23,1% e 24,2%, respectivamente. O teor de proteína na dieta foi de 17,1% da MS. Os dezesseis rebanhos foram aleatoriamente alocados para cada tratamento, durante dois períodos de 30 dias, em delineamento de reversão simples. Um rebanho foi utilizado como unidade experimental, contendo também efeitos fixos de período, sequência e tratamento. Houve um aumento na produção diária de leite, de 35,4 para 35,9 kg ($P<0,01$) e do conteúdo de NUL, de 12,4 para 13,2 mg dl⁻¹, para o tratamento com Optigen®II ($P<0,01$). Neste estudo, produção de gordura, proteína do leite e porcentagem de proteína no leite não foram afetados pelo tratamento ($P>0,10$). Entretanto, uma tendência foi observada na porcentagem de gordura ($P=0,07$), similar ao observado por Varga e Ishler (2008), quando utilizaram 112 g de Optigen®II na dieta com 53% de forragem. O preenchimento com silagem de milho ou milho moído no espaço criado quando se efetua a substituição parcial de Optigen®II pode ter melhorado a fermentação ruminal do carboidrato e a disponibilidade de energia, contribuindo para a resposta em maior produção de leite.

Juntamente com o estudo realizado por Inostroza et al. (2010), foi feito um levantamento econômico nas fazendas para avaliar uma simulação econômica com a inclusão de 114 g/vaca de Optigen® II, cotado a US\$1,63/kg. O custo alimentar só foi reduzido quando a estratégia utilizada foi silagem de milho acrescida à dieta. Essa simulação

levou em conta a resposta em produção de leite observada de 0,5 kg/dia, para os animais tratados, e os preços do farelo de soja e do leite foram considerados em situações de altos preços.

2.5 Proteína e reprodução

As estratégias para atender às necessidades nutricionais de proteína para vacas leiteiras de alta produção têm gerado bastante discussão sobre os efeitos negativos na reprodução. As dietas ricas em proteína bruta (17% a 19%) são, geralmente, utilizadas no início da lactação, tanto para estimular como para manter uma elevada produção de leite.

Ainda que altos níveis proteicos nas dietas estimulem a produção de leite, alto nível de proteína na dieta tem sido associado, muitas vezes, com diminuição do desempenho reprodutivo (BUTLER, 1998; BUTLER et al., 2004; WESTWOOD; LEAN; KELLAWAY, 1998). É preciso considerar as frações de proteína da dieta, como proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR), fornecidas em proporções adequadas e em relação às necessidades de vacas leiteiras, em vez de utilizar apenas a porcentagem de PB, como mencionado nos capítulos anteriores.

Outro fator importante, e que está relacionado com o aporte proteico no início da lactação, é o balanço energético negativo (BEN), o qual aumenta a probabilidade de efeitos adversos em vacas pós-parto, principalmente na retomada da atade ovariana. Altos níveis de proteína da dieta durante o início da lactação podem aumentar o BEM e o gasto de energia necessário para a excreção metabólica do excesso de PB na dieta

no início da lactação o acentuaria. Por consequência, uma progressão ordenada de eventos e processos inter-relacionados, que ocorrem dentro do trato reprodutivo, como desenvolvimento folicular resultando em ovulação, fertilização do ovócito, transporte e desenvolvimento do embrião, reconhecimento materno e implantação do embrião, poderia ser afetada negativamente. Assim, hipoteticamente, amônia, ureia ou outro produto tóxico do metabolismo da proteína poderiam interferir em um ou mais destes passos, comprometendo a eficiência reprodutiva (BUTLER, 1998; BUTLER et al., 2004).

Ainda que a produção de amônia e ureia possa ser minimizada balanceando PDR e PNDR, o consumo elevado para manter a produção de leite e a variação na produção de proteína microbiana no rúmen torna difícil a previsão exata da disponibilidade de aminoácidos específicos. Como consequência, as vacas de maior produção consomem mais proteína do que necessitam e as concentrações sanguíneas de ureia são aumentadas (SANTOS et al., 1998).

A ureia que circula na corrente sanguínea é medida como nitrogênio ureico no plasma (NUP). Em geral, o NUP alcança um pico de 4 a 6 horas após as refeições, por causa do catabolismo de PDR, enquanto o metabolismo de PNDR contribui para o NUP de forma contínua, durante todo o dia. As flutuações no NUP durante o dia são usualmente menores (2 a 3 mg/100dL) em vacas alimentadas com dieta total do que em vacas alimentadas com concentrados e forragem separados (BUTLER, 1998). Com base na literatura, concentrações acima de 20 mg/dL no sangue têm sido associadas a alterações no pH uterino, produção de prostaglandina e menores concentrações de progesterona por queda na ligação de LH com

receptores do ovário. Além disso, uma possível queda no sistema imune pode afetar todo o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, reduzindo a fertilidade de vacas leiteiras (BUTLER, 1998; BUTLER et al., 2004).

Entretanto, a praticidade de mensuração do NUP em fazendas comerciais, muitas vezes, é inviável e demorada. O fato de a ureia ser uma molécula pequena e altamente solúvel em água, fluindo facilmente do sangue para o leite dentro da glândula mamária, permite a avaliação por meio do NUL. Então, o NUL proporciona um meio rápido, não invasivo e menos caro de se avaliar o NUP e de monitorar o metabolismo da proteína como um todo, nas vacas em lactação, visto que a correlação entre estes dois é positiva e alta (SANTOS et al., 2011).

As medidas de NUP ou NUL têm fornecido um índice útil para o estudo da associação entre o metabolismo da proteína da dieta e a eficiência reprodutiva. Em muitos estudos, os aumentos nas concentrações de NUP ou NUL foram correlacionados com menor fertilidade em vacas leiteiras, tanto em confinamento como em rebanhos mantidos a pasto (BUTLER, 1998; WESTWOOD; LEAN; KELLAWAY, 1998). As taxas de prenhez tiveram diminuição de cerca de 20%, quando NUP ou NUL foi maior que 19 mg/dL (BUTLER; CALAMAN; BEAM, 1996). Rajada-Schultz et al. (2001) constataram que vacas com concentrações de NUL abaixo de 10 mg/dL tiveram 2,5 vezes mais probabilidade de prenhez do que vacas com concentrações acima de 15,4 mg/dL.

Contudo, pesquisadores têm demonstrado que uma nutrição adequada e um bom manejo compensam a queda na fertilidade dos

rebanhos, com a produção média de leite ultrapassando 12.000 kg/vaca/ano (RAJADA-SCHULTZ et al., 2001). Nos EUA e em algumas fazendas brasileiras, já foram traçados, como metas, valores de NUL menores do que 10 mg/dL, porém, a realidade de nossas fazendas fica em torno de 13 a 18 mg/dL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA, 2007).

2.6 Estudos realizados em rebanhos comerciais

A condução de estudos de grande porte em estações experimentais é difícil, sendo a utilização da experimentação em rebanhos comercial cada vez mais frequente (TEMPELMAN, 2009). Recentemente, pressões por regulamentação ambiental têm direcionado vários financiamentos, que antes eram aplicados em universidades, para locais ou fazendas comerciais. Apesar de estudos em condição controlada serem importantes para o conhecimento básico de mecanismos de ação e processos fisiológicos, a pesquisa realizada em rebanhos comerciais, principalmente aquela envolvendo múltiplos rebanhos, tem a vantagem de ter inferência direta nas condições de criação, de clima e de genética animal adotadas pela indústria e contribuir com o avanço de tecnologias de interesse prático. Estudos conduzidos em rebanhos também podem ter menor custo que os conduzidos em estações experimentais.

Entretanto, na maioria dos estudos envolvendo rebanhos comerciais, a unidade experimental adotada são currais que, raramente, são constantes em manter os animais recebendo os tratamentos ao longo do período de coleta de dados. Nestas situações, a precisão na alocação

dos tratamentos nas unidades experimentais também é questionável e nem sempre são utilizados tratamentos controle fornecidos simultaneamente ao tratamento em teste. Para tratar essa questão, é importante conhecer o que influencia o poder estatístico e rever o conceito de poder estatístico, que é a probabilidade de um ou mais tratamentos serem diferentes, em termos de respostas significativas. É considerado poder estatístico quando esta probabilidade for superior a 80%, no entanto, dependendo do contexto, sejam de 70% a 99%, estes valores podem ser considerados aceitáveis, pois, de alguma forma, eles podem indicar algumas diretrizes. Quando adequadamente projetados, ensaios na exploração de alimentação podem servir a um propósito útil no processo científico (SAINT-PIERRE; JONES, 1999; TEMPELMAN, 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em dois rebanhos comerciais, sendo um no município de Castro e outro no de Carambeí, ambos na região dos Campos Gerais, no estado do Paraná. Uma equipe de três pesquisadores esteve presente, continuamente, em cada rebanho, e foi responsável pela administração dos tratamentos e pela coleta de dados.

No Experimento 1, 68 vacas da raça Holandês foram alojadas em um curral tipo *free stall*, por cinco dias pré-experimentais e ao longo dos 21 dias de aplicação dos tratamentos. Nesse curral não houve a entrada de novas vacas durante o experimento.

Durante cinco dias pré-experimentais, foi mensurada a produção de leite de cada animal e amostras compostas das três ordenhas diárias foram formadas diariamente, para a mensuração dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, contagem de células somáticas (CCS) e nitrogênio ureico no leite (NUL). As amostras foram coletadas em frascos que continham o conservante 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol e foram analisadas no Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH, Curitiba, PR).

A CCS foi transformada em uma escala linear de 0 a 9 (CCS linear), sendo o ponto médio de cada escore linear representado pelos seguintes valores de CCS (x 1000 células/mL): 12,5 para CCS linear 0; 25 para CCS linear 1; 50 para CCS linear 2; 100 para CCS linear 3; 200 para CCS linear 4; 400 para CCS linear 5; 800 para CCS linear 6; 1600 para CCS linear 7; 3200 para CCS linear 8 e 6400 para CCS linear 9. No

final desse período, o peso vivo foi estimado por fita de perímetro torácico e a condição corporal foi avaliada, em escala de 1 a 5 pontos (WILDMAN et al., 1982), por dois avaliadores independentes. Esses dados, coletados no período pré-experimental, foram incluídos como covariável no modelo de análise estatística.

Ao final do período pré-experimental, as vacas foram bloqueadas em pares, primariamente, por ordem de parto (primíparas ou vacas com dois ou mais partos) e, secundariamente, por produção média de leite, nos cinco dias pré-experimentais. Entre as 68 vacas inicialmente alocadas, 10 recebiam somatotropina bovina (bST) e, por isso, formaram cinco blocos à parte, também pareados por ordem de parto e produção. Dentro de cada bloco, os animais foram aleatoriamente alocados em um de dois tratamentos, Optigen (Optigen[®] II. Alltech do Brasil, Curitiba, PR) ou Controle, por 21 dias, e a resposta aos tratamentos avaliada entre os dias 17 e 21.

O peso vivo e a condição corporal de cada vaca foram mensurados no dia 21. Das 68 vacas que participaram do período pré-experimental, 61 terminaram o experimento, sendo 31 no tratamento Optigen e 30 no grupo Controle, já que perdas de sete unidades experimentais ocorreram por mastite e problemas de casco. O parâmetro dias em lactação no primeiro dia do período pré-experimental foi 245 ± 88 (média \pm desvio padrão) e as vacas tinham $3,0 \pm 1,4$ partos no Optigen, sendo estes valores, respectivamente, de 241 ± 79 e $2,6 \pm 1,3$ no Controle.

O curral foi dividido fisicamente em duas metades e cada uma recebeu os tratamentos Controle ou Optigen. Os dois grupos de animais foram alimentados, simultaneamente, três vezes por dia, com a mesma

dieta basal oferecida na forma de dieta total misturada (Tabela 1). Os tratamentos foram acrescidos e misturados manualmente à dieta basal. Para cada 100 kg de dieta basal foram acrescidos 5,45 kg de matéria natural de uma mistura contendo 95% de silagem de milho (27,6% de matéria seca) e 5% de Optigen[®]II ou 1,93 kg de farelo de soja no tratamento Controle. A quantidade oferecida diariamente de Optigen[®]II, por vaca, foi 160 g e a de farelo de soja foi de 1 kg. Os teores nutricionais almejados da dieta total foram: 49,3% de matéria seca (MS) na matéria natural, 17,5% de proteína bruta (PB) na MS e 32,1% de fibra em detergente neutro (FDN) na MS.

Tabela 1. Composição da dieta basal, em ingredientes (% da MS). Experimento 1

Silagem de milho (27,6%MS, 7,6% PB, 54,9% FDN)	36,1
Silagem pré-secada de azevém (45,6% MS, 22,9% PB, 51,1% FDN)	8,7
Concentrado comercial	29,4
Caroço de algodão	9,4
Milho maduro moído fino	8,2
Farelo de soja	6,0
Mistura mineral ¹	0,4
Bicarbonato de sódio	0,6
Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac [®])	0,8
Óxido de magnésio	0,3

¹Mistura mineral: 16,84% Ca; 15% Cl; 7,3% P; 1,6% Mg; 2% S; 9,8% Na; 26 ppm Co; 1.162 ppm Cu; 1.875 ppm Fe; 65 ppm I; 4.175 ppm Mn; 23 ppm Se; 8.123 ppm Zn .

Nos dias 17 a 21, a quantidade oferecida de dieta total (dieta basal acrescida dos tratamentos), em cada alimentação e a sobra diária de cocho foram mensuradas. Amostras da dieta total foram obtidas por tratamento em cinco pontos ao longo do cocho, em cada uma das três alimentações diárias, formando uma amostra composta para congelamento. Ao final de cada dia, uma amostra composta do oferecido foi formada. Amostras das sobras diárias, das forragens e dos compostos diários da dieta total, oferecida entre os dias 17 e 21, foram analisadas para MS, PB e FDN. O teor de MS foi determinado por desidratação em estufa ventilada por 72 horas, a 58 °C e posterior moagem das amostras em peneira de 1 mm, em moinho tipo Thomas Willey. Uma subamostra foi levada à estufa de 100 °C, por 24 horas, para a determinação do teor de MS. A PB foi determinada por aparelho de destilação a vapor Microkjeldhal. A FDN foi determinada por análise não sequencial, de acordo com Soest, Robertson e Lewis (1991). Na técnica de FDN utilizaram-se 0,5 g de sulfito de sódio e 200 µl de α -amilase, 100 µl adicionados ao béquer durante a fervura da amostra em solução de detergente neutro e 100 µl quando da filtragem em cadinho com água quente.

A sobra diária de cocho foi calculada como proporção da matéria natural oferecida. O consumo de matéria seca, de nutrientes do lote e o teor de nutrientes na dieta consumida foram calculados considerando a composição do oferecido e das sobras diárias. A produção média de leite do lote, a cada dia de mensuração do consumo, foi utilizada para calcular a eficiência leiteira, ao dividir a produção pelo consumo de MS do grupo de animais.

Uma amostra de urina foi coletada de cada animal, entre os dias 17 a 21 do período, para a estimativa da relação entre a concentração de alantoína e a de creatinina, utilizada como medida relativa da síntese diária de proteína microbiana. A amostra foi diluída na proporção 3:2, com solução a 4% de ácido sulfúrico e imediatamente congelada, a -20 °C, para posteriores análises de alantoína (CHEN; GOMES, 1995) e creatinina (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG. Cat.35-100).

No Experimento 2, as 120 vacas da raça Holandês foram alojadas em *free stall*, por 42 dias, sem que fosse permitida a entrada de novos animais ao longo do período de coleta de dados. Uma vez que 23 vacas deixaram o lote experimental ao longo destes 42 dias, em decorrência de secagens, descartes por falha reprodutiva e problemas de casco ou por mastite, dados de somente 97 unidades experimentais foram utilizados na análise final. Os animais estavam com 291 ± 127 dias em lactação, no primeiro dia experimental, com ordem de lactação de $2,9 \pm 1,3$ partos, e apenas quatro vacas eram primíparas.

As vacas foram blocadas em pares com base na produção diária de leite. Dentro de cada bloco, cada animal foi aleatoriamente alocado em uma sequência dos dois tratamentos, em dois períodos de 21 dias, em delineamento de reversão simples. Mensurações foram realizadas na terceira semana (dias 17 a 21) de cada período experimental. O curral foi dividido fisicamente em duas metades, cada uma recebendo os tratamentos Controle ou Optigen, acrescidos à dieta basal do rebanho.

Os dois grupos de animais foram alimentados simultaneamente, três vezes por dia, com a mesma dieta basal, oferecida na forma de dieta total misturada (Tabela 2). Para cada 100 kg de matéria natural de dieta

basal oferecida foram acrescidos 4,18 kg de matéria natural de pré-misturas, contendo os tratamentos (Tabela 3).

Foram oferecidas, diariamente, por vaca, as quantidades de 152 g de Optigen[®] II e 1 kg de farelo de soja. As pré-misturas foram acrescidas e misturadas manualmente à dieta basal. Os teores nutricionais almejados da dieta total foram de 47,8% de MS na MN, 17,7% de PB na MS e 33,1% de FDN na MS.

Tabela 1: Composição da dieta basal em ingredientes (% da MS). Experimento 2

Alimento	kg
Silagem de milho (24,5% de MS, 9,58% de PB, 53,9% de FDN)	30,8
Silagem de azevém (37,5% de MS, 13,3% de PB, 65,4% de FDN)	13,5
Silagem de soja (28,1% de MS, 15,2% de PB, 61,3% de FDN)	5,1
Concentrado comercial	27,6
Caroço de algodão	11,5
Milho maduro moído fino	7,5
Farelo de soja	3,7
Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac)	0,5

Nos dias 17 a 21, a quantidade oferecida de dieta basal e das pré-misturas com os tratamentos, em cada alimentação, e a sobra diária de cocho foram mensuradas. Amostras da dieta basal oferecida foram obtidas, por tratamento, em cinco pontos ao longo do cocho, em cada uma das três alimentações diárias, as quais formaram uma amostra composta para congelamento. Ao final de cada dia, uma amostra composta do oferecido foi formada. Amostras das forragens, das pré-misturas com os tratamentos, da sobra diária de cocho e dos compostos da dieta basal foram analisados para MS, PB e FDN, como descrito para o Experimento 1. A sobra diária de cocho, o consumo de matéria seca e de nutrientes do lote, o teor de nutrientes

na dieta consumida e a eficiência leiteira do lote foram calculados como anteriormente descrito.

Tabela 2: Composição das pré-misturas nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2

Item	Optigen	Controle
	% da matéria natural	
Bicarbonato de sódio	7,5	7,5
Farelo de soja		50,0
Fosfato bicálcico	4,0	4,0
Milho maduro moído fino	62,5	20,0
Levedura (Milk-Sacc X)	2,0	2,0
Optigen® II	7,5	
Óxido de magnésio	3,0	3,0
Cloreto de sódio	3,5	3,5
Mistura mineral ¹	10,0	10,0
Matéria seca	91,0	92,0
	% da matéria seca	
Proteína bruta	24,9	24,1
Fibra em detergente neutro	10,0	14,9

¹Mistura mineral: 16,84% Ca; 15% Cl; 7,3% P; 1,6% Mg; 2% S; 9,8% Na; 26 ppm Co; 1.162 ppm Cu; 1.875 ppm Fe; 65 ppm I; 4.175 ppm Mn; 23 ppm Se; 8.123 ppm Zn.

As vacas foram ordenhadas três vezes ao dia. A produção de cada vaca foi mensurada e amostras foram coletadas entre os dias 17 a 21 de cada período. Amostras de leite foram obtidas e analisadas similarmente ao descrito no Experimento 1. O peso vivo foi estimado por determinação do

perímetro torácico e a condição corporal de cada vaca foi mensurada por três avaliadores independentes, no dia 16 de cada período, para descrever as unidades experimentais. Uma amostra de urina foi coletada de cada animal, entre os dias 17 a 21 de cada período, para estimativa da excreção de alantoína e creatinina, utilizada como medida relativa da síntese diária de proteína microbiana. O procedimento para amostragem e análises foi semelhante ao descrito no Experimento 1.

Os dados do Experimento 1 foram analisados pelo procedimento GLM, do Statistical Analysis Software Institute - SAS Institute (2004), com modelo contendo os efeitos de covariável (medida da mesma variável no período pré-experimental), bloco (1 a 34) e tratamento (Optigen ou Controle). Os dados de consumo e conversão alimentar foram analisados mediante uso de dia de coleta (17 a 21), em modelo contendo apenas o efeito de tratamento.

Os dados do Experimento 2 foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (2004), por modelo contendo os efeitos de vaca (1 a 97), período (1 ou 2) e tratamento (Optigen ou Controle). Os dados de consumo e conversão alimentar utilizaram o dia de coleta como unidade experimental e o modelo contendo os efeitos de período, o tratamento e a interação entre período e tratamento. Não houve interação significativa entre período e tratamento, para qualquer das variáveis (P variando de 0,17 a 0,82).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1, o percentual de sobra ao redor de 5% do oferecido não diferiu entre tratamentos (Tabela 4). A tendência ($P=0,10$) de menor teor de MS no oferecido e nas sobras no tratamento Optigen é coerente, uma vez que a silagem de milho com teor de MS ao redor de 28% substituiu o farelo de soja nesse tratamento. Houve similaridade entre tratamentos nas concentrações de PB e FDN da dieta oferecida e da sobra. Resultado semelhante foi observado no experimento 2, mesmo com proporção de sobra, relativamente ao oferecido, de apenas 2,5% (Tabela 5).

Tabela 3: Composição da dieta oferecida e da sobra alimentar nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 1.

	Controle	Optigen	EPM ¹	P Trat ²
	% do oferecido			
Sobra de matéria natural	4,7	5,3	0,54	0,46
	% da matéria natural			
Matéria seca da dieta	46,4	45,0	0,51	0,10
Matéria seca da sobra	44,4	41,0	1,34	0,11
	% da matéria seca			
Proteína bruta da dieta	17,9	17,5	0,46	0,48
Proteína bruta da sobra	16,4	16,4	0,19	0,99
FDN ³ da dieta	38,8	38,5	1,38	0,89
FDN ³ da sobra	39,2	38,5	0,79	0,56

¹EPM=Erro padrão das médias ²P Trat=Valor de probabilidade para efeito de tratamento. ³FDN=Fibra em detergente neutro.

A similaridade entre os tratamentos na proporção de sobra e na composição da dieta e sobra sugere que foi atendida a meta de obter dietas isonutricionais, necessárias para que fosse avaliada a substituição de farelo de soja pela mistura de Optigen[®]II e silagem de milho, no experimento 1, e Optigen[®]II e milho finamente moído, no experimento 2. As metodologias de incorporação dos tratamentos à dieta basal foram eficientes.

O teor de PB foi menor na sobra que na dieta oferecida, enquanto o teor de FDN aumentou na sobra (Tabelas 4 e 5), mostrando que os animais selecionaram a favor de alimentos com maior densidade proteica e energética. Entretanto, proporcionalmente ao teor nutricional do oferecido, a variação no teor nutricional da sobra foi menor no experimento 1. Neste, a queda no teor de PB foi em torno de 7% do teor oferecido e o aumento no teor de FDN foi de apenas 1% do oferecido. No experimento 2, de menor sobra como proporção do oferecido, a PB da sobra foi 10% menor que a PB do oferecido e o aumento no teor de FDN foi ao redor de 17% do oferecido. Sobra de cocho abaixo de 3% parece ter induzido seletividade mais acentuada que sobra ao redor de 5%, obviamente com a ressalva de que as dietas eram distintas em teor de ingredientes.

Tabela 4: Composição da dieta oferecida e da sobra alimentar nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2.

	Controle	Optigen	EPM ¹	P Trat ²
	% do oferecido			
Sobra de matéria natural	2,7	2,3	0,88	0,74
	% da matéria natural			
Matéria seca da dieta basal	41,4	40,4	0,72	0,33
Matéria seca da dieta total	43,5	42,4	0,69	0,30
Matéria seca da sobra	41,5	41,6	1,84	0,96
	% da matéria seca			
Proteína bruta da dieta basal	16,6	16,3	0,28	0,44
Proteína bruta da dieta total	17,3	17,1	0,26	0,60
Proteína bruta da sobra	15,3	15,8	0,53	0,52
FDN ³ da dieta basal	42,5	41,7	0,63	0,39
FDN ³ da dieta total	39,6	38,6	0,56	0,24
FDN ³ da sobra	45,6	45,7	1,11	0,93

¹EPM=Erro padrão das médias ²P Trat=Valor de probabilidade para efeito de tratamento. ³FDN=Fibra em detergente neutro.

Nos dois rebanhos, o teor de PB na dieta oferecida (Tabelas 4 e 5) foi semelhante ao teor almejado pela formulação, 17,5% no experimento 1 e 17,7% no experimento 2. Entretanto, em ambos os rebanhos, o teor de FDN do oferecido foi acima do almejado, 32,1% no Experimento 1 e 33,1% no Experimento 2. Esse fato sugere que o teor de FDN das forragens pode ter sido subestimado durante a formulação das dietas experimentais, enquanto o teor de energia foi superestimado. Monitoramento para ajuste dietético do teor de fibra dos alimentos parece ser mais pertinente que o ajuste no nitrogênio dietético nesses rebanhos. Uma explicação plausível para a menor precisão no balanceamento de

carboidratos é a variabilidade no teor de fibra entre partidas de silagem ou entre silos. Manter a oferta constante de uma mesma forragem ao longo do período de coleta de dados seria uma rota para aumentar a precisão em experimentos de nutrição conduzidos em fazendas, apesar de a implementação desta prática ser difícil, principalmente em rebanhos com alto número de animais relativamente ao tamanho dos silos.

Não foi detectado efeito de tratamento ($P>0,62$) sobre a produção diária de leite (Tabelas 6 e 7). Quando o espaço da formulação gerado pela remoção parcial do farelo de soja da dieta foi ocupado por silagem de milho, vacas alimentadas com Optigen[®] II mantiveram altas produções de leite, acima de 38 kg diários (Tabela 6), mesmo consumindo uma dieta com maior teor de forragem. A secreção diária de sólidos também não variou ($P>0,44$) com os tratamentos, em conformidade com o relatado por Galo et al. (2003) e Santos et al. (2011). Entretanto, no experimento 2, foi observada queda ($P=0,04$) de 0,07 pontos percentuais no teor de gordura do leite no tratamento Optigen, semelhante ao observado por Souza et al. (2010). A queda no teor de gordura é coerente com o pequeno aumento no teor dietético de amido de milho no tratamento Optigen.

A substituição de farelo de soja por Optigen[®] II mais silagem de milho no Experimento 1 aumentou ($P<0,01$) o teor de NUL (Tabela 6), efeito não detectado quando o uso de Optigen[®] II foi acompanhado de aumento simultâneo no teor dietético de amido oriundo de milho maduro, finamente moído, no Experimento 2 (Tabela 7). Inostroza et al. (2009a, 2009b) também observaram que a substituição parcial de farelo de soja por Optigen[®] II mais silagem de milho aumentou o teor de NUL em fazendas do Wisconsin. Esse fato não foi observado por Santos et al.

(2011), quando farelo de soja foi substituído por Optigen® II mais polpa cítrica, nem por Souza et al. (2010), quando farelo de soja foi substituído por Optigen® II mais casca de soja.

Esses resultados sugerem que, mesmo com baixa substituição de N de soja por N de Optigen® II, a estratégia de substituição de farelo de soja por concentrados energéticos parece induzir uma resposta mais desejável em NUL, comparativamente à substituição por carboidratos lentamente degradáveis de forrageiras, os quais não permitem um sincronismo ruminal tão precioso com amônia produzida (SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991).

Os delineamentos foram capazes de detectar diferença estatística quando o escore de condição corporal diferiu em 0,08 pontos no Experimento 1 (Tabela 6) e quando o teor de lactose diferiu em 0,02 pontos percentuais e o perímetro torácico diferiu em 1 cm, equivalente à diferença no peso estimado pelo perímetro de 9 kg, no Experimento 2 (Tabela 7). Estes resultados enfatizam o alto poder experimental de trabalhos conduzidos em grandes fazendas comerciais. Contudo, estas diferenças são irrelevantes, biologicamente. A metodologia de alocação dos animais aos tratamentos foi eficiente em garantir igualdade entre as unidades experimentais.

Tabela 5: Produção, composição do leite, relação entre alantoína e creatinina na urina e descrição dos animais nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 1.

	Controle	Optigen	EPM ¹	P Trat ²
	kg/dia			
Leite	38,4	38,9	0,60	0,62
Gordura	1,328	1,320	0,0199	0,76
Proteína	1,268	1,275	0,0192	0,80
Lactose	1,763	1,769	0,0320	0,90
Sólidos totais	4,745	4,763	0,0767	0,87
	%			
Gordura	3,46	3,40	0,035	0,30
Proteína	3,31	3,29	0,016	0,54
Lactose	4,58	4,57	0,018	0,74
Sólidos totais	12,30	12,31	0,056	0,80
	x 1000 células/mL			
CCS ³	320	252	69,9	0,51
	1 a 9			
CCS linear	3,61	3,86	0,17	0,33
	mg/dL			
Nitrogênio ureico do leite	16,3	17,3	0,20	<0,01
	mmol/L			
Alantoína/creatinina na urina	0,99	1,11	0,075	0,31
	cm			
Perímetro torácico	213,7	213,5	0,93	0,91
	kg			
Peso vivo	698	696	5,9	0,81
	1 a 5			
Condição corporal	2,75	2,83	0,027	0,04

¹EPM=Erro padrão das médias ²P Trat=Valor de probabilidade para efeito de tratamento. ³CCS= Contagem de células somáticas

Tabela 6: Produção, composição do leite, relação entre alantoína e creatinina na urina e descrição dos animais nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2.

	Controle	Optigen	EPM ¹	P Trat ²
	kg/dia			
Leite	27,0	27,2	0,24	0,64
Gordura	1,033	1,020	0,0131	0,51
Proteína	0,921	0,928	0,0078	0,52
Lactose	1,167	1,179	0,0106	0,44
Sólidos totais	3,366	3,378	0,0327	0,80
	%			
Gordura	3,82	3,75	0,022	0,04
Proteína	3,42	3,42	0,008	0,89
Lactose	4,31	4,33	0,007	0,05
Sólidos totais	12,46	12,43	0,026	0,43
	x 1000 células/mL			
CCS ³	326	323	12,6	0,90
	1 a 9			
CCS linear	4,51	4,54	0,052	0,69
	mg/dL			
Nitrogênio ureico do leite	16,1	16,3	0,07	0,14
	mmol/L			
Alantoína/creatina na urina	0,64	0,78	0,035	0,03
	Cm			
Perímetro torácico	218,9	217,9	0,42	0,09
	Kg			
Peso vivo	733	724	2,5	<0,01
	1 a 5			
Condição corporal	3,02	3,05	0,025	0,41

¹EPM=Erro padrão das médias ²P Trat=Valor de probabilidade para efeito de tratamento. ³CCS=Contagem de células somáticas

O consumo diário do grupo de vacas não diferiu entre tratamentos (Tabelas 8 e 9). Os valores observados ficaram abaixo do predito para esse grupo de animais, pela metodologia do NRC (2001). O consumo

predito para a vaca, com valores médios de produção de leite, peso vivo e estágio de lactação, no Experimento 1, foi de 26,3 kg/dia e, para a do Experimento 2, foi de 23,3 kg/dia, 2,3 e 2,0 kg, respectivamente, acima do mensurado para o grupo de animais.

Os valores experimentais, apesar de maiores que os preditos, são coerentes biologicamente. Entretanto, a metodologia de mensuração do consumo do grupo mediante o uso de cada um dos cinco dias como unidade experimental não foi capaz de dar suporte estatístico à diferença de 0,9 kg no consumo diário no experimento 2 (Tabela 9). Apesar da ausência em efeito de tratamento sobre o consumo do lote, houve tendência ($P=0,08$) de maior eficiência leiteira quando Optigen[®]II mais milho substituiu farelo de soja, no Experimento 2 (Tabela 9). Esses dados são similares ao observado por Santos et al. (2011), quando farelo de soja foi substituído por Optigen[®]II mais polpa cítrica. Tais resultados sugerem que a estratégia de substituir farelo de soja por Optigen[®]II e concentrados é mais promissora como forma de atuar sobre a eficiência biológica de vacas leiteiras do que o aumento no teor dietético de forragem.

Nos dois ensaios experimentais aqui relatados, bem como nos demais trabalhos revisados, a típica inclusão de ureia de liberação lenta na dieta de vacas lactantes tem ficado ao redor de 150 g diárias, o que permite a retirada de 1,0 kg de farelo de soja e, assim, caracteriza-se a substituição parcial. Ao assumir uma suplementação de 150 g/vaca/dia e a cotação do Optigen[®]II a R\$3,65/kg (janeiro de 2012), pode-se estimar em R\$0,55/vaca/dia o custo dessa suplementação.

Tabela 7: Consumo e eficiência leiteira do grupo de vacas nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 1.

	Controle	Optigen	EPM ¹	P Trat ²
	kg/dia			
Consumo de matéria seca	23,8	24,1	0,45	0,61
Consumo de proteína bruta	4,3	4,2	0,11	0,67
Consumo de FDN ³	9,2	9,3	0,18	0,82
	% do peso vivo			
Consumo de FDN ³	1,31	1,34	0,027	0,52
Leite/Consumo de matéria seca	1,61	1,62	0,036	0,76

¹EPM=Erro padrão das médias ²P Trat=Valor de probabilidade para efeito de tratamento. ³FDN=Fibra em detergente neutro

Tabela 8: Consumo e eficiência leiteira do grupo de vacas nos tratamentos Optigen e Controle. Experimento 2.

	Controle	Optigen	EPM ¹	P Trat ²
	kg/dia			
Consumo de matéria seca	21,7	20,8	0,47	0,19
Consumo de proteína bruta	3,7	3,6	0,09	0,15
Consumo de FDN ³	8,6	8,1	0,25	0,13
	% do peso vivo			
Consumo de FDN ³	1,17	1,12	0,034	0,26
Leite/Consumo de matéria seca	1,25	1,32	0,028	0,08

¹EPM=Erro padrão das médias ²P Trat=Valor de probabilidade para efeito de tratamento. ³FDN=Fibra em detergente neutro.

5. CONCLUSÃO

Os experimentos foram capazes de detectar diferença estatisticamente significativa e pequena em algumas variáveis, evidenciando o alto poder experimental de trabalhos conduzidos em fazendas comerciais.

A substituição de farelo de soja por Optigen®II mais milho maduro finamente moído resultou em produção similar de leite, sem induzir aumento no teor de NUL, observado quando farelo de soja foi substituído por Optigen® II mais silagem de milho. Esta estratégia também se mostrou promissora pela possibilidade de melhorar a eficiência leiteira, dada pela relação entre o leite produzido e o consumo de alimentos.

A estratégia de substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta parece ser o caminho para uma melhor eficiência alimentar

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. C. **Ureia de liberação lenta em dietas para vacas leiteiras mestiças em pasto ou confinadas**. 2010. 48 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

AGLE, M. et al. The effects of ruminally degraded protein on rumen fermentation and ammonia losses from manure in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 4, p. 1625-1637, Apr. 2010.

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. Nutritive requirements of ruminants animals protein. **Nutrition Abstracts and Reviews - Series B**, Farnham, v. 62, n. 12, p. 787-835, 1992.

AIELLO, R. J.; ARMENTANO, L. E. Gluconeogenesis in goat hepatocytes is affected by calcium, ammonia and other key metabolites but not primarily through cytosolic redox state. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 88B, p. 193-201, 1987.

AKAY, V. et al. Optigen ®1200: controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. In: **NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES**, 21., 2004, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2004. p. 179-185.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, July 2000.

ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board-invited review: the hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 10, p. 3317-3334, Oct. 2009.

ANIL, M. H.; FORBES, J. M. The roles of hepatic nerves in the reduction of food intake as a consequence of intraportal sodium propionate administration in sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 73, p. 539-546, 1988.

ARRIAGA, H. et al. Nutritional and management strategies on nitrogen and phosphorus use efficiency of lactating dairy cattle on commercial farms: an

environmental perspective. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 204-215, Jan. 2009.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 1, p. E9-E21, 2005. Supplement.

BARTLEY, E. E.; DEYOE, C. W. Starea as a protein replacer for ruminants: a review of 10 years of research. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 47, p. 42-44, 1975.

BERTHOUD, H. R. Anatomy and function of sensory hepatic nerves. **Anatomical Record**, New York, v. 280, n. 9, p. 827-835, Sept. 2004.

BOUCHER, S. E. et al. Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 12, p. 5819-5633, Dec. 2007.

BRADFORD, B. J.; ALLEN, M. S. Depression in feed intake by a highly fermentable diet is related to plasma insulin concentration and insulin response to glucose infusion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 3838-3845, Aug. 2007.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1370-1381, Apr. 2003.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 11, p. 2964-2971, Nov. 1997.

BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 6, p. 2822-2834, June 2009.

BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, Sept. 1998.

BUTLER, W. R.; CALAMAN, J. J.; BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 858-865, Apr. 1996.

BUTLER, W. R. et al. Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 2896-2901, Sept. 2004.

CABRITA, A. R. J. et al. Evaluation of the effects of synchronizing the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows: a review. **Animal Research**, Tubingen, v. 55, n. 1, p. 1-24, 2006.

CAMERON, M. R. et al. Effects of urea and starch on rumen fermentation, nutrient passage to the duodenum, and performance of cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. 1321-1336, Jan. 1991.

CASS, J. L.; RICHARDSON, C. R. **In vitro ammonia release from urea/calcium compounds as compared to urea and cottonseed meal**. Lubbock: Texas Technical University Agronomy Science, 1994. 8 p. (National Research Technology Report, T-5-342).

CHALUPA, W. Precision feeding of nitrogen to lactating dairy cows: a role for optigen II. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOT INDUSTRIES, 1., 2007, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2007. p. 221.

CHEN, X. B.; GOMES, J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details**. Bucksburn: International Feed Resources Unit, 1995. 20 p.

CHOUNG, J. J.; CHAMBERLAIN, D. G. Effects of intraruminal infusion of propionate on the concentrations of ammonia and insulin in peripheral blood of cows receiving an intraruminal infusion of urea. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v. 62, n. 10, p. 549-557, Nov. 1995.

CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Distribution and changes in urease (EC 3.5.1.5) activity in rumen simulation technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 47, n. 2, p. 331-348, Oct. 1982.

DEPETERS, E. J.; FERGUSON, J. D. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 11, p. 3192-3209, Nov. 1992.

FIRKINS, J. L.; REYNOLDS, K. Whole animal nitrogen balance in cattle. In: PFEFFER, E.; HRISTOV, A. (Ed.). **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle and environment**. Cambridge: CAB International, 2005. p. 167-185.

FIRKINS, J. L.; WEISS, W. P.; PIWONKA, E. J. Quantification of intraruminal recycling of microbial nitrogen using nitrogen-15. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 10, p. 3223-3233, Oct. 1992.

FORBES, J. M. Metabolic aspects of the regulation of voluntary food intake and appetite. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 1, p. 145-168, 1988.

FORERO, O.; OWENS, F. N.; LUSBY, K. S. Evaluation of slow-release for winter supplementation of lactating range cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 50, n. 3, p. 532-538, 1980.

FOX, D. G.; TEDESCHI, L. O.; TYLUTKI, T. P. The Cornell net carbohydrate and protein system model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 112, n. 1/4, p. 29-78, 2004.

GALO, E. et al. Effect of a polymer-coat urea product on nitrogen metabolism in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 2154-2162, June 2003.

GALLOWAY, J. N. et al. Reactive nitrogen: too much of a good thing. **Ambio**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 60-63, Mar. 2002.

GARCIA, A. D. et al. Effects of temperature, moisture and aeration on fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 93-103, Aug. 1989.

GARCÍA-GONZÁLES, R. et al. Optigen is a sustained release source of non-protein nitrogen in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 98-98, 2007. Supplement.

GARRETT, J. et al. Encapsulated slow release urea in lactating dairy cow diets impacts microbial efficiency and metabolism in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 1, p. 321-321, 2005. Supplement.

GRUM, D. E.; SHOCKEY, W. L.; WESS, W. P. Electrophoretic examination of alfalfa silage proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 8, p. 146-154, Aug. 1991.

HALL, M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from *in vitro* fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 11, p. 2486-2493, Nov. 2001.

HARRISON, G. A.; MEYER, M. D.; DAWSON, K. A. Diet formulation strategy and Optigen effects on fermentation, digestion, and N flow in rumen-simulating fermenters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 490-490, 2008a. Supplement.

_____. Effect of Optigen and dietary neutral detergent fiber level on fermentation, digestion, and N flow in rumen-simulating fermenters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 489-490, 2008b. Supplement.

_____. Effect of Optigen and ruminally degradable protein level on fermentation, digestion, and N flow in rumen-simulating fermenters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 489-489, 2008c. Supplement.

HARRISON, G. A.; TRICARICO, J. M.; DAWSON, K. A. Effects of urea and Optigen® II on ruminal fermentation and microbial protein synthesis in rumen-simulating cultures. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 22., 2006, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2006. 1 CD-ROM.

HENNING, P. H.; STEYN, D. G.; MEISSNER, H. H. The effect of energy and nitrogen supply pattern on rumen bacterial growth *in vitro*. **Animal Production**, Edinburgh, v. 53, n. 1, p. 165-175, Jan. 1991.

HIGHSTREET, A.; ROBINSON, P. H.; ROBISON, J. Response of Holstein cows to replacing urea with a slowly rumen released urea in a diet high in soluble crude protein. **Livestock Science**, New York, v. 129, p. 179-185, 2010.

HOBSON, P. N.; WALLACE, R. J. Microbial ecology and activities in the rumen: part II. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 9, n. 4, p. 253-320, 1982.

HOJMAN, D. et al. Relationships between milk urea and production, nutrition, and fertility traits in Israeli dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 1001-1011, May 2004.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Various factors affecting microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3630-3645, Oct. 1991.

HOWARTH, R. W. et al. Nitrogen use in the United States from 1961-2000 and potential future trends. **Ambio**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 88-96, Feb. 2002.

HRISTOV, A.; BRODERICK, G. A. In vitro determination of ruminal protein degradability using [15N]-ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 5, p. 1344-1353, May 1994.

HUBER, J. T.; COOK, R. M. Influence of site of administration of urea on voluntary intake of concentrate by lactating cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 10, p. 1470-1473, Oct. 1972.

HUHTANEN, P.; HRISTOV, A. N. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 7, p. 3222-3232, July 2009.

HUNTINGTON, G. B. Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood of beef steers fed alfalfa hay or a high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 215-223, Jan. 1989.

INOSTROZA, J. F. et al. Effect of diets containing a controlled-release urea product on milk yield, milk composition, and milk component yields in commercial Wisconsin dairy herds and economic implications. **The Professional Animal Scientist**, Illinois, v. 26, n. 2, p. 175-180, Apr. 2010.

INOSTROZA, J. F. et al. Effect of Optigen[®] II on milk yield, composition, and component yields in commercial Wisconsin dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 290-291, 2009a. Supplement.

_____. Evaluation of the economic impact of Optigen use in commercial dairy herd diets with varying feed and milk prices. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 43-44, 2009b. Supplement.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. E22-E37, 2005a. Supplement.

_____. Varying protein and starch in the diet of dairy cows: II., effects on performance and nitrogen utilization for milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2556-2570, July 2005b.

JUHÁSZ, B.; SZEGEDI, B. Effects of disturbances of acid-base equilibrium on the activity of the rumen. **Acta Physica Hungarica**, Budapest, v. 62, p. 7-17, 1983.

KALSCHEUR, K. F. et al. Production of dairy cows fed differing concentrations of rumen-degraded protein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 249-259, Jan. 2006.

KERTZ, A. F. et al. Factors influencing intake of high urea-containing rations by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 4, p. 587-604, 1982.

KIM, H. S. et al. Effect of propionate on ovine urea kinetics. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROTEIN METABOLISM AND NUTRITION, 13., 1999, Aberdeen. **Proceedings...** Aberdeen: ISPMN, 1999. p. 57.

LAPIERRE, H.; LOBLEY, G. E. Nitrogen recycling in the ruminant: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 223-236, Jan. 2001.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; SOEST, P. J. van. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 347-358, Mar. 1996.

LOBLEY, G. E. et al. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 73, n. 1, p. 667-685, Jan. 1995.

MENG, Q. et al. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial yield and efficiency. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 6, p. 206-214, Jan. 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements for dairy cattle**. Washington: National Academy, 1989. 157 p.

_____. **Nutrient requirements of beef cattle**. 5th ed. Washington: National Academy, 1976. 142 p.

_____. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy, 2001. 364 p.

NOUSIAINEN, J.; SHINGFIEL, J. K.; HUHTANEN, P. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 2, p. 386-398, Oct. 2004.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Dose-response effects of intrauminal infusion of propionate on feeding behavior of lactating cows in early or midlactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 2922-2931, Apr. 2003a.

_____. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 174-183, Apr. 2003b.

_____. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 184-194, Apr. 2003c.

_____. Effects of intra-ruminal infusion of sodium, potassium, and ammonium on hypophagic effect of propionate in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1398-1404, Apr. 2003d.

_____. Extent of hypophagia caused by propionate infusion was related to plasma glucose concentration in lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 1105-1112, 2003e.

_____. Hypophagic effects of ammonium are greater when infused with propionate compared with acetate in lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 4, p. 1100-1104, Apr. 2003f.

ODLE, J.; SCHAEFER, O. M. Influence of rumen ammonia concentration on the rumen degradation rates of barley and maize. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 57, p. 127-130, 1987.

OVERTON, T. R. et al. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 1940-1951, July 1999.

OWENS, F. N.; BERGEN, W. G. Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical perspective, current understanding and future implications. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 57, n. 7, p. 498-518, July 1983.

OWENS, F. N. et al. Slow ammonia release from urea: rumen and metabolism studies. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 50, n. 3, p. 527-531, Mar. 1980.

PACHECO, D. et al. Ability of commercially available dairy ration programs to predict duodenal flows of protein and essential amino acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 2, p. 937-963, Sept. 2012.

PARKER, D. S. et al. Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 54, n. 2, p. 549-563, July 1995.

POOS, M. I.; BULL, L. S.; HEMKEN, R. W. Supplementation of diets with positive and negative urea fermentation potential using urea or soybean meal. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, n. 11, p. 1417-1426, Nov. 1979.

PROKOP, M. J.; KLOPFENSTEIN, T. J. **Slow ammonia release urea**. Lincoln: University of Nebraska, 1977. 218 p. (Nebraska Beef Cattle Report, EC 77-218).

RAGGIO, G. et al. Effect of casein and propionate supply on mammary protein metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 11, p. 4340-4351, Nov. 2006.

RAJALA-SCHULTZ, P. J. et al. Association between milk urea nitrogen and fertility in Ohio dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 482-489, Feb. 2001.

RATTENBURY, J. M.; JEACOCK, M. K.; SHEPHERD, D. A. L. Urea synthesis in the liver and REYKidney of developing sheep. **Biochimica Biophysica Acta**, Alberta, v. 630, p. 210-219, 1980.

RÉMOND, D. et al. Net flux of metabolites across the ruminal wall of sheep fed twice a day with or-chardgrass hay. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 9, p. 2529-2538, Sept. 1993.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 11, p. 4045-4064, Nov. 2005.

REYNAL, S. M. et al. Omasal flow of soluble proteins, peptides, and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal

degradabilities. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 4, p. 1887-1903, May 2007.

REYNOLDS, C. K. Metabolism of nitrogenous compounds by ruminant liver. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, n. 1, p. 850-854, Jan. 1992.

_____. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants in ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM RUMINANTS PHYSIOLOGY, 1., 1995, Stuttgart. **Proceedings...** Stuttgart: Verlag, 1995. p. 351-371.

REYNOLDS, C. K.; HUNTINGTON, G. B. Partition of portal-drained visceral net flux in beef steers: 1., blood flow and net flux of oxygen, glucose and nitrogenous compounds across stomach and post-stomach tissues. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 60, n. 1, p. 539-551, Jan. 1988.

REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN, N. B. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. E293-E305, 2008. Supplement.

ROBINSON, P. H. Rumen protein metabolism: predicting outflow. In: EASTERN NUTRITION CONFERENCE CANADIAN FEED INDUSTRY, 1., 1996, Ottawa. **Proceedings...** Ottawa: ENCC, 1996. p. 1-40.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I., ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SAINT-PIERRE, N. R. Invited review: integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 4, p. 741-755, Apr. 2001.

SAINT-PIERRE, N. R.; JONES, L. R. Interpretation and design of nonregulatory on-farm feeding trials. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 2, p. 177-182, 1999. Supplement.

SANTOS, F. A. P. et al. Effects of a rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 3182-3213, Dec. 1998.

SANTOS, J. F. **Respostas de vacas leiteiras à substituição parcial de farelo de soja por ureia encapsulada**. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SANTOS, J. F. et al. Response of lactating cows to the partial replacement of soybean meal by Optigen II or urea. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 490-490, 2008. Supplement.

_____. Resposta de vacas leiteiras à substituição parcial de farelo de soja por ureia encapsulada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, p. 423-432, 2011.

SATTER, L.; SLYTER, L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 32, p. 199-206, 1974.

SCHADT, I. et al. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 2, p. 485-491, Feb. 1999.

SHRIVER, B. J. et al. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 413-419, Feb. 1986.

SICILIANO-JONES, J.; DOWNER, J. Utility and safety of a slow-release nitrogen product: Optigen®1200. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOT INDUSTRIES, 21., 2005, Alltech. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2005. p. 241-248.

SINCLAIR, L. A. et al. The partial replacement of soya and rapessed meal with urea or a slow release urea source (Optigen) and its effect on intake, performance and metabolism in dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 203-203, 2008. Supplement.

SMITH, K. A.; FROST, J. P. Nitrogen excretion by farm livestock with respect to land spreading requirements and controlling nitrogen losses to ground and surface waters: part 1: cattle and sheep. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 173-181, 2000.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; SOEST, P. J. van. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II., carbohydrate and protein

availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3562-3577, Dec. 1992.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ames: Cornell University, 1994. 476 p.

SOEST, P. J. van; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct. 1991.

SOUZA, V. L. et al. Substituição parcial de farelo de soja por ureia protegida na produção e composição do leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1415-1422, 2010.

SPEARS, R. A.; KOHN, R. A.; YOUNG, A. J. Whole-farm nitrogen balance on western dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 12, p. 4178-4186, Dec. 2003.

STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE INSTITUTE. **SAS[®] user's guide: statistics**. Cary, 2004. Software.

STERN, M. D. et al. Effects of nonstructural carbohydrate, urea and soluble protein on microbial protein synthesis in continuous culture of rumen contents. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 47, n. 4, p. 944-956, Oct. 1978.

STERN, M. D.; HOOVER, W. H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, n. 6, p. 1590-1603, Dec. 1979.

STEWART, R. L. et al. Influence of Optigen on nitrogen behavior in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 491-491, 2008. Supplement.

SYMONDS, H. W.; MATHER, D. L.; COLLIS, K. A. The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 46, p. 481-486, 1981.

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 345-357, 1992.

_____. Protein degradation in the for estomachs of ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, n. 6, p. 1615-1630, Dec. 1979.

TAYLOR-EDWARDS, C. C. et al. Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 200-208, Sept. 2008.

TEMPELMAN, R. J. Assessing experimental designs for research conducted on commercial dairies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 1-15, Jan. 2009.

TIKOFISKY, J.; HARRISON, G. A. Optigen®II: improving the efficiency of nitrogen utilization in the dairy cow. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 1., 2007, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2007. 1 CD-ROM.

TYLUTKI, T. P.; FOX, D. G.; MCMAHON, M. Implementation of nutrient management planning on a dairy farm. **The Professional Animal Scientist**, Illinois, v. 20, n. 1, p. 58-65, Feb. 2004.

VALINOTE, A. C. et al. Optigen na beef-sacch in digestibility and degradability with high roughage diets. In: ANNUAL SYMPOSIUM, 21., 2005, Lexington. **Proceedings...** Lexington: University Lexington, 2005. 1 CR-ROM.

VARGAS, G.; ISHLER, V. Effets of Optigen® on milk production, N balance and diet cost in high production cows. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 24., 2008, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2008. 1 CD-ROM.

VIRTANEN, A. I. Milk production of cows on protein-free feed. **Science**, New York, v. 153, p. 1603-1614, 1966.

WISEK, W. J. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 51, n. 2, p. 286-295, 1984.

WALLACE, R. J. Rumen microbial metabolism of peptides and amino acids. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 126, n. 1, p. 1326S-1334S, 1996. Supplement.

WALLACE, R. J. et al. An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. **Nature**, London, v. 279, p. 424-426, 1979.

WESTWOOD, C. T.; LEAN, I. J.; KELLAWAY, R. C. Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: a quantitative review: part 2, effect of dietary protein on reproductive performance. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 46, p. 123-130, 1998.

WILDMAN, E. E. et al. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WILSON, G. et al. Evaluation of factors responsible for reduced voluntary intake urea diets for ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 41, p. 1431-1437, 1975.