

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À
SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE FARELO DE
SOJA POR UREIA ENCAPSULADA**

JUNIO FABIANO DOS SANTOS

2009

JUNIO FABIANO DOS SANTOS

**RESPOTA DE VACAS LEITEIRAS À SUBSTITUIÇÃO
PARCIAL DE FARELO DE SOJA POR UREIA ENCAPSULADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Marcos Neves Pereira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Junio Fabiano dos.

Resposta de vacas leiteiras à substituição parcial de farelo de soja por ureia encapsulada / Junio Fabiano dos Santos. – Lavras : UFLA, 2009.

66 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Balanço de nitrogênio. 2. Optigen ® II. 3. N-ureico no plasma.
4. N-ureico no leite. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.20885

636.2142

JUNIO FABIANO DOS SANTOS

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SUBSTITUIÇÃO
PARCIAL DE FARELO DE SOJA POR UREIA ENCAPSULADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 31 de julho de 2009

Prof. Euler Rabelo	UFLA
Prof. Flávio Marcos Junqueira Costa	UFLA
Prof. Renata Apocalypse Nogueira Pereira	UFLA

Prof. Marcos Neves Pereira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A minha família, pelo apoio integral

Aos meus avôs, José Pedro dos Santos e Rubens Monteiro, pelos ensinamentos

A minha avó, Nadir pelo exemplo de vida
Dedico

Agradecimentos

Ao Senhor Deus todo poderoso fonte de sabedoria, coragem e discernimento.

Ao Professor, Marcos Neves Pereira, pelos ensinamentos, pela dedicação e contribuição, exemplo de profissionalismo e amizade.

Aos meus pais, por acreditarem na minha capacidade.

Às minhas irmãs, pelo apoio incondicional.

A Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

Ao Grupo do Leite, pelo aprendizado e colaboração na condução do experimento. Especialmente ao Sancho, Luciene, Gilson, Naína, Ozana, Flávio, José Ricardo, Fernanda, Alexandre e Vitor.

Aos amigos da república Gospe Grosso e Márcia, pelo companheirismo.

Aos proprietários da Fazenda São Francisco: Renata e Flávio Neves.

Aos funcionários da Fazenda São Francisco: César, Daniel e Alexandre.

À Alltech Inc., pelo financiamento do projeto. Em especial ao Winston, Marcelo Manella e Fabiano Tavares.

A minha noiva, Tahiana, pela ajuda e compreensão.

À gerência da Cooperativa Agropecuária Castrolanda, pela cooperação.

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente para realização deste sonho.

MUITO OBRIGADO !

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Uréia como ingrediente alimentar para vacas leiteiras.....	03
2.2 Conversão de ureia em amônia no rúmen.....	04
2.3 Concentração de amônia no rúmen, digestibilidade e síntese microbiana.....	05
2.4 Suplementação nitrogenada e carboidratos da dieta.....	08
2.5 Absorção de N no rúmen e metabolismo hepático da amônia.....	09
2.6 Resposta em consumo e produção de leite ao uso de ureia.....	13
2.7 Mecanismo da depressão de consumo induzido por NNP.....	16
2.8 Utilização do Optigen® 1200.....	22
2.9 Utilização do Optigen® II.....	24
2.10 Balanço de N em vacas leiteiras.....	26
2.11 Consumo de N e volume urinário.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5 CONCLUSÕES.....	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.	34
TABELA 2 Desempenho de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.....	41
TABELA 3 Eficiências alimentares de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia).	42
TABELA 4 Proporção do consumo diário de matéria seca em períodos do dia e ingestão matinal de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia....	44
TABELA 5 Concentração de Nureico no plasma nos tempos após o oferecimento matinal de alimentos, tempo diário de NUP acima de 21 mg dL ⁻¹ (≥21) e frequência de valores de NUP acima de 22 mg dL ⁻¹ (Frequência)(de acordo com as novas regras , o trema não será mais usado) de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.	45
TABELA 6 Balanço de nitrogênio nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.....	49
TABELA 7 Volume urinário, alantoína (Alan) e creatinina (Creat) de vacas nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.....	50
TABELA 8 Digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Nitrogênio ureico no plasma de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.	46
FIGURA 2 Correlação entre teor de N ureico no leite (NUL) e o teor de N ureico no plasma (NUP) entre vacas nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Uréia.....	47
FIGURA 3 Correlação entre a excreção diária de alantoína e a relação entre alantoína e creatinina (A/C) na urina nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia).....	54

RESUMO

SANTOS, Junio Fabiano dos. **Resposta de vacas leiteiras à substituição parcial de farelo de soja por ureia encapsulada**. 2009. 66p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A substituição de proteína verdadeira por fontes de nitrogênio não-protéico (NNP) pode afetar a utilização de nutrientes e o desempenho de vacas leiteiras. Avaliou-se a substituição parcial de farelo de soja na dieta controle por uréia encapsulada (Optigen[®]II) ou por uréia. Dezoito vacas foram alocadas a uma seqüência dos três tratamentos em seis Quadrados Latinos 3x3, com períodos de 21 dias. O teor de proteína bruta nas dietas foi 15,5%, sendo 1,54% oriundo de Optigen[®]II e 1,59% oriundo de uréia. Nas dietas com NNP o teor de polpa cítrica desidratada foi maior que no Controle enquanto o teor de outros ingredientes foi similar, exceto o farelo de soja. A inclusão de NNP reduziu o consumo diário de matéria seca de 23,2 para 22,4 kg ($P=0,04$), sem afetar a produção de leite (31,5 kg, $P=0,98$). A conversão do alimento ingerido em leite tendeu a ser menor no Controle ($P<0,09$), enquanto a produção de leite por unidade de proteína ingerida foi aumentada pelo Optigen[®]II ($P=0,08$). As fontes de NNP aumentaram o teor de nitrogênio uréico no plasma duas horas após a alimentação da manhã ($P=0,06$). Entretanto, a frequência de nitrogênio uréico no plasma acima de 22,0 mg/dl foi maior com uréia ($P<0,01$, qui-quadrado), similarmente ao observado para o teor e secreção diária de nitrogênio uréico no leite ($P<0,01$). Não foi detectado efeito de tratamento sobre a proporção do nitrogênio ingerido retido ou excretado nas fezes, urina ou leite ($P>0,64$), sobre a excreção diária de alantoína urinária ($P=0,99$) ou sobre a digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total ($P>0,76$). A substituição de farelo de soja por fontes de NNP e polpa cítrica tendeu a melhorar a eficiência de conversão alimentar, sem afetar o balanço de nitrogênio.

Palavras chave: Balanço de nitrogênio, digestibilidade, Optigen

Comitê Orientador: Marcos Neves Pereira – PhD – UFLA (Orientador)
Nadja Gomes Alves – UFLA e Márcio Machado Ladeira –
UFLA.

ABSTRACT

SANTOS, Junio Fabiano dos. **Response of lactating cows to the partial replacement of soybean meal by encapsulate urea.** 2009. 66p. Dissertation (Master Program in Animal Science)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The substitution of true protein by non-protein nitrogen (NPN) sources may affect nutrient utilization and dairy cow performance. The partial substitution of soybean meal in a control diet by encapsulated urea (Optigen[®] II) or urea was evaluated. Eighteen cows were allocated to a sequence of the three treatments in six 3x3 Latin Squares, with 21-day periods. Diets crude protein content was 15,5%, being 1,54% from Optigen[®] II and 1,59% from urea. Diets containing NPN had greater dehydrated citrus pulp content than the Control and similar content of other ingredients, except soybean meal. The inclusion of NPN decreased the daily dry matter intake from 23.2 to 22.4 kg ($P=0.04$), without affecting milk yield (31.5 kg, $P=0.98$). The conversion of the consumed feed into milk tended to be smaller for the Control ($P<0.09$), while milk yield per unit of consumed protein was increased by Optigen[®] II ($P=0.08$). The NPN sources increased plasma urea nitrogen content two hours after the morning feeding ($P=0.06$). However, the frequency of plasma urea nitrogen above 22.0 mg/dL was greater with urea ($P<0.01$, qui-square), similarly to the observed for the daily secretion of milk urea nitrogen ($P<0.01$). There was no detectable treatment effect on the proportion of the consumed nitrogen retained or excreted with feces, urine or milk ($P>0.64$), on the daily excretion of urinary allantoin ($P=0.99$), or on the total tract apparent digestibility of nutrients ($P>0.76$). The substitution of soybean meal by NPN sources and citrus pulp tended to improve feed conversion efficiency, without affecting nitrogen balance.

Key words: Nitrogen balance, digestibility, Optigen

Guidance Committee: Marcos Neves Pereira – UFLA (Advisor), Nadja Gomes Alves – UFLA e Márcio Machado Ladeira – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A substituição de alimentos contendo proteína verdadeira por alimentos contendo maior teor de nitrogênio na forma de nitrogênio não-proteico (NNP), como a ureia, pode melhorar a eficiência financeira da alimentação, reduzir a necessidade de compra e estocagem de concentrados proteicos, e possibilita a formulação de dietas com maior inclusão ou de alimentos energéticos, ou de subprodutos fibrosos ou de forragens. Esta estratégia explora a capacidade de ruminantes de sintetizar proteína microbiana de alto valor biológico a partir de NNP.

Entretanto, a rápida hidrólise da ureia por ureases microbianas pode resultar em disponibilidade ruminal de N amoniacal em taxa superior à capacidade de síntese de proteína microbiana, resultando em perda excessiva de N do rúmen para o sangue (Lapierre & Lobley, 2001). Acima de 70% do N ingerido por vacas leiteiras pode ser perdido nas fezes e urina (Tamminga, 1992). Este fato é preocupante quando são considerados seus possíveis impactos negativos sobre o ambiente (Smith & Frost, 2000). Aumento excessivo no teor de N na forma de ureia e amônia no sangue e em tecidos também podem ter impacto negativo sobre a fisiologia animal (Butler, 1998).

No Optigen®II a ureia é fisicamente encapsulada por ceras vegetais, visando reduzir a velocidade de liberação do N no rúmen. Foram observadas tendências de aumento na síntese microbiana *in vitro* quando Optigen®II substituiu ureia (Harrison et al., 2006) e na produção de leite de rebanhos quando este alimento substituiu parcialmente o farelo de soja (Inostroza et al., 2009a). Entretanto, experimentos controlados com vacas em lactação avaliando o balanço de N e o teor de N no sangue quando Optigen®II substituiu farelo de soja são inexistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de vacas leiteiras em desempenho, balanço de nitrogênio e nitrogênio ureico no plasma (NUP) à substituição parcial e isoproteica de farelo de soja por Optigen®II e

polpa cítrica. A substituição de farelo de soja pela mesma quantidade de N oriundo de ureia e polpa cítrica também foi avaliada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ureia como ingrediente alimentar para vacas leiteiras

A possibilidade da utilização da ureia para ruminantes foi demonstrada por Loosli et al. (1949). Estes autores alimentaram ovelhas com dietas purificadas contendo ureia como fonte única N e observaram que a massa microbiana produzida possuía todos os aminoácidos essenciais exigidos por não ruminantes. Posteriormente, Bergen et al. (1967) demonstraram que o perfil de aminoácidos essenciais da massa microbiana independia da composição em aminoácidos da dieta ou se o N era suprido por proteína verdadeira ou NNP. Virtanen (1966) demonstrou a possibilidade de produzir leite com dietas isentas de proteína verdadeira. Este autor alimentou seis vacas leiteiras por quatro anos consecutivos com dieta purificada contendo ureia ou sais de amônia como única fonte de N, a produção de leite na lactação variou de 1932 a 4325 kg.

A substituição de proteína vegetal por NNP tem sido proposta como maneira de reduzir a competição entre humanos e animais por alimentos proteicos (Owens & Bergen, 1983). A utilização de NNP na forma de ureia adicionada a concentrados e como amônia em forrageiras ricas em fibra foram formas primordiais de utilização de NNP para ruminantes. Diretrizes para utilização de ureia não são recentes (Reid, 1953). Normas para utilização têm sido adotadas pela indústria de alimentos para vacas leiteiras, como a definição de limites máximos ao redor de 27% do N total da dieta, 3,0% do concentrado oferecido separadamente da forragem, ou 1% da matéria seca dietética total.

Estas recomendações foram geradas com base em experimentos realizados com vacas com produção diária de leite inferior a 20 kg e alimentadas com concentrados fornecidos separadamente da forragem. Este fato sugere que novas avaliações são pertinentes, já que o maior potencial produtivo dos rebanhos modernos e a adoção da mistura de todos os ingredientes dietéticos como prática alimentar em rebanhos, são fatores que induzem à necessidade de

novas recomendações. O desenvolvimento de processamentos industriais capazes de reduzir a velocidade de degradação da ureia no rúmen (Harisson et al., 2006) também suporta a re-avaliação de NNP na alimentação de vacas leiteiras.

2.2 Conversão de ureia em amônia no rúmen

A amônia, gerada dentro da célula microbiana por desaminação de aminoácidos ou resultado da hidrólise da ureia de origem alimentar, sanguínea, ou salivar, é um intermediário na síntese de proteína microbiana no rúmen (Huber & Kung Junior, 1981). A conversão da proteína dietética em amônia é realizada por vários microrganismos proteolíticos (Wallace, 1996). Apesar de algumas espécies de bactérias terem a capacidade de incorporar aminoácidos e peptídeos diretamente na proteína microbiana, cerca de 40 a 70% do N bacteriano passam pelo pool de amônia ruminal (Hristov & Broderick, 1994). Mensurações com isótopos marcados estimaram que a contribuição da amônia para o N bacteriano variou de 23 a 95%, dependendo do tipo de dieta e espécie bacteriana (Firkins et al., 2007).

Os protozoários não utilizam amônia para síntese proteica. Protozoários podem fagocitar partículas de proteína insolúvel, bactérias e fungos, e são importantes na regulação da reciclagem de proteína bacteriana e N no rúmen (Pfeffer & Hristov, 2005). A defaunação reduz a concentração de amônia no rúmen (Firkins et al., 2007). A principal ação dos protozoários no rúmen não é a hidrólise de proteína dietética, e sim a metabolização de proteína bacteriana.

A conversão de uréia em amônia é rápida no rúmen. O mecanismo enzimático é uma hidrólise simples por urease. A urease é associada à fração microbiana do fluido ruminal e é principalmente de origem bacteriana (Jones et al., 1964; Mahadevan et al., 1976). Bactérias anaeróbicas facultativas da parede ruminal parecem ser as mais importantes produtoras de urease *in vivo* (Cheng et

al., 1979). A descamação de células epiteliais para o conteúdo ruminal, e de bactérias da parede, parece ser suficiente para conferir atividade urealítica ao fluido (Wallace et al., 1979). Entretanto, populações de bactérias estritamente anaeróbicas, presentes em maior número no rúmen que a população de anaeróbicas facultativas da parede, mas com menor atividade de urease, também podem ter importância na conversão ruminal de ureia em amônia (Hobson & Wallace, 1982). Tem sido especulado que os microorganismos da parede seriam mais importantes na hidrólise da ureia fluindo do sangue para o rúmen, enquanto os microorganismos estritamente anaeróbicos atuariam prioritariamente sobre a uréia de origem alimentar e salivar.

A atividade de urease presente no conteúdo ruminal tem sido purificada e parece estar associada a um único polipeptídeo (Mahadevan et al., 1976). A atividade de urease no fluido ruminal é extremamente variável. Amônia pode deprimir a atividade da enzima (John et al., 1974; Cook, 1976; Wozny et al., 1977; Cheng & Wallace, 1979) e a presença de ureia parece ser indutora da atividade (Czerkawski & Breckenridge, 1982). Uma melhor compreensão da atividade desta enzima tem interesse prático, já que a maior desvantagem da uréia como fonte de NNP é sua quebra rápida, resultando em fluxo acentuado de amônia para o fluido ruminal e retenção ineficiente de N.

2.3 Concentração de amônia no rúmen, digestibilidade e síntese microbiana

A concentração de amônia no rúmen depende do catabolismo de proteínas, peptídeos, aminoácidos e NNP de origem alimentar ou endógena, e do anabolismo microbiano que sintetiza aminoácidos e proteína a partir da amônia. A concentração ótima de amônia no rúmen é definida como a menor concentração necessária para não deprimir a síntese de proteína microbiana e a degradabilidade ruminal da matéria orgânica, principalmente de carboidratos.

Sattler & Slyter (1974) demonstraram *in vitro* que caso a concentração ruminal de amônia esteja acima de 5 mg dl⁻¹ não deve ocorrer ganho adicional à suplementação com NNP, pois ocorreria acúmulo intrarruminal de amônia sem aumentar o crescimento microbiano. Entretanto, estes dados são frequentemente questionados, já que os fermentadores contínuos utilizados na pesquisa 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 ruminais *in vivo*. Além disto, 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.

Roffler & Satter (1975) sugeriram que a suplementação com NNP apenas em dietas com teor proteico abaixo de 13% e alta disponibilidade de energia fermentável no rúmen poderia ser efetiva. Estes autores geraram um modelo capaz de prever o teor de amônia no rúmen com base em teores dietéticos de PB e NDT em experimentos publicados ($R^2=0,92$). Teor de amônia no rúmen maior que 5 mg dl⁻¹ foi considerado excedente à capacidade de incorporação microbiana e resultaria em perda de N.

Wohlt et al. (1978) avaliaram a suplementação de farelo de soja ou uréia em dietas baseadas em silagem de milho e com teor proteico variando de 9 a 14,5% para vacas leiteiras. A média da concentração de amônia no fluido ruminal amostrado duas e sete horas após a primeira alimentação foi menor que 5 mg dl⁻¹ nas dietas com 9% e 12% PB, relacionado a queda de 3 a 8 unidades percentuais na digestibilidade da matéria seca.

Ruiz et al. (2002) avaliaram o efeito do teor dietético de N sobre o metabolismo ruminal de vacas leiteiras. Vinte e quatro vacas multíparas e 15 primíparas da raça Holandesa foram divididas em 13 blocos por ordem de parto, produção de leite e escore de condição corporal. Dentro de cada bloco uma vaca recebeu um de três tratamentos: 9,4, 11,1 ou 14,1% de PB na MS em dietas

contendo 0, 0,7 e 1,8% de uréia na MS, respectivamente. O teor dietético de silagem de grão úmido de milho foi 27,4% e de feno de gramínea foi 22,0%. A uréia substituiu parte da silagem de milho para atingir os teores proteicos nos tratamentos. A concentração média de amônia no rúmen em amostras obtidas a intervalos de três 3 horas por 48 horas foi 1,3, 4,5 e 10 mg dl⁻¹. O acréscimo de uréia aumentou o consumo de matéria seca de 16,8 para 19,9 e 20,0 kg d⁻¹ e a produção de leite de 15,5 para 18,8 e 21,7 kg d⁻¹. A adição de ureia aumentou as digestibilidades aparentes no trato digestivo total da matéria seca e da fibra em detergente neutro.

Boucher et al. (2007) avaliaram a adição de 0, 0,3, 0,6 e 0,9% de ureia na MS em dietas com 52% de forragem, sendo 61% da forragem oriunda de silagem de milho. As dietas foram oferecidas a vacas leiteiras com fistula no rúmen e duodeno. A dieta basal sem adição de ureia foi deficiente em 167 g de proteína degradável no rúmen por dia, conforme o National Research Council-NRC (2001). A concentração média de amônia no rúmen aumentou linearmente com a adição de ureia: 9,0; 11,9; 12,8 e 17,4 mg dL⁻¹. A máxima síntese de proteína microbiana ocorreu com 0,6% de ureia ($P < 0,01$ para o efeito quadrático de inclusão de ureia). A máxima síntese de proteína microbiana por unidade de matéria orgânica verdadeiramente fermentada no rúmen ocorreu com 0,3% de ureia ($P < 0,03$ para o efeito quadrático de inclusão de ureia). Entretanto, a adição de ureia não afetou a digestibilidade verdadeira no rúmen da MS, MO, FDN, FDA e do amido, provavelmente porque o teor de amônia no rúmen sem adição de ureia foi suficiente para não ser limitante da digestibilidade.

A substituição de farelo de soja por ureia a 1,9% na MS em dietas isoprotéicas, com 16,6% de PB na MS e alto teor de carboidratos não fibrosos aumentou o teor de amônia no rúmen de 8,29 para 10,9 mg dL⁻¹. Mas, o fluxo de N microbiano estimado pela excreção de derivados purínicos na urina não variou (Brito & Broderick, 2007).

2.4 Suplementação nitrogenada e carboidratos da dieta

Coppock et al. (1976) avaliaram a concentração de amônia ruminal em seis vacas Holandesas em quadrado latino 3x3 e alimentadas duas vezes ao dia com concentrado separadamente da forragem. Os concentrados continham 2% de ureia e 6,75% milho moído ou 8,75% de ureia incorporada a amido gelatinizado de sorgo. O consumo de ureia por alimentação foi 70 g. O concentrado com milho misturado à dieta completa fornecida uma vez ao dia, na relação 65% de silagem de milho e 35% de concentrado, formou o terceiro tratamento. O pico de amônia ocorreu 30 minutos após o fornecimento do concentrado nos dois primeiros tratamentos e 240 minutos após o oferecimento da dieta no terceiro tratamento. A concentração máxima de amônia no rúmen foi 44,5 mg dL⁻¹ quando ureia foi misturada ao concentrado, 36,2 mg dL⁻¹ quando incorporada ao amido e 15,0 mg dL⁻¹ na dieta completa.

Henning et al. (1993) avaliaram o sincronismo no metabolismo ruminal de nitrogênio e carboidratos em ovinos, por infusão contínua ou em pulsos de carboidratos solúveis e fontes de N, em arranjo fatorial 2x2. Os carboidratos utilizados foram um composto de seis partes de maltose, duas partes de dextrose e uma de maltodextrose. A fonte de N foi um composto de ureia e caseinato de sódio, na proporção 3:1 com base no conteúdo de N das fontes. Sincronismo entre os suprimentos de N e carboidratos não foram determinantes da síntese de proteína microbiana no rúmen. Entretanto, a infusão contínua de carboidratos aumentou o fluxo de proteína microbiana e o crescimento microbiano por unidade de matéria orgânica fermentada, sugerindo que um suprimento constante de substrato energético fermentativo pode ser mais efetivo para aumentar a síntese microbiana que a atuação sobre o sincronismo entre a degradação ruminal de N e carboidratos. A infusão contínua de carboidratos

também resultou em maior constância ao longo do dia no teor ruminal de amônia, comparativamente a infusão contínua das fontes de N.

Pfeffer & Hristov (2005) compilaram resultados de 26 trabalhos *in vivo* avaliando o efeito da suplementação com carboidratos sobre o metabolismo protéico. Em dezesseis trabalhos se observou queda na concentração de amônia no rúmen em resposta à suplementação com carboidratos, principalmente açúcares e amido. Entretanto, em somente oito trabalhos foi evidenciado aumento na síntese de proteína microbiana. Cabrita et al. (2006) concluíram com base em trabalhos *in vivo* que a formulação de dietas com o intuito de obter melhor sincronia entre a disponibilidade de N e a fermentação de carboidratos no rúmen não interferiram na eficiência da síntese de proteína microbiana.

2.5 Absorção de N do rúmen e metabolismo hepático de amônia

A amônia produzida no rúmen e não incorporada à proteína microbiana é absorvida pela parede. A forma não protonada da amônia (NH_3) é lipofílica e rapidamente absorvível por difusão simples a taxas linearmente relacionadas ao pH ruminal, quando este está acima de sete (Abdoun et al., 2007). Em pH ruminal igual ou inferior a 6,5 a amônia é absorvida predominantemente na forma protonada (NH_4^+), provavelmente via canais de potássio. A amônia é uma base fraca ($\text{pK}_a = 9,0$) e no pH do fluido ruminal prevalece a forma iônica (NH_4^+). Pela equação de Henderson-Hasselbalch, em pH 6,5 praticamente 99% da amônia encontra-se na forma ionizada.

Gustafsson & Palmquist (1993) alimentaram quatro vacas em lactação com dieta completa fornecida uma vez ao dia e com teor proteico entre 17 e 18%. O pico ureico no plasma (PUN) ocorreu entre 1,5 e 2 horas após o pico de amônia no rúmen, cerca de 3 a 4 horas após a alimentação. Vacas de maior produção apresentaram maior pico de amônia no rúmen e PUN.

Colovos et al. (1966) suplementaram quatro vacas Holandesas em delineamento do tipo quadrado latino 4x4 com 0, 1,25, 2,0 e 2,5% de ureia no concentrado, em substituição à proteína do farelo de soja. O teor protéico dos concentrados foi 17%, similar entre tratamentos. O concentrado foi fornecido duas vezes ao dia conforme a produção de leite dos animais e 2% do peso vivo foi fornecimento de feno de gramínea. Não houve diferença na produção diária de leite, em média 27,0 kg. O pico ruminal na concentração de amônia ocorreu 0,5 h após o consumo de concentrado, e foi 14,2, 17,6, 25,4 e 28,0 mg dL⁻¹, proporcionalmente ao teor de ureia no concentrado.

Pereira & Armentano (2000) alimentaram oito vacas em quadrado latino 4 x 4 com dietas completas oferecidas uma vez ao dia e variando em teor e origem da fibra. Três dietas continham 18% de silagem de alfafa e uma 36,3%. O fluido ruminal foi amostrado ao longo de 24 horas. O teor médio amônia no rúmen foi semelhante entre tratamentos, variando de 14,0 a 17,2 mg dL⁻¹. O momento de máxima concentração de amônia no rúmen ocorreu duas horas após a alimentação. Um segundo pico de amônia foi observado seis horas após a alimentação, quando os animais retornaram da ordenha e tiveram acesso à dieta.

Salvador et al. (2008) avaliaram a resposta de vacas leiteiras à substituição de milho moído por polpa cítrica. Duas dietas foram formuladas com 33% de polpa cítrica e duas dietas com 24% de polpa cítrica e 10% de milho moído. As dietas continham 40,4% de silagem de milho e 17,5% de PB. As dietas completas foram fornecidas duas vezes ao dia. Amostras de fluido ruminal foram obtidas a cada três horas por 24 horas. Picos na concentração ruminal de amônia ocorreram no mínimo 3 horas após o fornecimento da dieta, tanto no período da manhã quanto da tarde, entretanto um pico 9 a 12 horas após a alimentação matinal ocorreu na concentração ruminal de ácidos graxos voláteis, simultaneamente ao momento de mínimo valor de pH.

O teor de PUN pode não ser eficiente para prever o teor de amônia no plasma. Laven et al. (2007) avaliaram os teores plasmáticos de amônia e uréia em 42 vacas Holandesas com no mínimo dezesseis semanas em lactação. Os animais foram blocados em pares por dias em lactação e produção de leite e foram aleatoriamente alocados dentro de bloco a um tratamento: Controle ou 250 g de uréia por dia. As dietas completas foram fornecidas uma vez ao dia. Após três semanas de adaptação aos tratamentos, foram coletadas amostras de sangue 3 a 4 horas após a alimentação, semanalmente por 102 dias. A correlação entre o teor de uréia e teor de amônia no plasma foi baixa ($r = 0,195$).

A remoção líquida pelo fígado da amônia absorvida do rúmen e que chega ao sangue portal é praticamente total (Reynolds, 1995). Neste órgão a amônia é majoritariamente transformada em ureia ou utilizada para síntese de glutamina a partir de glutamato (Huntington & Archibeque, 1999).

O ciclo da ureia inicia-se na mitocôndria da célula hepática por duas reações. Na primeira a enzima carbamoil fosfato sintetase (CPS-1) condensa o dióxido de carbono com amônia formando carbamoil fosfato, com gasto de 2 moles de ATP. Posteriormente, o carbamoil fosfato liga-se a ornitina pela ação da ornitina transcarbamoilase (OTC) formando citrulina. No citosol celular a citrulina, aspartato e 1 mol de ATP formam arginosuccinato pela enzima arginosuccinato sintetase (ASS). O arginosuccinato é quebrado pela arginosuccinato liase (ASL) formando arginina e fumarato. A hidratação da arginina forma uréia e ornitina por ação da arginase (ARG-1). O fumarato é utilizado no ciclo do Krebs, gerando dois moles de ATP, o que resulta num déficit energético de 1 mol de ATP (Nelson & Cox, 2004).

O ciclo da ureia pode se alterar, através da adaptação enzimática do fígado, regulação lenta, quando submetidos altas concentrações de amônia (Pfeffer & Hristov, 2005). A ativação alostérica da CPS-1 por N-acetil glutamato (NAG) é determinante para regulação rápida do ciclo da ureia, sua

síntese no fígado depende da concentração de Acetil-CoA e glutamato mediado pela N-acetilglutamato sintetase que é ativada por acúmulo de arginina (Nelson & Cox, 2004).

Membranas celulares são muito permeáveis à forma não ionizada da amônia e pouco permeáveis a amônia na forma ionizada (Visek, 1984). A amônia é uma base fraca, comporta-se semelhantemente a um tampão em determinadas situações, sua forma de dissociação depende do pH do meio. Em condições fisiológicas o pH plasmático é de 7,4 e o pH intracelular 7,0. O pKa da amônia de 9,02 a 37°C, portanto, segundo a equação de Henderson-Hasselbach, o percentual de amônia não ionizada no plasma é ao redor 2,5%. A movimentação de amônia para o interior da célula, para igualar a concentração iônica à do sangue, resulta em acidificação do conteúdo intracelular (Visek, 1968).

Na intoxicação por amônia ocorre transtorno no metabolismo dos tecidos. A concentração de amônia intracelular pode ser 10 a 50% superior à concentração plasmática (Visek, 1984). A capacidade do fígado de sintetizar uréia a partir de amônia é superada quando o teor de amônia no rúmen excede 80 mg dL⁻¹ (Lewis, 1960). Sinais de toxicidade da amônia no sistema nervoso central ocorrem devido à depleção de α -cetogluturato interrompendo o metabolismo energético e síntese de ATP (Visek, 1984).

Com base em 315 determinações realizadas em bovinos em crescimento ou em lactação (Firkins & Reynolds, 2005) o aparecimento portal líquido de N amoniacal se correlacionou positivamente ao consumo de N. Fatores dietéticos determinantes da quantidade de amônia absorvida têm sido avaliados e incluem a quantidade e degradabilidade ruminal de fontes dietéticas e endógenas de N, bem como fatores relacionados à degradabilidade ruminal de carboidratos dietéticos (Parker et al., 1995; Tan & Murphy, 2004). É sabido que o uso de

amônia para síntese microbiana de proteína é dependente de energia (Delgado-Elorduy et al., 2002).

2.6 Resposta em consumo e produção de leite ao uso de ureia

A possibilidade de efeito negativo da ureia sobre o consumo de matéria seca tem sido relatada. Horn et al. (1967) revisaram 22 trabalhos onde houve substituição parcial de proteína verdadeira por ureia em dietas isoproteicas. Em quinze trabalhos houve queda na produção de leite comparativamente ao controle, devido à redução no consumo de concentrados. Poos et al. (1979) observaram que a substituição total de farelo de soja por ureia, em dietas baseadas em silagem de milho e feno de alfafa e com conteúdo de proteína bruta ao redor de 17%, reduziu 5,3 kg no consumo diário de matéria seca e 4,6 kg na produção de leite. Narasimhalu et al. (1980) também observaram queda no consumo em resposta a aumento no teor de uréia da dieta.

Brito & Broderick (2007) alimentaram dezesseis vacas leiteiras em quadrado latino 4x4. Quatro fontes protéicas foram avaliadas: 1,9% da MS de ureia, 12,1% de farelo de soja, 14% de farelo de algodão ou 16% de farelo de canola. Todas as dietas continham 16,6% de PB. A fonte predominante de carboidrato não fibroso oriundo do concentrado foi silagem de milho úmido. A inclusão de silagem de milho foi 35% da MS e a de silagem de alfafa 21%, em todos os tratamentos. A substituição de soja por ureia reduziu em 2,2 kg o consumo de matéria seca, em 7,1 kg a produção de leite e em 0,14 a relação entre a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e o consumo de matéria seca.

Baker et al. (1995) alimentaram quatro vacas em quadrado latino com dietas formuladas com o intuito de atuar sobre a disponibilidade de nitrogênio, estimada pelo modelo de Cornell. Uma dieta objetivou excesso de proteína degradável no rúmen (PDR) e déficit de proteína não degradável no rúmen

(PND), em outras duas se objetivou obter balanço adequado de PDR e PND e em uma quarta dieta se objetivou excesso de PDR e balanço de PND. As dietas continham 33% de silagem de milho e 16,9% de pré-secado de alfafa. O teor protéico foi ao redor de 15% nas três primeiras dietas. As fontes proteicas utilizadas foram farelo de soja, glúten de milho, farinha de sangue e farinha de peixe. O excesso de PDR foi obtido com adição de 1 e 1,2% de ureia na MS da primeira e última dietas. Não houve efeito de tratamento sobre o consumo, 21,7 kg em média, variando de 21,1 a 22,7, e a produção de leite, 30,2 kg em média, variando de 29,0 a 30,9.

Santos et al. (1998) revisaram 23 publicações onde houve substituição de concentrados proteicos por 0,4 a 1,8% da dieta total de ureia. A produção de leite foi 31,7 kg nas dietas com ureia e 33,3 kg naquelas contendo apenas concentrados proteicos. A inclusão dietética de ureia reduziu a produção de leite em três experimentos. O consumo não foi afetado em 17 experimentos e foi reduzido pela ureia em cinco experimentos.

O consumo e a produção de leite não foram afetados quando inclusões de 0, 0,5 e 1% de ureia no concentrado substituíram farelo de soja em dietas à base de silagem de milho e feno de gramínea (Cabrita et al., 2003). Estes autores utilizaram nove vacas em delineamento do tipo quadrado latino 3x3. A produção diária de leite foi ao redor de 34 kg. O tratamento com 1% de ureia induziu queda numérica de 1 kg na produção de leite relativamente ao tratamento sem ureia.

Boucher et al. (2007) avaliaram a adição de 0, 0,3, 0,6 e 0,9% de ureia da MS em dietas a base de silagem de milho. Quatro vacas em lactação foram utilizadas em delineamento do tipo quadrado latino 4x4. O consumo e a produção de leite não foram afetados pelos tratamentos, apesar da resposta numérica negativa de 3 kg de leite no tratamento com 0,3% de ureia, comparativamente aos outros tratamentos.

Reynal & Broderick (2005) estudaram o efeito do acréscimo de PDR na forma de uréia em vinte e oito vacas em delineamento do tipo quadrado latino. Os teores de PDR na dieta foram (% da MS): 10,6, 11,7, 12,3 e 13,2. Todas as dietas continham 37,1% de silagem de milho, 12,7% de silagem de alfafa e 32% de silagem de grão úmido de milho. O teor proteico das dietas foi 17,2, 17,7, 18,3 e 18,8%, obtido pela inclusão crescente de 0, 0,17, 0,33 ou 0,5% de ureia na MS, respectivamente. As outras fontes proteicas utilizadas foram o farelo de soja e o farelo de soja tratado com lignosulfonato. O consumo tendeu a redução pela inclusão de ureia: 25,4; 25,7; 25,7 e 25,1 ($P=0,17$). A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura apresentou uma tendência quadrática ($P=0,13$) de resposta negativa ao maior teor de ureia na dieta: 39,4; 40,2; 40,0 e 38,4 kg.

Poos et al. (1979) avaliaram a inclusão de ureia em seis vacas Holandesas delineadas em quadrado latino 3x3. Os tratamentos foram dieta controle com 8,6% de PB, dieta com ureia e 16,5% de PB e dieta com farelo de soja e 17% PB. O teor de forragens foi 46,4% de silagem de milho e 9,6% de feno de alfafa, sendo que as dietas foram oferecidas na forma de dieta completa. O pico de amônia no rúmen das vacas alimentadas com 3,7% de ureia na MS foi 34 mg de N-NH₃ por dL e na dieta com farelo de soja foi 20 mg por dL. O momento após alimentação de ocorrência do pico de amônia foi 2 horas nos dois tratamentos. A inclusão de uréia induziu queda de 4,6 kg no consumo comparativamente ao tratamento com farelo de soja.

Narasimhalu et al. (1980) avaliaram os efeitos do teor de ureia no concentrado e do momento de suplementação sobre a concentração sérica de amônia e ureia e o desempenho de vacas em lactação. Três grupos de nove vacas foram alimentados continuamente com um de três teores crescentes de ureia no concentrado: 0, 1,6% ou 2,3% da MS. Um concentrado basal foi formulado com cevada, farelo de glúten de milho e farelo de soja. Três outras misturas concentradas foram formuladas com farelo de trigo, milho, melão e ureia

visando obter os teores desejados de ureia no concentrado. Dentro de cada teor de ureia, as misturas com ureia foram oferecidas simultaneamente ao concentrado basal, duas horas após o oferecimento deste, ou quatro horas após, em reversão dentro do mesmo animal. A maior inclusão de ureia deprimiu o consumo de matéria seca de 2,71 para 2,35% do peso vivo e a produção diária de leite de 13,8 kg para 9,0 kg. Tanto a concentração sérica de amônia quanto a de ureia foram mais altas nas vacas recebendo o concentrado contendo ureia simultaneamente ao concentrado basal. A concentração sérica de aminoácidos essenciais foi maior quando a ureia foi fornecida quatro horas após o concentrado basal. A digestibilidade das dietas no trato digestivo total não diferiu entre tratamentos e a produção de leite não foi afetada pelo momento de administração da ureia.

2.7 Mecanismo da depressão de consumo induzida por NNP

Alta inclusão de ureia em concentrados pode reduzir o consumo por induzir queda na palatabilidade (Huber & Cook, 1972; Huber, 1975; Kertz et al., 1982). A adição de palatilizantes como melaço e polpa de beterraba em concentrados contendo alta inclusão de ureia para vacas leiteiras aumentaram o consumo voluntário de concentrado (Huber & Cook, 1972). Estes autores formularam concentrados por substituição total de farelo de soja por 3,5% de ureia. A adição de polpa de beterraba ao concentrado e a pré-mistura da ureia ao melaço e polpa de beterraba antes da adição dos outros ingredientes aumentaram o consumo de concentrado em 5,6 kg d⁻¹

Huber & Cook (1972) estudaram o efeito do local de administração da ureia sobre o consumo. Quatro vacas Holandesas receberam uma sequência de quatro tratamentos em quadrado latino 4x4 com períodos de 14 dias. Os tratamentos foram: Controle, ureia-oral, ureia-rúmen e ureia-abomaso. O teor proteico do concentrado no tratamento controle e ureia-oral foi 18%, e os teores

de ureia foram 1 e 3%, respectivamente. O teor proteico do concentrado nos tratamentos ureia-rúmen e ureia-abomaso foram 12,5% e o teor de ureia foi 1%. Os concentrados foram fornecidos *ad libitum* duas vezes ao dia e 5,4 kg de feno de alfafa foi fornecido pela manhã. A cada alimentação concentrada foi infundida uma solução a 5% de ureia diretamente no rúmen, no tratamento ureia-rúmen, ou no abomaso, no(na??) ureia-abomaso. A quantidade de ureia infundida correspondia a 1% do consumo de concentrado no tratamento ureia-oral, objetivando obter um consumo de ureia semelhante entre os tratamentos. A infusão de ureia no rúmen ou no abomaso não teve efeito adverso sobre o consumo diário de concentrado, similar ao tratamento controle, 12,6, 13,1 e 13,3 kg, respectivamente. No tratamento ureia-oral houve queda de 2,7 kg no consumo de concentrado, comparativamente ao controle. A depressão do consumo de concentrado contendo alta inclusão de ureia pode ser sido decorrente de baixa palatabilidade. A concentração de ureia e amônia no plasma não explicaram a variação no consumo.

Wilson et al. (1975) avaliaram dietas com 1%, 1,65%, 2,3% e 3,0% de uréia na matéria natural, em delineamento do tipo quadrado latino com períodos de 14 dias. As dietas com teor de ureia superior a 1% tiveram o excedente infundido diretamente no rúmen três vezes ao dia em solução aquosa 1:5. O aumento no teor dietético de ureia teve correlação negativa e linear com o consumo. O consumo diário de ureia foi 240 g quando a dieta continha 1% de ureia e 540 g na dieta com 3,0%, o consumo de matéria seca foi 24,0 e 18,7 kg, respectivamente. Posteriormente, duas vacas e dois garrotes Holandeses receberam tratamentos variando a ingestão de ureia também em quadrado latino: 1% de ureia, ou 3% de ureia, ou 1% de ureia acrescida de 2% infundido duas vezes ao dia no rúmen, ou 1% de ureia acrescida de 2% infundido ao longo do dia no rúmen. A ingestão total de ureia foi 194, 504, 249 e 456 g d⁻¹, respectivamente. A adição de ureia em quantidade superior a 1% da dieta

deprimiu o consumo, independentemente do método de fornecimento. Entretanto, a ureia administrada via infusão direta no rúmen deprimiu mais o consumo que a ingestão oral. A infusão ruminal de ureia duas vezes ao dia foi mais depressora do consumo que a infusão ao longo do dia. A maior diferença em consumo ocorreu nos primeiros 30 minutos após a alimentação, embora a queda de consumo fosse persistente ao longo do dia. O pico de amônia no rúmen ocorreu 1,5 h após a ingestão e o teor de ureia no sangue foi mais elevado nos tratamentos com 3% de ureia. Estes resultados sugerem que palatabilidade não é o único mecanismo pelo qual ureia pode induzir depressão no consumo.

Conrad et al. (1977) avaliaram o efeito da infusão intrarruminal de cloreto de amônio, lactato de amônio, uréia ou lactato de sódio em cabras. A infusão de sais de amônio e ureia reduziu o tempo diário de alimentação em 20 a 30%. A inclusão de ureia na dieta completa de vacas leiteiras a 1,3% na MS, em substituição ao farelo de soja, diminuiu o tempo da primeira refeição de 24,3 para 12,4 minutos e a duração das refeições de 3,2 para 1,8 minutos. Porém, o consumo diário não foi afetado, devido ao aumento do número de refeições de 17 para 23.

Chalupa et al. (1979) avaliaram o efeito da uréia sobre o comportamento alimentar de novilhas Holandesas. Duas dietas foram formuladas para conter 18% de farelo de soja ou 2,5% de uréia durante um período de 14 dias. Entre os dias 15 a 17 todos os animais receberam a dieta com farelo de soja. No dia 18 cada animal recebeu seu tratamento por duas horas, e o outro tratamento posteriormente por mais duas horas. A re-exposição à dieta com uréia causou aversão imediata, e nas duas horas subsequentes houve compensação do consumo na dieta com farelo de soja. A concentração de amônia no sangue três horas após a primeira alimentação foi 34% maior no tratamento com ureia. A taxa de ingestão foi menor nos animais com ureia, mas a frequência de ingestão foi maior.

Forero et al. (1980) avaliaram suplementos proteicos para vacas de corte formulados com 8,9% de ureia ou 10,9% de ureia de liberação lenta obtida por cobertura com gordura. As fontes de N avaliadas representaram 60% da PB do suplemento. Os outros ingredientes foram milho grão, feno de alfafa, casca de algodão e farelo de soja. Os suplementos foram oferecidos seis vezes por semana em cochos individuais por aproximadamente 30 a 45 minutos. O consumo de matéria seca de pastagem foi determinado utilizando marcadores internos e não diferiu entre tratamentos. A ureia de liberação lenta aumentou o consumo de suplemento de 300 para 506 g d⁻¹. As vacas suplementadas com ureia protegida perderam menos peso que as vacas alimentadas com ureia. A proteção da ureia resultou em queda numérica de 10 e 3 mg dL⁻¹ no teor de amônia no rúmen 1 e 4 horas após a alimentação, respectivamente.

Uma sequência de experimentos foi conduzida por (Kertz et al., 1982) para investigar o efeito da ureia no concentrado fornecido no momento da ordenha sobre o consumo de vacas em lactação. Estes autores observaram que uma solução de ureia pulverizada no cocho não interferiu sobre o consumo de concentrado sem ureia, sugerindo que odor não seria o determinante da queda de consumo induzida pela ureia. A rápida hidrólise da ureia no rúmen e a transferência da amônia para circulação periférica pode ser o fator primário na depressão no consumo. A infusão intrarruminal de uma solução de ureia antes da alimentação com concentrado sem ureia reduziu o consumo. Os autores sugerem que as vacas estariam sujeitas a toxicidade subletal da amônia. A rápida hidrólise da ureia em amônia no rúmen, sob condições de pH ruminal próximo da neutralidade, poderia favorecer a absorção da amônia não ionizada pela parede. Neste caso a capacidade de ureagênese hepática poderia ser excedida levando a acúmulo de amônia no plasma (Symonds et al., 1981).

Noda (1976) avaliaram a infusão de cloreto de amônia ou cloreto de sódio no cérebro de ratos. Trinta minutos após a infusão os ratos tiveram acesso

a uma dieta comercial e o consumo foi mensurado por dois dias. A infusão da solução de cloreto de amônia deprimiu o consumo em 32% comparativamente ao consumo cinco dias após a infusão, enquanto a queda de consumo com a infusão de cloreto de sódio foi de apenas 6,7%, evidenciando o possível efeito negativo da amônia sobre o consumo, mediado pelo sistema nervoso central.

Kertz et al. (1983) infundiram 107 ou 178 g cloreto de amônia no rúmen de quatro vacas Holandesas. As vacas foram alimentadas com concentrado fornecido separadamente da forragem duas vezes ao dia. Os autores argumentaram que pH ruminal abaixo de 6,0 impediu a rápida absorção da amônia pelo epitélio do rúmen, prevenindo a depressão de consumo. Por este mecanismo, a suplementação com NNP poderia ser direcionada para os momentos de baixo pH ruminal ao longo do dia, caso depressão de consumo seja uma resposta não desejável.

A amônia também pode induzir menor absorção de metabólitos por dano no tecido intestinal (Visek, 1968) ou redução na motilidade do rúmen. Juhász (1965) monitorou a motilidade ruminal em ovelhas fistuladas no rúmen e alimentadas com feno e concentrados. A infusão de 0,4 g por kg de peso vivo de cloreto de amônio reduziu o número de contrações por minuto e a duração das contrações. A infusão de acetato de sódio não afetou a motilidade, enquanto acetato de amônio reduziu e foi associado a aumentou na concentração de amônia no rúmen e no teor de ureia no sangue. Itabisashi (1977) infundiu em taxa constante uma solução de acetato de amônio no sangue de quatro cabras Saanen. Tanto a infusão de amônia no sangue quanto pulsos intrarruminais de uréia via cânula causaram paralisia da motilidade do rúmen. Juhász & Szegedi (1983) infundiram acetato de amônia na veia jugular e na artéria carótida comum de seis ovelhas. O teor de amônia antes da infusão na veia jugular foi 0,09 mM. Após nove minutos de infusão o teor aumentou para 0,6 mM, cerca de 10 vezes a concentração inicial. A motilidade do rúmen cessou após 6 a 8 minutos da

infusão e após 15 minutos foi restaurada. A infusão do acetato de amônio na carótida comum por nove minutos cessou a motilidade do rúmen após 4 a 6 minutos e as contrações do rúmen foram fracas e atípicas por 20 a 25 minutos.

Oba & Allen (2003b) avaliaram o efeito hipofágico da amônia e do propionato. Os tratamentos foram: AGV (acetato ou propionato) e sais (sódio ou amônio), em arranjo fatorial 2x2 de tratamentos. Oito vacas Holandesas foram utilizadas em delineamento do tipo quadrado latino 4x4. A infusão intrarruminal dos tratamentos se iniciou duas horas antes da alimentação e foi finalizada 12 horas após a alimentação. O total de amônia infundida por 14 horas foi equivalente a 1,2 kg de PB. O consumo em 12 horas no tratamento propionato e amônio foi 4,3 kg e no tratamento propionato e sódio foi 12,1 kg. O consumo com acetato de amônio foi 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 alimentação também foi reduzido de 135 para 55 minutos.

Em outro experimento com protocolo similar, Oba & Allen (2003a) infundiram uma quantidade de amônia equivalente a 0,875 kg de PB. Os tratamentos foram ácido propiônico, propionato de amônio, propionato de potássio, ou propionato de sódio. A infusão de propionato de amônio reduziu o consumo comparado a propionato de sódio ou potássio: 11,0, 14,0 e 13,9 kg, respectivamente. O número de refeições em 12 horas foi 5,6 com propionato de amônio, 8,0 com propionato de sódio e 7,2 com propionato de potássio. O intervalo entre refeições também foi aumentado, sendo 105, 62,8 e 73,9 minutos, nos mesmos tratamentos, respectivamente, sem ocorrer efeito sobre a duração das refeições. O teor de amônia no plasma após a infusão não foi mensurado em ambos os experimentos.

A infusão de acetato de amônio no sangue de vacas leiteiras causou redução de 20% na produção de leite, de proteína e de lactose (Purdie et al.,

2009). O consumo foi numericamente menor em 0,6 kg após dez horas da infusão do acetato de amônio comparado a acetato de sódio. A concentração de amônia no sangue arterial foi 193 e 41 μM . A hiperamonemia reduziu a concentração arterial de aminoácidos essenciais como lisina e treonina dez horas após a infusão, mas não afetou a captação de aminoácidos e intermediários energéticos pela glândula mamária, com exceção do acetato.

2.8 Utilização do Optigen® 1200

O Optigen® 1200, um produto contendo ureia de baixa degradabilidade ruminal, foi lançado comercialmente em 2005 pela Alltech (Alltech Inc, Nicholasville, EUA). Neste produto a proteção da ureia ocorre por barreira física por polímero inerte no trato gastrointestinal. A liberação da ureia solúvel em água ocorre por meio de poros na camada de polímero que envolve a ureia, que é de espessura variável entre grânulos (Siciliano-Jones & Downer, 2005).

A degradabilidade ruminal *in situ* do N no Optigen® 1200 foi similar à degradabilidade do N no farelo de soja (Akay et al., 2004). Nas primeiras três horas de incubação ruminal o N no Optigen® 1200 teve degradação superior ao N no farelo de soja, porém a taxa de desaparecimento foi menor entre três e dezesseis horas. O N na uréia teve degradação rápida no rúmen, sendo totalmente degradado com uma hora de incubação.

A digestibilidade de nutrientes em uma dieta contendo 0,66% de Optigen® 1200 foi avaliada em fermentadores contínuos, comparativamente a uma dieta controle (Akay et al., 2004). A inclusão de Optigen® 1200 aumentou a digestibilidade da FDA em 16,6 unidades percentuais, aumentou a digestibilidade da FDN em 6,8%, e aumentou a digestibilidade da matéria orgânica em 8%. O ganho de digestão pode ser explicado pelo aumento observado de 6% na síntese microbiana.

Akay et al. (2004) realizaram duas avaliações de Optigen[®] 1200 em rebanhos comerciais, um com 122 vacas e outro com 240 vacas. No primeiro experimento o farelo de soja e a ureia foram substituídos, na dieta de controle, por Optigen, farelo de trigo e milho moído. Os animais foram blocados em dois grupos por dias em lactação, ordem de parto e produção de leite no início do experimento. Os dois grupos receberam a dieta controle por 30 dias. Posteriormente, a dieta experimental com Optigen[®] 1200 foi fornecida por 40 dias. A produção de leite foi mensurada diariamente e no décimo quarto dia foi coletada uma amostra para determinação do teor de sólidos. As observações diárias foram analisadas como medidas repetidas no tempo pelo Proc Mixed do SAS. O Optigen[®] 1200 aumentou a produção de leite de 37,9 para 41,6 kg. No segundo experimento, a dieta controle foi fornecida por 15 dias e o Optigen[®] 1200 por 30 dias, o delineamento utilizado foi similar ao primeiro experimento. O consumo médio do grupo foi medido diariamente por diferenças entre o oferecido e as sobras no cocho. O consumo foi analisado com medidas repetidas ao longo do tempo. A substituição parcial de farelo de soja por Optigen, milho moído e silagem de milho reduziu o consumo em 0,9 kg, sem afetar a produção de leite. A eficiência alimentar aumentou em 4,2% na dieta com Optigen[®] 1200.

Galo et al. (2003) avaliaram a substituição de farelo de soja e ureia por milho moído e Optigen[®] 1200 a 0,77 % na MS, em duas dietas com teor proteico de 16 ou 18%. A dieta controle com farelo de soja e ureia continha 18% de PB. Não foi detectado efeito de tratamento sobre o consumo e os teores de gordura e proteína no leite. A produção de leite foi maior nos tratamentos com 18% de PB. A produção de leite por unidade de proteína consumida foi 0,5 kg maior no tratamento com 16% de PB e Optigen[®] 1200. A excreção de derivados purínicos na urina e o balanço de N não diferiram entre tratamentos.

Siciliano-Jones & Downer (2005) avaliaram a segurança da utilização do Optigen[®] 1200 por simulação de uma overdose de Optigen[®] 1200. O máximo

consumo de Optigen[®] 1200 foi de 675 e 788 g por dia, associado à queda de 25% no consumo de matéria seca. Porém, não houve sinais de intoxicação por amônia, tetania, dificuldade respiratória, timpanismo, salivação excessiva, anorexia ou letargia. A recomendação máxima de consumo diário de Optigen[®] 1200 por animal foi 360 g.

Catareto (2007) avaliou a substituição da proteína do farelo de algodão por NNP em dietas baseadas em silagem de milho. Os tratamentos foram: Controle com 100% da PB oriunda de farelo de algodão, Ureia como 30% de substituição da PB, Optigen[®] 1200 como 30% de substituição da PB e Optigen[®] 1200 como 60% de substituição da PB. Foram utilizadas 32 vacas em quadrados latinos 4x4. Houve queda na produção de leite de 20,2 para 19,0 kg quando Optigen[®] 1200 substituiu 60% da PB do farelo de algodão. O consumo foi reduzido em 1,9 kg pela uréia comparativamente ao tratamento onde Optigen[®] 1200 também substituiu 30% da PB no farelo de algodão.

2.9 Utilização do Optigen[®] II

O Optigen[®] II, diferentemente do Optigen[®] 1200, é uma ureia de liberação lenta onde a ureia é protegida fisicamente por ceras vegetais. Harrison et al. (2006) utilizaram 12 fermentadores contínuos de fluxo simples para avaliar quatro dietas: ureia a 0,20% da MS, ureia a 0,48%, Optigen[®] II a 0,22% e Optigen[®] II a 0,55%. O teor proteico das dietas foi 18%, os teores de silagem de milho mais feno de alfafa foi 50%. Houve aumento na produção de N bacteriano em gramas por dia e na eficiência de síntese microbiana quando Optigen[®] II substituiu completamente a ureia.

Vargas & Ishler (2008) avaliaram o efeito da substituição de 0,9 kg do farelo de soja tratado com calor e 0,5 kg de farelo de canola por 112 gramas Optigen[®] II na MS. A dieta controle continha 50% de forragem e 16% de PB e a dieta com Optigen 53% de forragem e 15,5% de PB. Houve tendência de

aumento na produção de leite de 1,15 kg com Optigen®II ($P=0,11$). A concentração de N-ureico no leite foi 9,83 mg dL⁻¹ no tratamento com Optigen®II e 8,64 no Controle.

A substituição parcial de nitrogênio oriundo de farelo de soja por 0,4% da dieta de Optigen®II não reduziu a produção de leite de vacas consumindo dietas com 18% de PB (Souza et al., 2009). A substituição de ureia por Optigen®II em fermentadores contínuos não afetou a o perfil de fermentação ou a síntese microbiana em dietas diferindo no perfil de carboidratos, quando a inclusão de NNP foi equivalente a 114 g em uma vaca hipotética consumindo 22,7 kg de matéria seca por dia (Harrison et al., 2009).

Inostroza et al. (2009a,b) avaliaram a substituição parcial de farelo de soja por Optigen em dezesseis rebanhos comerciais do Wisconsin. A inclusão de Optigen nas dietas foi de 114 g/vaca em dietas isoproteicas, o espaço de formulação criado pela substituição de N de soja por N de Optigen foi preenchido por milho moído ou silagem de milho, segundo critério do nutricionista atuando em cada rebanho. O teor de forragem nas dietas foi 56±3% e o de silagem de milho foi 43±9%. Cada rebanho recebeu o tratamento Controle ou o tratamento com Optigen por 30 dias, seguido pelo outro tratamento durante o mesmo período, em delineamento de reversão simples. Fazenda foi utilizada como variável aleatória no modelo estatístico, também contendo os efeitos fixos de período, sequência e tratamento. A substituição de farelo de soja por Optigen e milho ou silagem de milho aumentou a produção diária de leite de 35,4 para 35,9 kg e o conteúdo de NUL de 12,4 para 13,2 mg dL⁻¹. Baseado na simulação econômica realizada pelos autores, a inclusão de Optigen, cotado a US\$1,63/kg, só reduziu o custo quando silagem de milho foi acrescida à dieta.

2.10 Balanço de N em vacas leiteiras

O uso do N oriundo de forragens e concentrados para produção de leite é acompanhado por perdas de N nas fezes e na urina. Adicionalmente ao N de origem alimentar, N também flui para fazendas leiteiras na forma de fertilizantes e poluição atmosférica (Tamminga, 1992). A excreta de bovinos é uma fonte de uréia, que devido à presença de urease no ambiente, é rapidamente convertida em amônia. Em condições aeróbicas, como as existentes na superfície dos solos, amônia é rapidamente convertida em nitrato pela nitrificação. Nas condições anaeróbicas presentes nas camadas mais profundas do solo, nitrato é convertido em N_2 gasoso e tóxico pela desnitrificação. Esta última conversão também pode induzir escape para o ar de intermediários como NO, NO_2 e N_2O , sendo o último particularmente danoso à camada de ozônio. Parte do nitrato pode ir para a água subterrânea, tornando-a menos adequada para consumo humano. Problemas adicionais ocorrem quando amônia escapa e é transportada pelo ar para locais onde não é desejada, como áreas de floresta em solos relativamente pobres.

Marini & Amburgh (2005) estudaram a excreção de N pelas fezes e urina em novilhas Holandesas alimentadas a 1,8 vezes a manutenção. As dietas foram isoenergéticas e baseadas em 30% de feno e 70% de concentrados. O teor de N no concentrado foi 1,44 ou 3,42 % da MS. O aumento no teor de N do concentrado resultou em aumento de 100 g a excreção de N urinário, sem afetar a perda fecal. A proporção do N ingerido excretado pelas fezes caiu de 70 para 30%, enquanto a excreção urinária aumentou de 30 para 70%. A excreção de uréia na urina foi linearmente proporcional ao conteúdo de N da dieta. Ambientalmente, maior proporção de perda urinária de N é indesejável, pela rápida conversão da ureia em amônia e óxido nitroso.

O manejo nutricional pode ser uma ferramenta no controle da poluição ambiental causada por bovinos. Aproximadamente 75 a 85% do N ingerido por vacas leiteiras podem ser perdido nas fezes e urina (Tamminga, 1992). A

retenção de N é a diferença entre o N consumido e o N excretado nas fezes e urina mais o N incorporado em produtos animais como o leite. A eficiência de utilização do N para produção de leite também pode ser avaliada pela relação entre o N secretado no leite (proteína do leite) e o N consumido por dia. Apesar de simples, pois contabiliza indistintamente todo o N presente no leite, esta variável tem alto uso prático, já que pode ser avaliada mesmo quando a produção de fezes e urina não foi mensurada.

Foi relatado por Tamminga (1992) que o fluxo de N para o leite relativamente ao N total ingerido gira ao redor de 19% para uma vaca da raça Holandesa produzindo 6250 kg de leite por ano nas condições da Holanda. O N fecal como proporção do N ingerido foi de 28,6%, o N urinário foi de 50,3% e ao redor de 2,3% do N ingerido retido nos tecidos.

Castillo et al. (2001) avaliaram quatro tipos de concentrado para vacas Holandesas consumindo 9,1 kg de MS de silagem de pré-secado de azevém e 7 kg de MS de concentrado por dia. Os concentrados avaliados foram: alto teor de fibra oriunda de farelo de trigo, alto teor de amido de degradação lenta oriundo de milho moído, alto teor de amido de degradação rápida oriundo de grãos de cevada e trigo e alto teor de açúcares solúveis oriundos de melaço e polpa cítrica. Todos os concentrados continham 16% de PB na MS. A inclusão de amido de alta degradação aumentou a perda de N na urina em 36 g comparado aos outros concentrados. Não houve diferença na incorporação do N ingerido no leite, em média 27,7%. A quantidade de N retido variou de 47,9 a 9,9 g, e a proporção do N ingerido que foi retido variou de 13,3 a 2,4%.

Ruiz et al. (2002) avaliaram o efeito da inclusão de ureia na dieta sobre o balanço de N em vacas leiteiras. Os tratamentos foram 9,4, 11,1 e 14,1% PB na MS com 0, 0,7 e 1,8% da MS de ureia, respectivamente. O aumento no teor de PB da dieta por adição de uréia resultou em perda fecal de N como sendo 48,5, 38,9 e 29,4% do ingerido, respectivamente, enquanto a perda urinária foi

5,7, 14,3 e 29,7%. Aumento no teor de N da dieta aumentou a importância da perda urinária. Entretanto, a eficiência de utilização do N para produção de leite foi em média 24,1%, praticamente constante entre tratamentos. O balanço (ou retenção) de N foi diretamente proporcional ao teor de PB na dieta: 27,3, 75,1, e 87,6 g d⁻¹.

Wattiaux & Karg (2004) alimentaram 48 vacas Holandesas produzindo 47,7 kg de leite com 41,2% de silagem de alfafa e 13,8% de silagem de milho ou 13,8% de alfafa e 41,2% de milho em arranjo fatorial de tratamentos com alto ou baixo teor de proteína degradável no rúmen. O teor proteico das dietas variou de 16,2 a 18%. Houve substituição parcial de farelo de soja por 0,5% de ureia nas dietas com alta inclusão de silagem de milho. O milho moído foi o principal ingrediente energético nas dietas, 28,4 e 14,2% nas dietas com maior e menor inclusão de silagem de alfafa. A proporção do N ingerido incorporado no leite foi 28,2% nas dietas com maior proporção de silagem de alfafa e 33,4% nas dietas com maior proporção de silagem de milho. O aumento no teor proteico reduziu a eficiência de incorporação do N no leite somente nas dietas a base de silagem de alfafa. A retenção aparente e a perda fecal de N foram maiores nas dietas a base de alfafa, 53,5 e 212 g. Nas dietas a base de silagem de milho a retenção foi 23 g por dia e a perda urinária de N como percentagem do ingerido foi 3 pontos percentuais maior.

Chase (2008) avaliou a eficiência de utilização do N para produção de leite em 334 tratamentos oriundos de 62 experimentos. A eficiência média foi de 27%, variando de 16,2 a 45,2%. Valores superiores a 35% foram associados a dietas com baixo teor proteico, capazes de induzir queda na produção de leite.

Kalscheur et al. (2006) avaliaram o efeito do aumento no teor PB da dieta obtido por maior inclusão de farelo de soja sobre a eficiência de utilização do N. Teores crescente de farelo de soja de 0, 5,2, 10,4 e 15,6% em substituição parcial ao milho moído e soja protegida (Soy Pass, Lignotech USA, Rothschild,

WI) resultaram em dietas com teores proteicos de 12,3, 13,9, 15,5 e 17,1% da MS. O teor de ureia na dieta foi 0,5% da MS em todos os tratamentos. A eficiência de utilização do N para produção de leite caiu de 36,5% para 28,2% e a produção de leite aumentou de 31,7 para 33,8 kg d⁻¹ pela adição de 15,6% de farelo de soja na MS. Na dieta com 15,5% de PB a proporção do N ingerido incorporado no leite foi 30,4% e as vacas produziram 33,1 kg de leite.

Cabrita et al. (2003) avaliaram a inclusão de 1% da MS de ureia em substituição parcial ao farelo de soja. O teor de PB na dieta com ureia foi de 17,5% e de 16,8% na dieta controle. A eficiência de utilização do N para produção de leite foi 28% na dieta com ureia e 30% no controle. A produção diária de proteína no leite não foi afetada pelos tratamentos. Boucher et al. (2007) também observaram queda na eficiência de utilização do N para produção de leite de 32; 27; 28 e 25% quando teores crescentes de ureia foram acrescentados à dieta, 0; 0,3; 0,6 e 0,9% de ureia, contendo 14,9; 15,7; 16,5 e 17,3% de PB na MS, respectivamente. A composição das dietas em ingredientes foi a mesma, exceto adição de ureia.

A inclusão de 0,37% de uréia em dieta de vacas leiteiras na fase inicial de lactação aumentou o teor proteico de 16,8 para 17,2% da MS e diminuiu o teor proteína não degradável no rúmen (Davidson et al., 2003). A inclusão de uréia aumentou a perda de N na urina em 41 gramas e o percentual do N ingerido como perda urinária em 2,9%.

Olmos-Colmenero & Broderick (2006) alimentaram vacas em lactação com dietas contendo 13,5; 15,0; 16,5; 17,9 e 19,4% de PB na MS, pela adição de 2,4; 5,8; 9,2; 12,6 e 16,0% de farelo de soja na MS em substituição ao milho úmido amassado. O restante dos ingredientes foi idênticos entre as dietas, 25% de silagem de alfafa, 25% de silagem de milho, 2,5% de soja tostada e 1,1% de minerais e vitaminas. A eficiência de utilização do N para produção de leite

caiu linearmente de 36,5% para 25,4% com aumento no teor dietético de N. A produção máxima de leite foi 36,7 kg d⁻¹, obtida com 16,5% de PB na dieta.

Brito & Broderick (2007) avaliaram diferentes fontes proteicas: ureia, farelo de soja, farelo de algodão e farelo de canola. As dietas foram isoproteicas e com 16,5% de PB na MS, continham o mesmo teor de forragem e o principal carboidrato não fibroso foi milho úmido. A substituição de farelo de soja por 1,9% da MS de ureia reduziu a eficiência de utilização do N para produção de leite de 30,4 para 24,9% e aumentou a proporção do N ingerido excretado na urina de 22,4 para 32,4%. Neste trabalho o volume de urina foi estimado a partir da concentração de creatinina na urina e um valor de excreção diária de creatinina, assumido como uma constante proporcional ao peso vivo.

Poos et al. (1979) substituíram totalmente farelo de soja por 3,7% de ureia na MS da dieta. O teor proteico da dieta com soja foi 16,5% e da dieta com ureia 17,1%. A perda urinária de N aumentou em 47 g por dia com o uso da ureia, resultando em queda na retenção de N de 80 para 34,7 g d⁻¹. Posteriormente, o balanço de N foi avaliado em dietas contendo 15,2% de PB na MS. A substituição parcial de farelo de soja por 1,2% de ureia na MS não afetou a retenção de N, -6,6 e 26,7 g d⁻¹, e a excreção de N na urina, 176,8 e 145,5 g d⁻¹, respectivamente.

Em dietas com 18% de PB, a substituição de farelo de canola a 4% da MS por 0,77% da MS de Optigen[®] 1200 não afetou a retenção de N, mas aumentou de 38,2% para 44,7% a proporção do N ingerido excretado pela urina (Galo et al., 2003). A proporção do N ingerido excretado nas fezes foi 20,7% com Optigen[®] 1200 e 33,9% no controle. A forma do N pode afetar a rota de excreção, sem determinar a retenção do N nos tecidos. A infusão de acetato de amônio no intestino de vacas Holandesas não afetou a retenção de N, mas aumentou o N excretado na urina de 220 para 260 g d⁻¹ (Moorby & Theobald, 1999).

Castillo et al. (2000) compilaram dados de 90 tratamentos representando 580 vacas com produção inferior a 35 kg d⁻¹. A redução do teor protéico da dieta de 20 para 15% pode diminuir a excreção de N nas fezes em 21% e na urina em 66%. A excreção de N na urina aumentou exponencialmente quando o consumo diário de N excedeu 400 g d⁻¹.

2.11 Consumo de N e volume urinário

O impacto do consumo de N sobre o volume urinário tem sido avaliado, já que conhecer o volume urinário é importante ambientalmente (Nennich et al., 2006). Reynal & Broderick (2005) encontraram decréscimo no volume urinário de 22,3 para 17,9 L d⁻¹ e na excreção de N na urina de 295 para 239 g d⁻¹ quando o teor dietético de ureia foi reduzido de 0,5 para 0,17% da MS. A eficiência de utilização do N para produção de leite não diferiu entre tratamentos.

Maior consumo de N por ruminantes aumenta a ingestão de água, e consequentemente o volume de urina eliminado no ambiente (Church, 1979). Olmos-Colmenero & Broderick (2006) encontraram aumento linear no volume urinário de 17,3, 15,4, 17,9, 19,4 e 21,7 litros d⁻¹ com aumento no consumo diário de N de 483, 531, 605, 641 e 711 g d⁻¹, respectivamente. O teor protéico das dietas foi 13,5, 15,0, 16,5, 17,9 e 19,4% na MS. Bannink et al. (1999) encontraram uma alta correlação ($r = 0,70$) entre o consumo de nitrogênio e potássio e a produção de urina. Wattiaux & Karg (2004) observaram que a redução no teor de PB da dieta de 18,0 para 16,2% reduziu 4,5 L no volume de urina e a excreção de N urinário em cerca de 40 g.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito vacas da raça Holandesa, com 150 ± 82 dias em lactação no início do período experimental, formaram seis grupos de três animais com base na ordem de parto e produção de leite. Dois grupos foram formados por primíparas. Dentro de cada grupo, as vacas foram aleatoriamente alocadas a uma seqüência de três tratamentos, em delineamento do tipo quadrado latino 3x3, conduzidos simultaneamente, e com períodos de 21 dias. Mensurações foram realizadas na terceira semana de cada período experimental. Os tratamentos foram: dieta com farelo de soja como concentrado protéico (Controle) e dietas onde misturas isoproteicas de polpa citrúca e Optigen®II (Alltech Inc., Nicholasville, USA) ou ureia substituíram o mesmo teor dietético de farelo de soja (Tabela 1).

TABELA 1 Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes nos tratamentos Optigen®II, Controle e Ureia.

	Optigen®II	Controle	Ureia
	% da matéria seca		
Silagem de milho	41,9	41,9	41,9
Feno de tifton	1,9	1,9	1,9
Polpa cítrica	15,9	12,6	16,0
Caroço de algodão	7,6	7,6	7,6
Optigen®II	0,61		
Ureia			0,56
Farelo de soja (46,4% PB na MS)	14,1	18,0	14,1
Milho maduro moído fino	14,2	14,2	14,2
Premix ¹	3,9	3,9	3,9
Proteína bruta	15,4	15,5	15,6
Proteína bruta oriunda de NNP	1,54		1,59
FDN total	36,1	35,9	36,6
FDN oriundo de forragens	23,5	23,5	23,5
Cinzas	7,2	7,2	7,2
Extrato etéreo	5,7	5,6	5,7
CNF ²	35,6	35,8	34,9
CNF ³	36,5	35,8	36,0

¹Premix = 11,5% de Ca; 1,3% de P; 4,7% de Mg; 0,3% de S; 10,0% de Na; 4,9% Cl; 12,14 ppm de Co; 162 ppm de Cu; 405 ppm de Mn; 964 ppm de Zn; 6,64 ppm de Se; 16,20 ppm de I; 80988 UI de Vitamina A; 17817 UI de Vitamina D; 502 UI de Vitamina E; 25% de bicarbonato de sódio; 7% de óxido de magnésio e 25% de Megalac E.

²CNF = Carboidratos não-fibrosos = 100-(%PB+%FDN+%EE+%Cinzas)

³CNF = Carboidratos não-fibrosos = 100-(%PB-%PB derivada da fonte NNP +%NNP)+%FDN+%EE+%CINZAS) Adaptado: Hall (2000)

As dietas completas foram oferecidas às 6 h e 14 h em quantidade suficiente para resultar em no mínimo 15% do oferecido como sobra diária. Entre os dias 15 e 20 de cada período, foram coletadas amostras diárias de cada ingrediente e das sobras alimentares por animal e amostras compostas foram formadas com base em quantidades idênticas de matéria natural. Estas amostras

foram desidratadas em estufa de ventilação forçada por 72 h a 55°C, trituradas em peneira de 1 mm em moinho do tipo Thomas-Willey, e uma subamostra foi desidratada em estufa de 100°C por 24 h para determinação do teor de matéria seca. O teor de extrato etéreo foi determinado segundo o Association of Official Agricultural Chemists-AOAC (1990). As cinzas foram determinadas por incineração da amostra em mufla por oito horas a 550°C. O teor de FDN foi determinado por um ANKON® Fiber Analyser (ANKON Technology Corporation, Fairport, EUA). O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de microkjeldhal (AOAC, 1975). O consumo diário de matéria seca (CMS) entre os dias 15 e 20 foi utilizado para comparar tratamentos.

As vacas foram ordenhadas três vezes ao dia. A produção diária média entre os dias 15 e 16 foi utilizada para comparar tratamentos. Amostras de leite foram coletadas em frascos contendo 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol por seis ordenhas consecutivas nos dias 15 e 16 de cada período experimental. Em cada amostra foi determinado o teor de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e nitrogênio uréico (NUL) (PARLPR, Curitiba, PR). A secreção diária de energia no leite foi calculada pela equação: $[(0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ de proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ de lactose})] \times \text{kg de leite}$ (NRC, 2001).

No dia 17 foi avaliada a atividade mastigatória por observação visual da atividade bucal de cada animal a cada cinco minutos durante as seis horas subseqüentes à alimentação da manhã. As atividades bucais consideradas foram de ingestão de alimento, ingestão de água, ruminação e ócio. O tempo da primeira refeição (Refeição condicionada) e das outras refeições foi calculado em múltiplos de cinco minutos e o número de refeições matinais foi determinado. O consumo de matéria seca foi mensurado e a taxa de ingestão matinal foi calculada (g min^{-1}). Neste mesmo dia, a proporção do consumo diário entre 6 e 12 h (Manhã), 12 e 20 h (Tarde) e 20 e 6 h (Noite) foi obtido por mensuração do oferecido e das sobras alimentares em cada intervalo.

Nos dias 18 a 20 foi mensurada a produção fecal e urinária por coleta total realizada por oito horas ininterruptas. O início do período de coleta foi atrasado em oito horas a cada novo dia, visando obter uma amostra representativa das 24 horas do dia. As fezes de cada vaca foram congeladas ao longo das coletas e formaram uma amostra composta ao final de cada período. Os compostos por vaca foram desidratados e o teor de FDN, cinzas e nitrogênio foram analisados como previamente descrito. A digestibilidade aparente no trato digestivo total da matéria orgânica (DMO), da matéria seca (DMS), da FDN (DFDN) e da matéria orgânica não-FDN (DMOnFDN) foram calculadas. O consumo diário de matéria orgânica digestível (CMOD) foi calculado.

Ao longo da coleta, toda a urina foi inserida em galões contendo 200 ml de solução de ácido sulfúrico a 10%. O volume urinário foi mensurado, uma amostra foi formada por vaca, sendo esta então congelada a -20°C após diluição em quatro partes de água destilada. A determinação do teor de alantoína utilizou procedimento semelhante ao de Chen & Gomes (1995). Para a análise de creatinina foi utilizado kit laboratorial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Cat. 35-100). O teor de nitrogênio na urina foi mensurado como previamente descrito.

O peso vivo e também a condição corporal foram mensurados no dia 20 para descrever os animais. A condição corporal foi avaliada visualmente em escala de 1 a 5, sendo 1 representativo de magra e 5 representativo de gorda (Wildman et al., 1982). A condição corporal foi avaliada por três avaliadores independentes e o escore médio foi utilizado.

No dia 21 amostras de sangue foram obtidas dos vasos coccígeos para dosagem do teor de nitrogênio ureico no plasma (NUP). As amostras foram coletadas nos tempos 0, 2, 4, 8, 10 e 14 h após a alimentação matinal. O sangue foi colhido em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado e o plasma foi congelado a -20°C para posterior análise de ureia (Doles Reagentes e

Equipamentos para Laboratório Ltda., Goiânia, GO, kit uréia 500). O tempo diário de NUP acima de 21 mg dL^{-1} foi calculado assumindo mudança linear na concentração plasmática entre dois tempos de amostragem.

A retenção de nitrogênio foi calculada subtraindo do nitrogênio ingerido aquele excretado no leite, nas fezes e na urina. O teor de nitrogênio no leite foi determinado por divisão do teor de proteína pelo fator 6,38. Eficiências alimentares foram calculadas pelas relações entre a produção de leite e o CMS (Eficiência 1), a secreção de energia no leite e o CMS (Eficiência 2), a secreção de energia no leite e CMOD (Eficiência 3) e a produção de leite e o consumo de proteína.

Análise estatística

As variáveis com valor único em cada período foram analisadas pelo procedimento GLM do Statistical Analysis Software Institute-SAS Institute (1985) com o seguinte modelo: $Y_{ijklm} = \mu + Q_i + V_{j(i)} + P_k + T_l + e_{ijkl}$. Onde: μ = média geral, Q_i = efeito de quadrado ($i = 1$ a 6), $V_{j(i)}$ = efeito de vaca dentro de quadrado ($j = 1$ a 18), P_k = efeito de período ($k = 1$ a 3), T_l = efeito de tratamento ($l = \text{Optigen}^{\text{®}}\text{II}$, Controle, Uréia), e_{ijkl} = erro residual, assumido independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 . Dois contrastes ortogonais com um grau de liberdade foram testados: 1) Optigen[®]II vs. Controle. 2) Ureia vs. Controle. Valores de P até 0,05 foram interpretados como significativos e valores até 0,10 como tendência.

O teor de NUP mensurado ao longo do tempo foi analisado como medidas repetidas pelo procedimento MIXED do SAS (Littell et al., 1996). Ao modelo anteriormente descrito foram acrescentados os efeitos de tempo de amostragem (0, 2, 4, 8, 10 e 14 h) e sua interação com tratamento. O quadrado médio para a interação entre quadrado, vaca, período e tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento, enquanto o efeito de

tempo e sua interação com tratamento foram testados usando o erro residual. As estruturas de covariância consideradas foram: simetria composta, autorregressiva de primeira ordem e não-estruturada. A estrutura de covariância utilizada foi definida pelo maior número de Akaike. A frequência de amostras sanguíneas com NUP acima de 22 mg dL^{-1} foi avaliada pelo teste de qui-quadrado utilizando o procedimento FREQ do SAS Institute (1985).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve sucesso na meta de se obter a substituição parcial de farelo de soja por quantidades similares de N oriundo de Optigen®II ou uréia (TABELA 1). Ao redor de 1,5% da PB dietética foi oriunda das fontes de NNP e a densidade de PB nas dietas consumidas foi similar. O consumo diário por vaca de Optigen®II foi 137 g e o de ureia 125 g, cerca de 0,6% da MS total fornecida, equivalente a 350 g de PB oriunda de cada fonte. Devido à maior densidade de N nas fontes de NNP relativamente ao farelo de soja, 3,4% de polpa cítrica foi acrescida à dieta Controle em substituição parcial ao farelo de soja.

As dietas consumidas, com teor de PB ao redor de 15,5% (TABELA 1), foram avaliadas pelos modelos do NRC (2001) e de Cornell v.5 (CPM-Dairy, 2009). Na simulação pelo modelo do NRC, a PB no Optigen®II, similarmente à PB na uréia, foi considerada como sendo constituída totalmente de fração A, com variação apenas no teor de N entre as fontes, 282% de PB para a ureia e 251% para o Optigen®II. Na simulação do CPM-Dairy (2009) o valor nutricional do Optigen®II foi o do banco de alimentos do programa, que considera que 95% do N está na forma de proteína solúvel (fração A) e 5% como N insolúvel em detergente ácido (fração C). Baseado na estimativa dos modelos, a substituição de farelo de soja por NNP e polpa cítrica aumentou em 0,6% da MS o conteúdo dietético de proteína degradável no rúmen (PDR) e reduziu na mesma proporção o conteúdo de proteína não degradável (PND), indistintamente entre as fontes de NNP.

Neste experimento, apesar de existir diferença em teor dietético de PDR e PND entre tratamentos, o balanço da proteína metabolizável foi positivo em todas as dietas, o mesmo acontecendo para o balanço entre o fluxo e a demanda de energia. Pela estimativa do CPM-Dairy (2009) o fluxo de aminoácidos essenciais foi acima da exigência teórica em todas as dietas, apesar da relação entre lisina e metionina estar acima da ideal, tanto pela estimativa do NRC

(2001) e CPM-Dairy (2009) para máximo conteúdo de proteína no leite, 3,0 e 2,82, respectivamente (Whitehouse et al., 2009). A substituição de farelo de soja pelos teores adotados de NNP e polpa cítrica não atuaram substancialmente sobre o fluxo predito de aminoácidos essenciais e energia, sugerindo que a resposta aos tratamentos decorreu da diferença entre alimentos, e não de déficit nutricional induzido pelos tratamentos.

O consumo de matéria seca caiu nos tratamentos com NNP, sem efeito sobre a produção diária de leite ou sólidos (TABELA 2), resultando em tendência de ganho na relação entre o leite produzido e o consumo (TABELA 3). Golombeski et al. (2006) também observaram redução do consumo, sem o simultâneo decréscimo da produção leiteira, quando substituíram concentrados protéicos por 0,61% da dieta total de uréia complexada a cloreto de cálcio, inclusão semelhante à adotada neste trabalho. Entretanto, a inclusão de 1,9% da dieta total de uréia a 1,9% em substituição ao farelo de soja reduziu a eficiência alimentar (Brito & Broderick, 2007), sugerindo que inclusões de NNP acima de recomendações tidas como clássicas, ao redor de 1% da dieta (Reid, 1953; Loosli et al., 1966), podem não ser vantajosas. Estudos avaliando a resposta animal a teores crescentes de Optigen®II em substituição ao farelo de soja seriam pertinentes.

Existem relatos de queda no consumo em resposta ao uso de ureia para vacas leiteiras (Horn et al., 1967; Poos et al., 1979; Huber & Kung Junior, 1981). Huber & Cook (1972) observaram que a adição de melão e polpa de beterraba aumentou o consumo de um concentrado contendo 3,5% de ureia. Estes mesmos autores observaram que a infusão de ureia no rúmen ou no abomaso não induziu queda no consumo de concentrado comparativamente à aspersão da mesma quantidade de ureia sobre o concentrado. As concentrações de ureia e amônia no plasma não variaram entre tratamentos, sugerindo que algum mecanismo não sistêmico, provavelmente sensorial, pode estar envolvido

na depressão de consumo quando ureia foi fornecida adicionada ao concentrado fornecido separadamente da forragem.

TABELA 2 Desempenho de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen® II, Controle ou Ureia.

	Optigen® II	Controle	Ureia	EPM ¹	P Trat ²	P 1 ²	P 2 ²
	kg d ⁻¹						
Leite	31,6	31,5	31,5	0,36	0,98	0,87	0,97
CMS ³	22,4	23,2	22,4	0,26	0,07	0,05	0,04
CMOD ³	14,9	15,3	14,9	0,30	0,54	0,33	0,36
Gordura	1,044	1,062	1,039	0,0159	0,56	0,44	0,31
Proteína	0,941	0,944	0,942	0,0091	0,95	0,77	0,87
Lactose	1,182	1,192	1,189	0,0152	0,90	0,67	0,90
Sólidos	3,712	3,757	3,722	0,0424	0,73	0,46	0,56
	%						
Gordura	3,33	3,39	3,29	0,040	0,17	0,24	0,06
Proteína	3,01	3,04	3,02	0,014	0,38	0,22	0,25
Lactose	3,74	3,79	3,77	0,020	0,24	0,09	0,42
Sólidos	11,82	11,99	11,84	0,051	0,05	0,03	0,05
	mg dL ⁻¹						
NUL ³	15,5	15,4	16,6	0,27	<0,01	0,68	<0,01
	Mcal d ⁻¹						
Energia L ³	19,5	19,7	19,5	0,23	0,70	0,49	0,45
	Kg						
Peso vivo	646	643	639	1,91	0,03	0,21	0,14
	1 a 5 (Magra a gorda)						
C.C. ³	3,5	3,5	3,5	1,04	0,93	0,88	0,82

¹EPM = Erro padrão das médias

²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (P Trat) e para os contrastes 1) Optigen® II vs. Controle e 2) Uréia vs. Controle

³CMS = Consumo de matéria seca. CMOD = Consumo de matéria orgânica digestível. NUL = Nitrogênio ureico no leite. Energia L = Secreção de energia no leite. C.C. = Escore de condição corporal

Entretanto, a redução de consumo por baixa palatabilidade da ureia pode não ter sido o mecanismo prevalente no presente trabalho, já que o teor

dietético das fontes de NNP foi baixo e a ureia foi misturada a outros ingredientes em Dieta Completa. O encapsulamento do NNP no Optigen®II também seria um fator desfavorável à argumentação de que fatores sensoriais estariam envolvidos na resposta em consumo. Wilson et al. (1975) demonstraram que a depressão no consumo por uréia pode ocorrer por mecanismo sistêmico. Estes autores observaram que a infusão intrarruminal de ureia foi tão depressora do consumo quanto a incorporação da ureia à dieta, sendo que a infusão intrarruminal duas vezes por dia foi mais depressora do consumo que infusão contínua ao longo do dia.

TABELA 3 Eficiências alimentares de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.

	Optigen®II	Controle	Ureia	EPM ¹	<i>P</i> Trat ²	<i>P</i> 1 ²	<i>P</i> 2 ²
Leite/PB ³	9,29	8,80	8,99	0,188	0,20	0,08	0,49
Eficiência 1 ³	1,396	1,344	1,398	0,0212	0,13	0,09	0,07
	Mcal kg ⁻¹						
Eficiência 2 ³	0,88	0,86	0,87	0,015	0,58	0,35	0,41
Eficiência 3 ³	1,33	1,30	1,32	0,033	0,88	0,61	0,77

¹EPM = Erro padrão das médias

²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (*P* Trat) e para os contrastes 1) Optigen®II vs. Controle e 2) Ureia vs. Controle

³Leite/PB = Produção de leite/Consumo de proteína bruta. Eficiência 1 = Produção de leite /Consumo de matéria seca. Eficiência 2 = Secreção de energia no leite /Consumo de matéria seca. Eficiência 3 = Secreção de energia no leite /Consumo de matéria orgânica digestível

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito negativo de NNP sobre o consumo. A rápida hidrólise da ureia no rúmen poderia causar acidificação tóxica das células epiteliais (Visek, 1968) e alteração da motilidade ruminal (Juhász, 1965; Itabisashi, 1977; Juhász & Szegedi, 1983). Kertz et al. (1982) propuseram que a amônia liberada no rúmen poderia causar intoxicação subletal em bovinos. A rápida hidrólise da uréia em amônia no rúmen, sob condições de pH ruminal próximo da neutralidade, poderia favorecer a absorção

da amônia não ionizada pela parede. Neste caso a capacidade de ureagênese hepática poderia ser excedida, induzindo acúmulo de amônia no plasma (Symonds et al., 1981).

Oba & Allen (2003a) observaram que a infusão intrarruminal de propionato de amônio comparativamente a propionato de sódio ou potássio induziu queda no consumo e na frequência de alimentações em 12 horas, sem reduzir o tempo por refeição. A infusão de amônia adotada por estes autores foi equivalente a 875 g de PB em 14 horas. Segundo os autores, o ciclo hepático da uréia pode ter estimulado indiretamente o metabolismo oxidativo no fígado a partir de carbonos oxidáveis oriundos do catabolismo de aminoácidos, já que um dos carbonos na conversão de amônia a uréia vem de aspartato. Este fato pode ter aumentado a produção líquida de ATP no fígado e o estímulo do metabolismo oxidativo hepático poderia deprimir o consumo (Allen, 2000).

Outros fatores dietéticos podem estar envolvidos na redução do CMS como a maior inclusão de polpa cítrica nas dietas com NNP. A hidratação da polpa cítrica no rúmen pode ter aumentado o volume da digesta e inibir o consumo. Salvador et al. (2008) encontraram redução de 1,0 kg no CMS em dietas que polpa cítrica substituiu totalmente o milho moído da dieta. Porém, a inclusão de polpa foi o dobro comparado às dietas do Optigen® II e uréia (33% vs. 16% MS).

A queda no consumo induzida por NNP foi acompanhada de alteração no comportamento ingestivo (TABELA 4). No tratamento Ureia foram observados maior número de refeições matinais e tendência de queda no tempo de ingestão matinal, a primeira variável também foi aumentada no tratamento Optigen® II. Conrad et al. (1977) observaram que a inclusão de 1,3% de ureia à dieta total de vacas leiteiras induziu queda na duração da primeira refeição diária e no tempo por refeição, mesmo sem reduzir o consumo total de matéria seca, pois houve compensação por aumento no número de refeições e na taxa de

ingestão, semelhante numericamente ao observado neste trabalho (TABELA 4). A similaridade na resposta em comportamento ingestivo nos tratamentos Ureia e Optigen[®] II, sugere que o mecanismo foi comum às dietas contendo NNP.

TABELA 4 Proporção do consumo diário de matéria seca em períodos do dia e ingestão matinal de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen[®] II, Controle ou Ureia.

	Optigen [®] II	Controle	Ureia	EPM ¹	<i>P</i> Trat ²	<i>P</i> 1 ²	<i>P</i> 2 ²
% do consumo diário							
Manhã ³	32,0	32,9	34,2	1,12	0,42	0,59	0,44
Tarde ³	45,4	42,5	41,6	1,33	0,09	0,13	0,66
Noite ³	22,5	24,6	24,2	1,00	0,31	0,15	0,76
Min							
Ingest ³	83	89	79	4,0	0,21	0,25	0,08
R.cond ³	29	30	28	1,9	0,57	0,60	0,29
min refeição ⁻¹							
T. refeição ³	21	23	20	1,7	0,49	0,44	0,24
Refeições ³	4,1	3,4	4,3	0,20	0,01	0,05	<0,01
g min ⁻¹							
Taxa ingest ³	91,0	87,3	95,8	6,54	0,65	0,69	0,36

¹EPM = Erro padrão das médias

²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (*P* Trat) e para os contrastes 1) Optigen[®] II vs. Controle e 2) Ureia vs. Controle

³Manhã = 6:00 a 12:00. Tarde = 12:00 a 20:00. Noite = 20:00 a 6:00. Ingest = Tempo de ingestão matinal. R.cond = Refeição condicionada (primeira refeição após oferecimento da dieta). T. refeição = Tempo por refeição matinal. Refeições = Número de refeições pela manhã. Taxa ingest = Matéria seca consumida por Ingest

A concentração de NUP duas horas após a alimentação matinal foi maior nos tratamentos com NNP que no Controle (TABELA 5, FIGURA 1), sugerindo que o teor de NUP imediatamente após o oferecimento matinal de alimentos foi determinante do consumo. O valor do pico diário de NUP foi similar e mais tardio no Controle (FIGURA 1).

TABELA 5 Concentração de N ureico no plasma nos tempos após o oferecimento matinal de alimentos, tempo diário de NUP acima de 21 mg dL⁻¹ (≥21) e frequência de valores de NUP acima de 22 mg dL⁻¹ (Frequência) de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen[®] II, Controle ou Uréia. Os animais foram alimentados nos tempos 0 e 8.

horas	Optigen [®] II	Controle	Ureia	EPM ¹	<i>P</i> Trat ²	<i>P</i> 1 ²	<i>P</i> 2 ²
	mg 5dL ⁻¹						
0	18,4	18,1	19,2	0,84	0,64	0,80	0,37
2	20,2	18,0	20,6	0,80	0,06	0,06	0,03
4	19,2	20,4	19,0	0,80	0,41	0,28	0,23
8	16,4	17,4	16,4	0,78	0,63	0,41	0,40
10	15,7	15,9	16,3	0,60	0,72	0,78	0,60
14	15,8	15,7	16,4	0,79	0,82	0,90	0,55
	min d ⁻¹						
≥21	41	46	105	27,8	0,21	0,89	0,15
	% das amostras				<i>P</i> Qui-Quadrado		
Frequência	10,2	9,3	23,2		<0,01		

¹EPM = Erro padrão das médias

²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (*P* Trat) e para os contrastes 1) Optigen[®] II vs. Controle e 2) Uréia vs. Controle

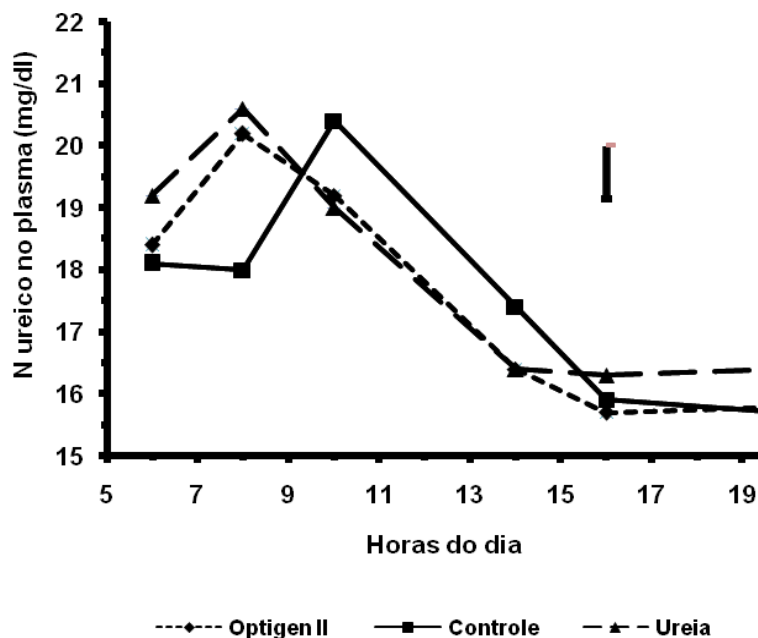


FIGURA 1 Nitrogênio ureico no plasma de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen[®]II, Controle ou Ureia. Os animais foram alimentados às 6 h e às 14 h horas. $P=0,98$ para o efeito de tratamento, $P<0,01$ para o efeito de tempo, $P=0,49$ para a interação entre tratamento e tempo.

Akay et al. (2004) observou que a degradação ruminal *in situ* do N em três horas de incubação foi mais rápida no Optigen[®] 1200 que no farelo de soja, o que é coerente ao pico mais tardio de NUP na dieta Controle, assumindo que ocorre similaridade na proteção do N em Optigen[®]II e no Optigen[®] 1200. Apesar de não ter sido mensurado, o pico mais precoce de NUP pode ter sido associado a maior concentração de amônia no sangue, uma explicação plausível para a queda de consumo observada nos tratamentos com NNP.

O tratamento Optigen[®]II resultou em NUP similar à ureia até 8 h após a alimentação matinal e similar ao Controle nos tempos 10 e 14 h (FIGURA 1). O

teor de NUL no Optigen[®]II foi similar ao Controle e inferior ao tratamento Ureia (TABELA 2). A concentração de NUL entre tratamentos refletiu a frequência diária de NUP acima de 22 mg dL⁻¹ (TABELA 5), e não refletiu o teor médio de NUP ao longo do dia (FIGURA 1). Entre vacas, a correlação entre o NUP médio e o NUL foi 0,70 (FIGURA 2).

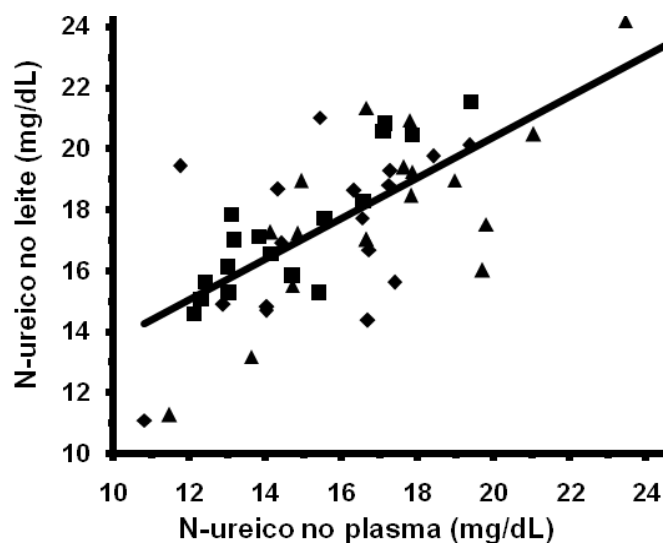


FIGURA 2 Correlação entre o teor de N ureico no leite (NUL) e o teor de N ureico no plasma (NUP) entre vacas nos tratamentos Optigen[®]II, Controle ou Ureia. $Y = 7,012 + 0,667 NUL$. $R^2 = 0,49$.

O oferecimento matinal de alimentos induziu pico no teor de NUP, enquanto a segunda alimentação diária não induziu resposta similar (FIGURA 1), mesmo com maior proporção do consumo entre 12 e 20 horas (TABELA 4). O pH do rúmen pode ter sido um fator nesta resposta. O pH determina a forma de absorção da amônia pelo epitélio, difusão simples da forma não protonada ou absorção por canais de potássio da forma protonada (Reynolds & Kristensen, 2008). Em pH próximo da neutralidade, esperado em vacas leiteiras imediatamente após o fornecimento matinal de dieta completa (Salvador et al.,

2008), predomina a forma não-protonada e lipofílica da amônia, com alta velocidade de absorção (Abdoun et al., 2007), o que resultaria em maior fluxo de amônia para o sangue após a primeira alimentação. Na segunda alimentação diária o pH ruminal estaria circadianamente mais baixo, levando a menor velocidade de absorção da amônia na forma protonada.

Outro mecanismo para a ausência de pico de NUP concomitantemente à segunda alimentação diária seria a possibilidade de maior sincronismo entre a liberação do nitrogênio dietético no rúmen e a degradação de carboidratos (Hall & Huntigton, 2008). A partir de oito horas da primeira alimentação diária, em vacas consumindo dieta completa de alta densidade energética, ocorre o momento de máxima fermentação de carboidratos, a se julgar pelo pico na concentração ruminal de ácidos graxos voláteis e no mínimo valor de pH diário (Pereira & Armentano, 2000; Salvador et al., 2008). Maior velocidade de crescimento e assimilação de N por microorganismos ruminais, acoplado a menor pH do fluido, capaz de determinar a prevalência da forma protonada da amônia, podem ter determinado um menor fluxo de amônia do rúmen para o sangue no período da tarde.

Mesmo requerendo validação científica, em manejos alimentares similares ao adotado neste experimento, evitar o fornecimento de fontes de NNP na primeira alimentação diária pode reduzir a ocorrência de picos precoces de NUP. Redução no NUP, e provavelmente na amônia plasmática (Sinclair et al., 2000), pode ter efeito benéfico sobre a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras (Butler, 1998; Rhoads et al., 2006). Esta estratégia também pode resultar em uso de NNP sem a queda observada no CMS, desejável em animais em balanço negativo de energia, e pode aumentar a eficiência de uso do nitrogênio dietético. Em contrapartida, o fornecimento concentrado de NNP na primeira alimentação diária seria uma estratégia plausível caso o intuito seja limitar o consumo em

animais com alto balanço positivo de energia, visando obter ganho em conversão alimentar ou evitar deposição excessiva de gordura corporal.

Houve tendência de ganho na conversão da proteína bruta ingerida em leite no tratamento Optigen®II (TABELA 3). Resultado semelhante foi observado por Galo et al. (2003) quando uréia de degradação lenta encapsulada com polímero substituiu concentrados protéicos. Entretanto, o balanço de nitrogênio não respondeu aos tratamentos (TABELA 6), similarmente ao observado por Poos et al. (1979) e Galo et al. (2003). A substituição de proteína de soja por NNP não resultou em aumento na perda de nitrogênio urinário e fecal, sendo, portanto, similares ambientalmente.

TABELA 6 Balanço de nitrogênio de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen®II, Controle ou Ureia.

	Optigen®II	Controle	Ureia	EPM ¹	<i>P</i> Trat ²	<i>P</i> 1 ²	<i>P</i> 2 ²
	g d ⁻¹						
N consumido	553	570	558	5,7	0,13	0,05	0,16
N leite	147	149	148	1,6	0,82	0,54	0,71
N fecal	187	193	187	7,7	0,80	0,59	0,55
N urinário	146	153	156	6,9	0,59	0,48	0,75
N retido	72	74	68	11,6	0,91	0,91	0,68
	% do N consumido						
N no leite	26,6	26,1	26,4	0,38	0,70	0,41	0,63
N fecal	34,3	33,6	33,3	1,38	0,88	0,72	0,91
N urinário	26,6	26,9	28,3	1,30	0,64	0,84	0,48
N retido	12,5	13,3	11,2	2,06	0,90	0,79	0,65

¹EPM = Erro padrão das médias

²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (*P* Trat) e para os contrastes 1) Optigen®II vs. Controle e 2) Ureia vs. Controle

Como vantagem ambiental, houve tendência de queda no volume diário de urina nas dietas com NNP (TABELA 7), uma justificativa plausível para a adoção destes alimentos em sistemas de produção de leite sujeitos a alta

regulação ambiental. A tendência de aumento do volume urinário no Controle pode ter decorrido da maior ingestão de N neste tratamento (TABELA 6). Reynal & Broderick (2005) encontraram redução no volume urinário e na excreção de N com a redução da PDR da dieta. Maior consumo de N pode induzir aumento no consumo e excreção de água pela urina (Bannink et al., 1999; Broderick et al., 2008).

TABELA 7 Volume urinário, alantoína (Alan) e creatinina (Creat) de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen[®]II, Controle ou Ureia.

	Optigen [®] II	Controle	Ureia	EPM ¹	P Trat ²	P 1 ²	P 2 ²
	L d ⁻¹						
Volume urinário	25,0	26,8	24,5	0,96	0,23	0,19	0,10
	mmoles d ⁻¹						
Alan	122	121	122	14,5	0,99	0,93	0,96
Creat	106	112	118	7,5	0,52	0,57	0,57
	mg L ⁻¹						
Alan	95,3	78,8	89,6	11,22	0,58	0,30	0,51
Creat	5,8	5,5	6,2	0,33	0,32	0,60	0,14
	mg kg ⁻¹						
Creat/Peso vivo	0,19	0,20	0,21	0,013	0,49	0,55	0,56
Alan/Creat	1,23	1,14	1,07	0,146	0,73	0,64	0,75

¹EPM = Erro padrão das médias

²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (*P* Trat) e para os contrastes 1) Optigen[®]II vs. Controle e 2) Ureia vs. Controle

A perda de N urinário foi menor que a perda de N fecal (TABELA 6), coerente à estimativa de balanço de N gerada pelo CPM-Dairy (2009). A estimativa gerada pelo modelo da excreção de N pela urina e da secreção de N no leite, ambas ao redor de 26% do N ingerido, foram similares aos valores observados. O valor para a proporção do N secretado no leite é similar ao valor médio de 27% obtido na meta-análise de Chase (2008), envolvendo 334 tratamentos oriundos de 62 experimentos. Entretanto, a estimativa do modelo de

Cornell para a perda fecal foi ao redor de 42% do N ingerido, substancialmente mais alta que o valor ao redor de 34% observado experimentalmente, o que resultou em valor da retenção de N estimada pelo modelo inferior ao valor mensurado. A retenção de N ao redor de 70 g d⁻¹ (TABELA 6), equivalente a 444 g de PB, parece ser uma superestimativa, considerando que a exigência diária de PB líquida para ganho seria 35 g em um animal de 643 kg, com condição corporal 3,5% e com ganho diário de peso de 300 g d⁻¹ (NRC, 2001), valores médios observados no experimento.

A perda fecal de PB parece ter sido subestimada em 409 g d⁻¹, equivalente a 65,4 g de N. Acrescentando este valor à perda fecal média de N de 189 g (TABELA 6), a proporção do N ingerido excretado nas fezes, como proporção das 560 g de consumo médio de N, seria equivalente a 45,4% e o N retido representaria cerca de 1% do N ingerido, coerentes metabolicamente. A perda fecal de N pode ter sido subestimada no experimento, talvez por volatilização de compostos nitrogenados quando da desidratação das amostras fecais em estufa, prévia à determinação do teor de N fecal.

A perda fecal de N foi mais importante que a perda urinária. Tamminga (1992) relata que nas condições da Holanda, onde pastagens temperadas com conteúdo elevado de N são utilizadas como ingrediente dietético, a proporção do N ingerido perdido na urina seria ao redor de 50,3%, a perda fecal seria ao redor de 28,6% e o N incorporado no leite seria ao redor de 18,9%, bem distinto dos valores observados e preditos pelo CPM-Dairy (2009) para as dietas experimentais. A diferença nas estimativas pode ser decorrência da diferença nas forrageiras utilizadas, pastagem temperada comparativamente à silagem de milho. Ambientalmente, maior proporção do N ingerido como perda urinária em vez de fecal é indesejável pela rápida conversão da ureia em amônia e óxido nitroso (Marini & Amburgh, 2005).

Entre vacas, as correlações entre a proporção do N ingerido secretado no leite foi 0,81 com a Eficiência 2, foi 0,73 com a Eficiência 3, foi 0,64 com a Eficiência 1 e foi 0,65 com o Mérito Leiteiro, calculado dividindo a secreção diária de energia no leite pelo peso vivo elevado a 0,75. Entretanto, a correlação entre Mérito Leiteiro e as três eficiências com a proporção do N ingerido perdido na urina foram não significativas e próximas de zero. Vacas mais capazes de secretar energia no leite proporcionalmente à exigência de energia para manutenção, à energia digerida ou ao alimento consumido também foram mais eficientes na utilização do N ingerido.

Não foi detectado efeito de tratamento sobre a digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total (TABELA 8), sobre o consumo de energia mensurado pelo CMOD (TABELA 2) ou sobre a eficiência de utilização da energia digerida (Eficiência 3) (TABELA 3). Diferenças no fluxo de nitrogênio do rúmen, de ocorrência provável a se julgar pelo teor de NUP ao longo do dia (FIGURA 1), não se refletiram na função digestiva. A ausência de efeito de tratamento sobre a síntese de proteína microbiana, estimada tanto pela excreção diária de alantoína na urina como pela relação entre alantoína e creatinina (TABELA 7), também suportam esta conclusão, similar ao observado por Galo et al. (2003) e Brito & Broderick (2007) quando também avaliaram a substituição de concentrados proteicos por NNP. A extensa reciclagem de nitrogênio em ruminantes é uma explicação plausível para a ausência de resposta em função digestiva à atuação sobre o sincronismo entre a digestão de proteína e a de carboidratos (Lapierre & Lobley, 2001; Reynolds & Kristensen, 2008).

A correlação entre a excreção diária de alantoína na urina e a relação entre o teor urinário de alantoína e o de creatinina foi 0,80, ocorrendo maior dispersão de pontos quando a estimativa de fluxo de proteína microbiana foi alta por este método (FIGURA 3). Variação na excreção de alantoína e creatinina ao longo do dia não seria uma explicação plausível para a perda de precisão em alto

valor dos marcadores, já que as análises foram realizadas em amostras compostas de urina representando toda a micção diária, e não em amostras do tipo *spot* (Shingfield & Offer, 1998). A excreção de creatinina por unidade de peso vivo foi constante e independente da fonte de N (TABELA 7).

TABELA 8 Digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total de vacas leiteiras nos tratamentos Optigen[®]II, Controle ou Ureia.

	Optigen [®] II	Controle	Ureia	EPM ¹	P Trat ²	P 1 ²	P 2 ²
	% do consumido						
DMS ³	68,2	68,8	68,8	1,84	0,92	0,72	0,98
DMO ³	71,1	71,3	71,6	1,07	0,96	0,89	0,87
DFDN ³	45,0	46,6	47,5	2,45	0,76	0,64	0,79
DMOnFDN ³	88,3	88,2	88,6	0,59	0,86	0,84	0,59

¹EPM = Erro padrão das médias

²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (*P* Trat) e para os contrastes 1) Optigen[®]II vs. Controle e 2) Ureia vs. Controle

³Digestibilidade aparente da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da fibra em detergente neutro (DFDN) e da matéria orgânica não-fibrosa (DMOnFDN)

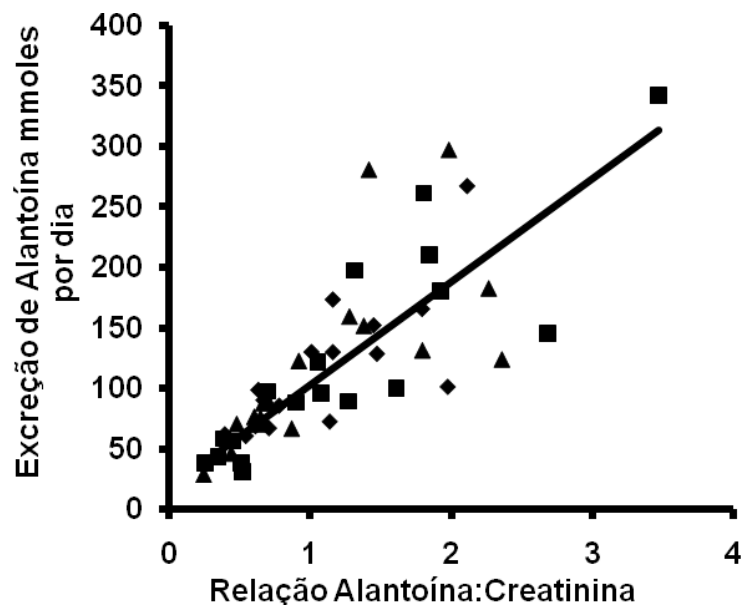


FIGURA 3 Correlação entre a excreção diária de alantoína em mmoles por dia e a relação entre alantoína e creatinina (A/C) na urina nos tratamentos Optigen® II, Controle ou Ureia. Excreção de alantoína mmoles por dia = $24,84 + 82,60A/C$. $r^2=0,63$.

CONCLUSÕES

A substituição de farelo de soja por polpa cítrica e NNP, em dietas capazes de suprir a demanda teórica de aminoácidos essenciais metabolizáveis, houve tendência de aumento na eficiência alimentar, por resultar em mesma produção de leite em um menor consumo de matéria seca. Entretanto, a uréia encapsulada não aumentou o teor de NUL comparativamente à ureia.

Pico de NUP mais precoce após a alimentação matinal foi relacionado à queda no consumo, enquanto alta frequência de altos teores de NUP ao longo do dia foi relacionada à maior teor de NUL entre tratamentos.

A atuação sobre a forma do nitrogênio alimentar não determinou a digestibilidade de nutrientes no trato digestivo total, a síntese de proteína microbiana no rúmen ou o balanço de N.

A substituição parcial do N em farelo de soja por NNP foi adequada ambientalmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; MARTENS, H. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. **Animal Health Research**, Melbourne, v.7, n.1/2, p.1-17, Mar. 2007.
- AKAY, V.; TIKOFSKY, J.; HOLTZ, C.; DAWSON, K.A. 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, Feb. 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12.ed. Washington, 1975. v.1, 1094p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15.ed. Arlington, 1990. v.1, 1117p.
- BAKER, L.D.; FERGUSON, J.D.; CHALUPA, W. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.78, n.11, p.2424-2434, June 1995.
- BANNINK, A.; VALK, H.; VUUREN, A.M. van. Intake and excretion of sodium, potassium, and nitrogen and the effects on urine production by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.5, p.1008-1018, Dec. 1999.
- BERGEN, W.G.; PURSER, D.B.; CLINE, J.H. Enzymatic determination of the protein quality of individual rumen bacteria. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.92, n.3, p.357-364, Dec. 1967.
- BOUCHER, S.E.; ORDWAY, R.S.; WHITEHOUSE, N.L.; LUNDY, F.P.; KONONOFF, P.J.; SCHWAB, C.G. 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, Aug. 2007.

BRITO, A.F.; BRODERICK, G.A. Effects of different protein supplements on milk production and nutrient utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.4, p.1816-1827, Dec. 2007.

BRODERICK, G.A.; STEVENSON, M.J.; PATTON, R.A.; LOBOS, N.E.; OLMOS-COLMENERO, J.J. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.3, p.1092-1102, Dec. 2008.

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

CABRITA, A.R.J.; DEWHURST, R.J.; ABREU, J.M.F.; FONSECA, A.J.M. Evaluation of the effects of synchronising 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, Feb. 2006.

CABRITA, A.R.J.; FONSECA, A.J.M.; DEWHURST, R.J.; SAMPAIO, C.V.P.; MIRANDA, M.F.S.; SOUSA, G.N.S.; MIRANDA, I.M.F.; GOMES, E. Nitrogen supplementation of corn silages: 1., effects on feed intake and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.12, p.4008-4019, July 2003.

CASTILLO, A.R.; KEBREAB, E.; BEEVER, D.E.; BARBI, J.H.; SUTTON, J.D.; KIRBY, H.C.; FRANCE, J. The effect of energy supplementation on utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.79, n.1, p.240-246, Aug. 2001.

CASTILLO, A.R.; KEBREAB, E.; BEEVER, D.E.; FRANCE, J. A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. **Journal Animal Feed Science**, Champaign, v.9, n.1, p.1-32, Jan. 2000.

CATARETO, R. **Uso de uréia de liberação lenta para vacas alimentadas com silagem de milho ou pastagens de capim elefante manejadas com intervalos fixos ou variáveis de desfolhas**. 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

CHALUPA, W.; BAILE, C.A.; McLAUGHLIN, C.L.; BRAND, J.G. Effect of Introduction of urea on feeding behavior of holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.61, n.8, p.1278-1284, Aug. 1979.

CHASE, L.E. **How efficiently are your cows using ration nitrogen?**

Disponível em:

<http://www.extension.org/pages/How_Efficiently_Are_Your_Cows_Using_Ration_Nitrogen%3F/>. Acesso em: 12 nov. 2008.

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. 20p.

CHENG, K.J.; MCCOWAN, R.P.; COSTERTON, J.W. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.32, n.1, p.139-148, Jan. 1979.

CHENG, K.J.; WALLACE, R.J. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. **British Journal Nutrition**, Cambridge, v.42, n.3, p.553-557, July 1979.

CHURCH, D.C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants.** Corvallis: Nutrition O&B Books, 1979. v.2, 564p.

COLOVOS, N.F.; HOLTER, J.B.; DAVIS, H.A.; URBAN JUNIOR, W.E. Urea for lactating dairy cattle: II., effect of various levels of concentrate urea on nutritive value of the ration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.50, n.4, p.523-526, Oct. 1966.

CONRAD, H.R.; BAILE, C.A.; MAYER, J. Changing meal patterns and suppression of feed intake with increasing amounts of dietary nonprotein nitrogen in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.60, n.11, p.1725-1733, Apr. 1977.

COOK, A.R. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. **Journal of General Microbiology**, London, v.92, n.1, p.32-48, June 1976.

COPPOCK, C.E.; PEPLOWSKI, M.A.; LAKE, G.B. Effect of urea form and method of feeding on rumen ammonia concentration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.59, n.6, p.1152-1156, Feb. 1976.

CPM-DAIRY. **Evaluation in application of the CPM-Dairy nutrition model.** Version 3.0.10. Disponível em: <<http://www.cpm dairy.com/Index.html>>. Acesso em: 30 jun. 2009.

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

DAVIDSON, S.; HOPKINS, B.A.; DIAZ, D.E.; BOLT, S.M.; BROWNIE, C.; FELLNER, V.; WHITLOW, L.W. Effects of amounts and degradability of dietary protein on lactation nitrogen utilization, and excretion in early lactation holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.5, p.1681-1689, Dec. 2003.

DELGADO-ELORDUY, A.; THEURER, C.B.; HUBER, J.T.; ALIO, A.; LOZANO, O.; SADIK, M.; CUNEO, P.; YOUNG, H.D.; SIMAS, I.J.; SANTOS, J.E.P.; NUSSIO, L.; NUSSIO, C.; WEBB JUNIOR, K.E.; TAGARI, H. Splanchnic and mammary nitrogen metabolism by dairy cows fed steam-rolled or steam-flaked corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.1, p.148-159, Aug. 2002.

FIRKINS, J.L.; REYNOLDS, C.K. **Whole animal nitrogen balance in cattle:** nitrogen and phosphorus nutrition of cattle and environment. Wallingford: CAB International, 2005. 262p.

FIRKINS, J.L.; YU, Z.; MORRISON, M. Ruminant nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.13, p.E1-E16, Oct. 2007.

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, Sept. 1980.

GALO, E.; EMANUELE, S.M.; SNIFFEN, C.J.; WHITE, J.H.; KNAPP, J.R. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.6, p.2154-2162, Nov. 2003.

GOLOMBESKI, G.L.; KALSCHEUR, K.F.; HIPPEN, A.R.; SHINGOETHE, D.J. Slow-release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.11, p.4395-4403, June 2006.

GUSTAFSSON, A.H.; PALMQUIST, D.L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.2, p.475-484, July 1993.

HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. Gainesville: University of Florida, 2000. 25p. (Bulletin, 339).

HALL, M.B.; HUNTIGTON, G.B. Nutrient synchrony: sound in theory, elusive in practice. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, n.14, p.E287-E292, Oct. 2008.

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. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.71, n.9, p.2516-2528, Mar. 1993.

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.

HORN, H.H. van; FOREMAN, C.F.; RODRIGUEZ, J.E. Effect of high-urea supplementation on feed intake and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.50, n.5, p.709-714, 1967.

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.1344-1354, 1994.

HUBER, J.T. Protein and non-protein nitrogen utilization in practical dairy rations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.41, n.3, p.954-961, 1975.

HUBER, J.T.; COOK, R.M. Influence of site of administration of urea on voluntary intake of concentrate by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.55, n.3, p.1470-1473, 1972.

HUBER, J.T.; KUNG JUNIOR, L. Protein and nonprotein nitrogen utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, n.6, p.1170-1195, 1981.

HUNTINGTON, G.B.; ARCHIBEQUE, S.L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, Washington, v.77, p.1-11, 1999. Supplement.

INOSTROZA, J.F.; SHAVER, R.D.; CABRERA, V.E.; TRICARICO, J.M. 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.

INOSTROZA, J.F.; SHAVER, R.D.; CABRERA, V.E.; TRICARICO, J.M. 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.

ITABISASHI, T. Urea-ammonia poisoning and ruminal motility in goats. **National Institute of Animal Health Quartely**, Ithaca, v.17, p.128-129, 1977.

JOHN, G.A.; ISAACSON, H.R.; BRYANT, M.P. Isolation and characteristics of a ureolytic strain of *Selemonas ruminantium*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.57, p.1003-1014, 1974.

JONES, G.A.; MACLEOD, R.A.; BLACKWOOD, A.C. Ureolytic rumen bacteria: I., characteristics of the microflora from urea-fed sheep. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.10, p.371-378, 1964.

JUHÁSZ, B. Die wirkung von ammoniak auf die pansenbewegungen. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.15, p.317-333, 1965.

JUHÁSZ, B.; SZEGEDI, B. Effects of disturbances of acid-base equilibrium on the activity of the rumen. **Acta Physiologica Hungarica**, Herceghalom, v.62, n.1, p.7-17, 1983.

KALSCHUR, K.F.; BALDWIN, R.L.; GLENN, B.P.; KOHN, R.A. Milk 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.; DAVIDSON, L.E.; CORDS, B.R.; PUCH, H.C. Ruminant infusion of ammonium chloride in lactating cows to determine effects of pH on ammonia trapping. **Journal Dairy of Science**, Champaign, v.66, n.12, p.2597-2601, Dec. 1983.

KERTZ, A.F.; KOEPKE, M.K.; DAVIDSON, L.E.; BETZ, N.L.; NORRIS, J.R.; SKOCH, L.V.; CORDS, B.R.; HOPKINS, D.T. Factors influencing intake of high urea-containing rations by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.65, n.4, p.587-604, Apr. 1982.

LAPIERRE, H.; LOBLEY, G.E. Nitrogen recycling in the ruminant: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, p.E223-E236, 2001. Supplement.

LAVEN, R.A.; WATHES, D.C.; LAWRENCE, K.E.; SCARAMUZZI, R.J. An analysis of the relationship between plasma urea and ammonia concentration in dairy cattle fed a consistent diet over a 100-day period. **Journal of Dairy Research**, Kingdom, v.74, n.4, p.412-416, July 2007.

LEWIS, D. Ammonia toxicity in the ruminant. **Journal of the Agricultural**, Centeno, v.55, p.111-117, 1960.

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D. **SAS[®] system for mixed models**. Cary: SAS Institute, 1996. 633p.

LOOSLI, J.K.; WILLIAMS, H.H.; THOMAS, W.E.; FENT, H.F.; MAYNARD, L.A. Synthesis of amino acids in the rumen. **Science**, New York, v.110, n.2849, p.144-145, Aug. 1949.

MAHADEVAN, S.; SAUER, F.; ERFLE, J.D. Studies on bovine rumen bacterial urease. **Journal Animal of Science**, Champaign, v.42, p.745-753, 1976.

MARINI, J.C.; AMBURGH, M.E. van. Partition of nitrogen excretion in urine and the feces of Holstein replacement heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, n.5, p.1778-1784, May 2005.

MOORBY, J.M.; THEOBALD, V.J. Short communication: the effect of duodenal ammonia infusions on milk production and nitrogen balance of the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.11, p.2440-2442, Nov. 1999.

NARASIMHALU, P.R.; BELZILE, R.J.; BRISSON, J.; HOLTMANN, W.B. Phase feeding of urea after feeding soybean meal to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, n.12, p.2044-2050, Dec. 1980.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. rev. Washington: National Academy, 2001. 381p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.H. Freeman, 2004. 1000p.

NENNICH, T.D.; HARRISON, J.H.; VANWIERINGEN, L.M.; SAINT PIERRE, N.R.; KINCAID, R.L.; WATTIAUX, M.A.; DAVIDSON, D.L.; BLOCK, E. Prediction and evaluation of urine and urinary nitrogen and mineral excretion from dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.1, p.353-364, Jan. 2006.

NODA, K. Possible effect of blood ammonia on food intake of rats fed amino acid imbalanced diets. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.105, p.508-516, 1976.

OBA, M.; ALLEN, M.S. Effects of intraruminal infusion of sodium, potassium, and ammonium on hypophagia from propionate in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.4, p.1398-1404, Apr. 2003a.

OBA, M.; ALLEN, M.S. Hypophagic effects of ammonium are greater when infused with acetate in lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.133, n.4, p.1100-1104, Apr. 2003b.

OLMOS-COLMENERO, J.J.; BRODERICK, G.A. Effect of dietary crude protein concentration on ruminal nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.5, p.1694-1703, May 2006.

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.1, p.498-518, Jan. 1983.

PARKER, D.S.; LOMAX, M.A.; SEAL, C.J.; WILTON, J.C. Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. **Proceedings Nutrition Society**, Cambridge, v.54, n.2, p.549-563, July 1995.

PEREIRA, M.N.; ARMENTANO, L.E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets: II., digestion and rumen function. **Journal Dairy of Science**, Champaign, v.83, n.12, p.2876-2887, Dec. 2000.

PFEFFER, E.; HRISTOV, A.N. **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle reducing the environmental impact of cattle operations**. Oxfordshire: CAB International, 2005. 288p.

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, p.1417-1426, 1979.

PURDIE, N.G.; TROUT, D.R.; CIESLAR, S.R.L.; MADSEN, T.G.; POPPI, D.P.; CANT, J.P. The effect of short-term hyperammonaemia on milk synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, Kingdom, v.76, n.1, p.49-58, Feb. 2009.

REID, J.T. Urea as a protein replacement for ruminants: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.36, p.955-996, 1953.

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.

REYNOLDS, C.K. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants in ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM RUMINANTS PHYSIOLOGY, 8., 1995, Stuttgart. **Proceedings...** Stuttgart: Verlag, 1995. p.351-371.

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.

RHOADS, M.L.; RHOADS, R.P.; GILBERT, R.O.; TOOLE, R.; BUTLER, W.R. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.91, n.1/2, p.1-10, Jan. 2006.

ROFFLER, R.E.; SATTER, L.D. Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants: I., development of a model for predicting nonprotein nitrogen utilization by cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.58, p.1880-1888, 1975.

RUIZ, R.; TEDESCHI, L.O.; MARINI, J.C.; FOX, D.G.; PELL, A.N.; JARVIS, G.; RUSSELL, J.B. The effect of ruminal nitrogen (N) deficiency in dairy cows: evaluation of the cornell net carbohydrate and protein system ruminal N deficiency adjustment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.11, p.2986-2999, Nov. 2002.

SALVADOR, S.C.; PEREIRA, M.N.; SANTOS, J.F.; MELO, L.Q.; CHAVES, M.L. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos: I., consumo e digestão. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.3, p.682-690, jun. 2008.

SANTOS, F.A.P.; SANTOS, J.E.P.; THEUBER, C.B.; HUBER, J.T. 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.

STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE INSTITUTE. **SAS® user's guide: statistics**. 5.ed. Cary, 1985. 1290p.

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.

SHINGFIELD, K.J.; OFFER, N.W. Evaluation of milk allantoin excretion as an index of microbial protein supply in lactating dairy cows. **Journal Animal of Science**, Champaign, v.67, n.5, p.371-385, May 1998.

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

SINCLAIR, K.D.; SINCLAIR, L.A.; ROBINSON, J.J. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I., adaptive changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.78, n.10, p.2659-2669, Oct. 2000.

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, Apr. 2000.

SOUZA, V.L.; SILVA, D.F.F.; PIEKARSKI, P.R.B.; JESUS, C.P.; PEREIRA, M.N.; ALMEIDA, R. Partial replacement of soybean meal by protected urea effects on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.1, p.100-101, 2009. 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**, London, v.46, n.4, p.481-486, Aug. 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, Feb. 1992.

TAN, Z.; MURPHY, M.R. Ammonia production, ammonia absorption, and urea recycling in ruminants: a review. **Journal Animal Feed Science**, Amsterdam, v.13, n.3, p.389-404, 2004.

VARGAS, G.; ISHLER, V. Effects of Optigen[®] on milk production, N balance and diet cost in high producing 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.67, n.3, p.481-498, Mar. 1984.

WISEK, W.J. Nitrogen utilization by the ruminant: some aspects of ammonia toxicity in animal cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.51, n.2, p.286-295, Feb. 1968.

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

WALLACE, R.J.; CHENG, K.J.; DINSDALE, D.; ORSKOV, E.R. An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. **Nature**, London, v.279, p.424-426, 1979.

WATTIAUX, M.A.; KARG, K.L. Protein level for alfafa and corn silage-based diets: I., lactational response and milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.12, p.3480-3491, Dec. 2004.

WHITEHOUSE, N.; SCHWAB, C.; TYLUTKI, T.; LUCHINI, D.; SLOAN, B. Comparison of optimal lysine and methionine concentrations in metabolizable protein estimated by NRC (2001), CPM-Dairy (v.3.0.10) and AMTS Cattle (v.2.1.1) models. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.1, p.103-105, 2009. Supplement.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L.; TROUTT JUNIOR, H.F.; LESCH, T.N. 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, Mar. 1982.

WILSON, G.; MARTZ, F.A.; CAMPBELL, J.R.; BECKER, B.A. Evaluation of factors responsible for reduced voluntary intake of urea diets for ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.41, p.1431-1437, 1975.

WOHLT, J.E.; CLARK, J.H.; BLAISDELL, F.S. Nutritional value of urea versus preformed protein for ruminants: II., nitrogen utilization by dairy cows fed corn based diets containing supplemental nitrogen from urea and/or soybean meal. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.61, n.5, p.916-931, May 1978.

WOZNY, M.A.; BRYANT, M.P.; HOLDEMAN, L.V.; MOORE, W.E.C. Urease assay and urease-producing species of anaerobes in the bovine rumen and human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.33, n.5, p.1097-1104, May 1977.