UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

MARIANA SANTOS DE MIRANDA

Efeitos da substituição parcial do farelo de soja por uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura, em dietas de vacas holandesas em lactação.

Pirassununga

2015

MARIANA SANTOS DE MIRANDA

Efeitos da substituição parcial do farelo de soja por uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura, em dietas de vacas holandesas em lactação.

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leme.

Coorientador: Prof. Dr. Arlindo Saran Netto.

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

M672e

Miranda, Mariana Santos de
Efeitos da substituição parcial do farelo de soja por uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura, em dietas de vacas holandesas em lactação / Mariana Santos de Miranda. -- Pirassununga, 2015.
97 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Biossistemas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leme.

1. Proteína microbiana derivada de levedura 2. Ureia de liberação lenta 3. Produção de leite 4. Parâmetros sanguíneos 5. Balanço nitrogenado. I. Título.

Aos meus filhos, Rafael e Beatriz, razões do meu viver e que um dia, quando maiores, poderão entender quão necessário e valioso foi o sacrifício de subtrair meu tempo de mãe para me dedicar ao trabalho e concluir mais esta etapa que com certeza valeu a pena,

Ao meu amor e companheiro Maurício, que esteve sempre ao meu lado, fazendo jornada dupla em casa, pai e mãe, nos momentos necessários,

DEDICO.

A minha querida e amada mãe Rejane que me ensinou a ser lutadora, que sempre acreditou em mim, principalmente nas horas em que nem eu mesmo acreditava, pelo seu amor e exemplo de mãe e mulher,

Ao meu grande amigo e irmão Felipe, que sempre me incentivou a correr atrás de todos os meus sonhos e contribuiu para que muitos fossem realizados,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e sempre me acompanhar em todos os momentos;

Ao meu orientador, professor Dr. Paulo Roberto Leme, pela orientação, ensinamentos, persistência, paciência, amizade, confiança e por todo apoio oferecido;

Ao meu coorientador, professor Dr. Arlindo Saran Netto, pela imensa colaboração e auxilio, na condução do experimento;

Ao professor Dr. Saulo da Luz e Silva, pela contribuição nas análises estatísticas do estudo;

Ao Dr. Marcelo de Queiroz Manella, pelo auxílio e contribuição em todo o experimento, mas principalmente no planejamento do projeto;

A Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, em especial, ao Departamento de Zootecnia, por permitirem a realização deste curso;

A Alltech do Brasil LTDA, pelo apoio técnico e financeiro oferecido para execução do projeto, em especial ao Winston Giardini, pela valiosa contribuição na formulação das dietas e pelos comentários muito úteis e oportunos no decorrer do trabalho;

Ao Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio – Bovinos de Leite, por cederem os animais e as instalações para a realização deste estudo;

A Biomol Equipamentos e Produtos para Laboratórios, pela qualidade dos materiais adquiridos e apoio técnico e financeiro para análises e finalização da tese;

Aos pesquisadores, Claudia Rodrigues Pozzi, Irineu Arcaro Júnior, Juliana Rodrigues Pozzi Arcaro, Luciandra Macedo de Toledo, Luís Alberto Ambrósio e Maria da Graça Pinheiro, pelo auxílio, apoio, colaboração, ensinamentos, amizade e atenção dispensada no dia a dia;

Aos funcionários do setor CAPTA Bovinos de Leite, Ana Baião, Creusa Maria, Donizete Olivatto, Gilberto Gomes, Luis Caboclo, Paulo Almussa, Tereza Lídia e Valter Messias pelo auxílio e companheirismo na condução do experimento;

Aos colaboradores Luiz Frederico e Nivaldo Vitório, pela ajuda na condução do experimento, preparo das instalações e trato dos animais;

A todos os colegas de pós-graduação da FZEA-USP, Katiele, Gisele, André, Rafael, Vítor, pela valiosa ajuda nos períodos de coletas ao final de cada período experimental;

A todos os alunos de pós-graduação e estagiários do setor CAPTA Bovinos de Leite pelo auxílio nas coletas;

A Premix pelo confeccionamento dos concentrados experimentais;

A todos que colaboraram com a realização deste trabalho de maneira direta ou não e que, embora não citados aqui não deixam de merecer meus sinceros agradecimentos,

MEU MUITO OBRIGADA!

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.”

MARTIN LUTHER KING JR.

“Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa.”

MAHATMA GANDHI.

RESUMO

MIRANDA, M. S. **Efeitos da substituição parcial do farelo de soja por uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura, em dietas de vacas holandesas em lactação.** 2015. 97 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2015.

Foi conduzido um estudo com vacas leiteiras no Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio - Bovinos de Leite, do Instituto de Zootecnia, em Nova Odessa, SP, com o objetivo de avaliar os efeitos da substituição parcial do farelo de soja da dieta por uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura (PML), e a sua combinação com uma ureia de liberação lenta (ULL), sobre o consumo de MS, produção e composição do leite, bem como alguns parâmetros sanguíneos e o balanço nitrogenado. Foram utilizadas oito vacas primíparas da raça Holandês, distribuídas aleatoriamente em dois quadrados latinos 4x4 em tratamentos arranjados em esquema fatorial 2x2, sendo que cada período experimental foi composto por 28 dias com 21 dias de adaptação e 7 dias de coleta. Foram comparadas quatro dietas, compostas por 49% de volumoso (47% de silagem de milho e 2% de feno de *Tifton*) e 51% de concentrado, com teor médio de 16,8% de proteína bruta e 2,5Mcal/kg EM. Na dieta controle (CTL = sem PML e sem ULL) o farelo de soja foi a principal fonte proteica e nas outras três dietas o farelo de soja foi parcialmente substituído por 15 g/kg MS de PML (com PML e sem ULL) ou por 7,5 g/kg MS de ULL (sem PML e com ULL) ou ambos, 15 g/kg MS PML+ 7,5 g/kg MS de ULL (com PML e com ULL). Houve interação entre PML e ULL para o consumo de MS (P=0,0003) e produção de leite (P=0,0013). As vacas que receberam o tratamento ULL tiveram menor consumo de MS, sem afetar a produção de leite comparado às vacas que receberam o tratamento PML+ULL (P≤0,05). Não houve interação para os componentes do leite obtido, exceto para o extrato seco desengordurado (P=0,0086), as vacas que receberam o tratamento CTL tiveram os maiores teores de ESD no leite comparada as vacas que receberam o tratamento ULL (P=0,0002) e esses teores mais elevados foram iguais aos das vacas que receberam o tratamento PML (P=0,066). Apesar de não ter havido interação, as vacas que receberam os tratamentos sem ULL tiveram maiores teores de proteína, caseína e sólidos totais no leite comparado às vacas que receberam os tratamentos com ULL (P≤0,05). Não houve interação entre PML e ULL para eficiência na produção de leite (P=0,0694), porém a eficiência na produção de leite corrigida para energia foi maior para as vacas que receberam tratamentos com ULL do que as vacas que receberam os tratamentos

sem ULL (P≤0,05). Não houve interação entre PML e ULL para os parâmetros sanguíneos analisados (P>0,05) exceto para o teor de K (P=0,0098). Os teores de hematócrito e hemoglobina foram maiores nas vacas que receberam tratamento com ULL comparado aos valores encontrados nas vacas que receberam tratamento sem ULL (P≤0,05), não afetando a homeostasia. O teor de N retido (balanço de N) foi maior para os animais que receberam o tratamento CTL devido a diferença encontradas no teor de N ingerido e excretado nas fezes (P≤0,05). A eficiência do uso de N aumentou com a substituição do farelo de soja por PML, ULL ou ambos (P≤0,05). A substituição do farelo de soja pela PML, ULL ou por ambos em dietas de vacas leiteiras, teve efeitos sobre o consumo de MS, a produção e composição do leite, bem como na ingestão de N, secreção de N no leite, excreção fecal de N e no balanço nitrogenado. De maneira geral, é possível fazer a substituição do farelo de soja pela PML, ULL ou ambos, sem afetar negativamente os parâmetros de produtividade. Os resultados obtidos foram similares ao tratamento CTL em relação ao consumo, produção de leite e balanço nitrogenado permitindo espaço para a inclusão de alimentos mais baratos e garantindo melhor fornecimento de energia.

Palavras-chave: Balanço nitrogenado, componentes do leite, produção de leite, parâmetros sanguíneos, ureia de liberação lenta.

ABSTRACT

MIRANDA, M.S. **Effects of the partial substitution of soybean meal by a yeast-derived microbial protein source, in diets of lactating dairy cows.** 2015. 97 f. Phd. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2015.

This study was conducted to evaluate the effects of partial replacement in the diet of dairy cows of soybean meal by a yeast-derived microbial protein source (YMP) or a combination of YMP with a slow release urea (SRU), on dry matter intake, milk production and composition, blood parameters and nitrogen balance. Eight first lactation cows were distributed randomly into two 4x4 Latin squares, in a 2x2 factorial arrangement of treatments, with four periods with 28 days each one (21 days of adaptation and 7 days of collection). The base diet had 49% roughage (47% corn silage and 2% *Tifton* hay) and 51% concentrate, with an average of 16.8% crude protein and 2.5 Mcal/kg dry matter (DM). In the control diet (CTL = without YMP and without SRU) soybean meal was the main protein source and in the three other diets the soybean meal was partially replaced by 15 g/kg DM of YMP or 7.5 g/kg DM SRU, or both, 15 g/kg DM YMP plus 7.5 g/kg DM SRU. There was an interaction between YMP and SRU for DM intake (P=0.0003) and milk production (P=0.0013). The cows that received SRU treatment had lower DM intake not affecting milk production compared to cows that received the YMP+SRU treatment and differences among treatments for DM intake and milk production (P≤0,05). There was no interaction of the milk components, except for nonfat dry milk (P=0.0086), the cows that received CTL treatment had the highest nonfat dry milk compared to cows received the SRU treatment (P=0.0002) and these higher levels were equal to those of cows received the YMP treatment (P=0.066). Although there was no interaction, the cows that received the treatments without SRU had higher protein, casein and total solids in milk compared to cows received treatments SRU (P≤0.05). There was no interaction between YMP and SRU for milk production efficiency (P=0.0694), but efficiency in the milk production corrected for energy was greater for cows received SRU treatments than cows received treatments without SRU (P≤0.05). There was no interaction between YMP and SRU for the analyzed blood parameters (P>0.05) except for the K content (P=0.0098). The levels of hematocrit and hemoglobin were higher in cows that received treatment with SRU compared to cows that received treatment without SRU (P≤0.05), not affecting homeostasis. The nitrogen retained (N balance) was higher for animals that received CTL treatment due to differences in N content ingested and excreted in the feces (P≤0.05). The

efficiency of use of N increased with the substitution of soybean meal for PML, ULL or both ($P \leq 0.05$). The substitution of soybean meal by YMP, SRU or both in dairy cow diets, had effects on DM intake, milk yield and composition, as well as N intake, milk secretion of N, fecal excretion of N and nitrogen balance. In general, it is possible to replace soybean meal for PML, ULL or both, without impacting negatively the production performance parameters. The results obtained in the CTL treatment in the consumption of dry matter, production of milk and nitrogen balance allowing the inclusion of cheaper feeds allowing for better energy supply.

Keywords: Nitrogen balance, milk composition, milk production, blood parameters, slow release urea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Evolução do preço do farelo de soja CEPEA / ESALQ – Campinas – SP.

Figura 2 – Metabolismo proteico em bovinos leiteiros.

Figura 3 – Baias experimentais individuais em instalações do tipo *free-stall*.

Figura 4 – Ordenha diária dos animais e amostragem do leite para análise de composição.

Figura 5 – Materiais para coleta de sangue, analisador portátil e cartuchos para análises dos parâmetros sanguíneos.

Figura 6 – Amostras de urina para análise do teor de nitrogênio e creatinina para o cálculo do balanço nitrogenado.

Figura 7 – Coleta total de fezes para determinação do teor de N nas fezes e cálculo do balanço nitrogenado.

Figura 8 – Efeito da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre a eficiência de produção de leite.

Figura 9 – Teores médios de K sanguíneo, $mEq.L^{-1}$, obtidos por gasometria em função dos tratamentos.

Figura 10 – Efeito da proteína microbiana derivada de levedura (PML) e da ureia de liberação lenta (ULL) sobre o volume médio urinário das vacas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de aminoácidos essenciais das bactérias ruminais, da PML e do farelo de soja.

Tabela 2 – Valores de referências para alguns eletrólitos, ânion gap, potencial hidrogeniônico venoso, pressão parcial de dióxido de carbono e bicarbonato sanguíneos na espécie bovina.

Tabela 3 – Composição percentual dos ingredientes das dietas, expressa com base na matéria seca (% MS).

Tabela 4 – Composição bromatológica dos volumosos e dos concentrados que compunham as dietas com base na MS.

Tabela 5 – Composição química das dietas experimentais com base na MS e teor de aminoácidos essenciais.

Tabela 6 – Delineamento de dois quadrados latinos 4x4, balanceados, com 4 animais, 4 tratamentos e 4 períodos cada.

Tabela 7 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre o consumo de matéria seca e a produção de leite obtida e corrigida para 4% gordura e para energia.

Tabela 8 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre a eficiência da produção de leite obtida e corrigida para 4% de gordura e para energia.

Tabela 9 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre os componentes totais do leite.

Tabela 10 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre os valores obtidos por gasometria dos metabólitos e gases sanguíneos.

Tabela 11 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre os valores obtidos para ingestão de nitrogênio, excreção e balanço nitrogenado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AnGAP	Ânion GAP ou janela aniônica
BE	Base Extra
BN	Balanço de Nitrogênio
CAPTA	Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio
CCS	Contagem de Células Somáticas
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CHO	Carboidrato
CMS	Consumo de Matéria Seca
CNF	Carboidratos não fibrosos
CTL	Controle
EE	Extrato Etéreo
ENN	Extrativo Não Nitrogenado
ESD	Extrato Seco Desengordurado
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
Glu	Glicose
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
LCE	Produção de Leite Corrigida para Energia
LCG	Produção de Leite Corrigida para 4% de Gordura
MM	Matéria Mineral
MS	Matéria Seca
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
NNP	Nitrogênio Não Proteico
$N\text{-}NH_3$	Amônia
NUL	Nitrogênio Ureico no Leite
NUS	Nitrogênio Ureico no Sangue
PB	Proteína Bruta
PCO_2	Pressão Parcial de Dióxido de Carbono
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Proteína Metabolizável
Pmic	Proteína Microbiana
PML	Proteína Microbiana Derivada de Levedura
PNDR	Proteína Não Degradável no Rúmen
ST	Sólidos Totais
TCO_2	Dióxido de Carbono Total
ULL	Ureia de Liberação Lenta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1 Fontes nitrogenadas utilizadas pelos ruminantes 19
2.2 Exigências proteicas para vacas em lactação 23
2.2.1 Proteína bruta 25
2.2.2 Proteína degradável no rúmen e proteína microbiana 28
2.2.3 Proteína não degradável no rúmen 32
2.2.4 Proteína metabolizável 34
2.2.5 Exigência em aminoácidos 35
2.3 Compostos nitrogenados no leite e no sangue 36
2.4 Parâmetros sanguíneos 38
2.5 Balanço de nitrogênio 42
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS 44
3.1 Hipótese 44
3.2 Objetivo 44
4 MATERIAL E MÉTODOS 44
4.1 Local e animais 44
4.2 Dieta basal e tratamentos 45
4.3 Delineamento experimental 48
4.4 Medições e amostragens 48
4.5 Análises laboratoriais 51
4.6 Análises estatísticas 54
5 RESULTADOS 54
5.1 Consumo de MS 54
5.2 Produção de leite 55
5.3 Eficiência de produção 56
5.4 Composição do Leite 57

5.5 Parâmetros sanguíneos 61

5.6 Balanço nitrogenado 63

6 DISCUSSÃO 67

6.1 Consumo de MS 67

6.2 Produção de leite e eficiência 69

6.3 Composição do leite 70

6.4 Parâmetros sanguíneos 75

6.5 Balanço nitrogenado 80

7 CONCLUSÕES 82
8 REFERÊNCIAS 84
9 ANEXO 97

1 INTRODUÇÃO

Os produtores de leite do país estão encontrando cada vez mais dificuldades para permanecerem na atividade leiteira devido às pressões advindas, principalmente, do mercado externo. A busca pela competitividade, sustentabilidade e consolidação na atividade leiteira levam à necessidade da adoção de tecnologias que melhorem a produtividade do rebanho e a qualidade do leite, características imprescindíveis para reequilibrar os custos e garantir o valor comercial do produto. Desta forma, a pecuária leiteira caminha com foco na modernidade e competitividade utilizando permanentemente a tecnologia como um caminho para a sustentabilidade.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abasteciemento em 2013, realizou projeções de longo prazo, até os anos de 2022/2023, nos agronegócios brasileiros, e o leite foi considerado como um dos produtos com maiores possibilidades de crescimento. O crescimento anual previsto na produção de leite foi de 1,9% que corresponde a um aumento na produção ao final do período de 41,3 bilhões de litros de leite cru, ou seja, 20,7% maior do que a produção de 2013 (BRASIL, 2013).

De acordo com dados adaptados da (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2013), em 2011 o Brasil já era o 4º maior produtor de leite do mundo, incluindo leite de vaca, búfala, camelo, cabra e ovelha, totalizando aproximadamente 32 milhões de toneladas de leite produzido. Em 2013, se manteve na posição produzindo em torno de 34 milhões de toneladas de leite. Atualmente o Brasil encontra-se em ascensão podendo se tornar o 3º maior produtor de leite do mundo. Desta forma, o leite e seus derivados fazem uma importante contribuição nutricional para a humanidade, além do aporte de energia, proteínas, minerais e vitaminas, o leite se destaca pelo valor biológico destes componentes, principalmente da proteína (CAMPBELL, 2007). O crescimento da população mundial aumenta a demanda por produtos de valor nutritivo elevado, portanto, o leite e seus derivados continuarão a serem alimentos presentes na dieta da maior parte da população mundial.

Com o grande potencial e possibilidade de expansão no sistema de produção, a intensificação no sistema de produção de leite do Brasil, baseado na utilização de dietas totais com uso de forragens conservadas e concentrados, envolvem animais com elevado potencial genético e a adequação do manejo desses animais com a sanidade e bem estar, mas principalmente, com a alimentação. Neste contexto, a nutrição proteica das vacas leiteiras tem

grande importância devido à sua influencia direta na produção de leite, nos índices reprodutivos e no custo da alimentação.

Desta forma a alimentação animal é o principal fator que afeta o custo da exploração leiteira, sendo a proteína um dos nutrientes que mais onera o custo da alimentação (IMAIZUMI, 2005). Assim o uso da proteína deve ser criterioso, considerando-se não somente sua quantidade na dieta como também a sua degradabilidade no rúmen, uma vez que para os ruminantes o valor da proteína ingerida pelo animal não é determinado pela sua composição em aminoácidos, pois as proteínas ingeridas, assim como outros nutrientes, estão sujeitas ao ataque pela população microbiana do rúmen e podem sofrer uma intensa degradação e síntese antes de passar para o abomaso e intestino delgado, onde serão digeridos e absorvidos.

Durante muitos anos, a proteína bruta foi o principal parâmetro usado para determinação das exigências proteicas na formulação de dietas para vacas leiteiras. Contudo à medida que a produção de leite por vaca nos rebanhos dos países desenvolvidos praticamente dobrou nos últimos 30 anos, chegando a produções médias anuais por vaca de 9000 a 14000 kg de leite e como o rúmen sozinho não é capaz de suprir a proteína necessária para a manutenção corporal e síntese de leite, aumenta-se assim a importância da fonte proteica da dieta.

Com o objetivo de atender as exigências proteicas decorrentes desse aumento de produção de leite, o conhecimento e o controle da taxa e da extensão de degradação da proteína dietética no rúmen, bem como da digestão intestinal da proteína não degradável no rúmen, tem despertado grande interesse nos nutricionistas de ruminantes nas últimas décadas.

De acordo com Kalscheur et al. (2006), uma das metas na nutrição de ruminantes é fornecer a quantidade adequada de proteína degradável no rúmen para melhorar a eficiência dos microrganismos ruminais e obter máxima produção de proteína microbiana, além da complementação da proteína metabolizável com a proteína não degradável no rúmen. Maximizar a síntese de proteína microbiana com teores adequados de proteína degradável no rúmen pode possibilitar a redução na quantidade de proteína bruta da dieta sem afetar a produção de leite das vacas. Além disso, melhora a eficiência do nitrogênio alimentar, reduz os custos da produção do leite, maximiza o desempenho da vaca e minimiza a poluição ambiental decorrente da excreção de nitrogênio.

O desbalanço entre o teor de proteína e de energia na dieta, além de aumentar o custo da alimentação, aumenta a exigência em energia necessária para excreção do nitrogênio, tornando os ruminantes menos eficientes no uso do nitrogênio dietético. Além dos aspectos de

produção, aumentam os problemas resultantes da excreção de doses excessivas de nitrogênio para o meio ambiente.

Uma das ferramentas que possibilitam melhorar o aproveitamento protéico pelos ruminantes é a proteína microbiana derivada de levedura (PML), fonte de proteína similar à microbiana, com nome comercial Demp® (sigla em inglês significando *dietary escape microbial protein*) desenvolvido pela Alltech Inc. Nicholasvile, KY, EUA, concebida para fornecer proteína de alta qualidade e proporcionar um melhor balanço de aminoácidos essenciais para a vaca leiteira. Além disso, a utilização da PML permite uma redução da proteína bruta total na dieta, aumentando a produção e os componentes totais do leite, melhorando os parâmetros reprodutivos e reduzindo as perdas de nitrogênio.

A PML, segundo o fabricante, é capaz de fornecer para as vacas uma proteína com composição semelhante em aminoácidos ao da proteína microbiana que é sintetizada no rúmen. Esse produto foi projetado para criar uma fonte proteica tão eficiente quanto à proteína microbiana sendo uma eficiente fonte de aminoácidos para a produção de leite. Além disso, devido à eficiencia com que supre as exigências das vacas em lactação, é possível reduzir os níveis de proteína bruta na dieta, mantendo elevadas a produção de leite e a fertilidade dos animais.

Outro produto, também desenvolvido pela Alltech Inc. Nicholasvile, KY, EUA, denominado Optigen®, é uma ureia de liberação lenta (ULL) na qual existe uma barreira física composta por ceras de vegetais que conferem proteção a ureia reduzindo a velocidade de liberação de N no rúmen. A utilização de uma fonte de nitrogênio não proteico de liberação lenta no rúmen pode ser uma alternativa para diminuir a utilização das fontes de proteína verdadeira e da ureia pecuária nas dietas para ruminantes, com as vantagens de diminuir os riscos de intoxicação com a ureia, aumentar o espaço para inclusão de ingredientes na dieta, substituir as fontes de proteína verdadeira de alto custo bem como aquelas com disponibilidade limitada, podendo ainda melhorar o sincronismo de nutrientes no rúmen, sem comprometer o desempenho produtivo das vacas leiteiras.

Espera-se que o uso de uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura, combinado a uma ureia de liberação lenta, proporcione proteína verdadeira e nitrogênio não proteico respectivamente, complementando as quantidades de N necessárias e no rúmen possam melhorar a nutrição dos diferentes grupos de microrganismos ruminais, maximizando a produção de proteína microbiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fontes nitrogenadas utilizadas pelos ruminantes

As fontes de compostos nitrogenados utilizadas na alimentação de ruminantes são classificadas basicamente como fontes de nitrogênio proteico e de nitrogênio não proteico (NNP).

Os farelos de soja e de algodão são as fontes proteicas mais utilizadas na nutrição de vacas leiteiras, apresentando um bom perfil de aminoácidos, ricos em lisina demonstrando uma leve deficiência em metionina.

No Brasil o farelo de soja, subproduto proveniente da extração de óleo dos grãos, é a principal fonte proteica utilizada para composição de dietas para vacas leiteiras suplementadas com concentrado. No entanto, pelo fato da soja ser uma *commodity* agrícola e do Brasil ser um grande produtor e exportador deste grão, seu preço oscila de acordo com o mercado internacional, refletindo, consequentemente, nos preços de seus subprodutos. Se for acompanhada a evolução dos preços do farelo de soja (Figura 1) nos últimos anos é possível observar que a inclusão deste ingrediente, bem como de seus subprodutos pode resultar, muitas vezes, em um maior custo dietético. Aliado a isso, existem demandas crescentes da soja na avicultura, na suinocultura intensiva, na alimentação humana e também na indústria energética para produção de biocombustíveis.

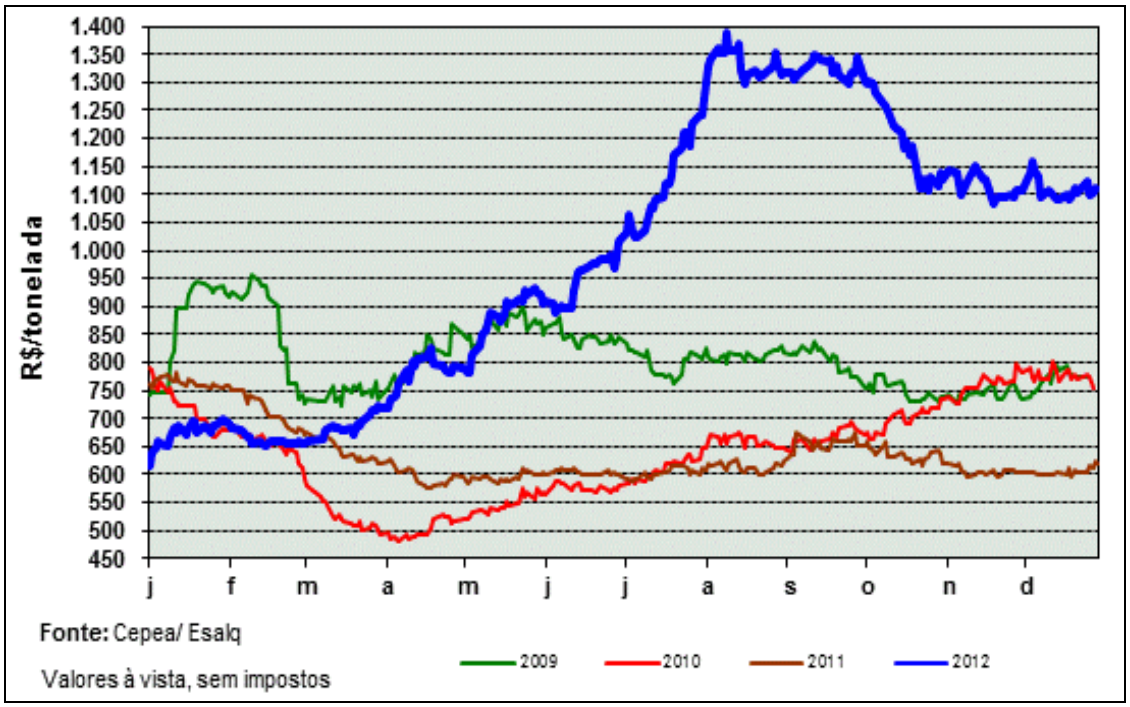


Figura 1 – Evolução do preço do farelo de soja CEPEA / ESALQ – Campinas – SP.

A busca pela utilização de outras fontes proteicas em substituição ao farelo de soja, desde que não comprometa o desempenho animal, pode ser uma estratégia para a redução dos custos dietéticos dos rebanhos leiteiros. No entanto, essas fontes proteicas alternativas devem ser eficientes, seguras e econômicas, permitindo desempenhos produtivos similares aos dos animais alimentados com dietas tradicionais (PINA et al., 2006).

A substituição da proteína vegetal por fontes de NNP pode ser uma alternativa para reduzir a competição entre humanos e animais por fontes proteicas.

Uma das principais fontes de NNP utilizadas na alimentação de ruminantes, com o objetivo de suprir parte da proteína degradável no rúmen, de baixo custo quando comparada a outras fontes de nitrogênio e capaz de promover uma maior digestibilidade melhorando o aproveitamento de alimentos fibrosos é a ureia.

A ureia possui características específica tais como: ser desprovida de valor energético, ser solúvel e rapidamente hidrolisada pela ação da urease (sintetizada pelas bactérias) produzindo amônia ($N\text{-}NH_3$) e dióxido de carbono (CO_2) no interior do rúmen (MAYNARD et al., 1984). A amônia é a principal fonte de nitrogênio para a síntese proteica no rúmen. Os microrganismos do rúmen incorporam a amônia nos esqueletos carbônicos dando origem aos aminoácidos utilizados para a síntese de proteína microbiana. Apesar de os protozoários produzirem amônia, eles não a utilizam como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína.

Os fatores determinantes para a transformação da ureia em proteína são a disponibilidade de energia e a velocidade de liberação da amônia no rúmen. Assim, para que o uso da ureia pelos ruminantes seja eficiente, alguns cuidados precisam ser tomados como: utilizar a dose correta e homogeneizá-la adequadamente no concentrado, volumosos ou mistura total a fim de evitar problemas de intoxicação ao ruminante; garantir disponibilidade de energia adequada para que as bactérias consigam utilizar a ureia para a síntese de proteína microbiana e adequação mineral da dieta, principalmente quanto ao enxofre, para que a síntese de aminoácidos sulfurados não seja limitada.

No passado, utilizava-se fixar as doses máximas de ureia para as vacas. Porém, com o desenvolvimento dos sistemas proteicos que permitem balancear a dieta de acordo com a degradabilidade da proteína, isso entrou em desuso. Desta forma, a adequação no teor de proteína degradável no rúmen deve ser o critério determinante para se ajustar a dose de ureia adequadamente (SANTOS, 2006).

Uma fonte segura e eficaz de nitrogênio não proteico para os microrganismos do rúmen é a ULL que pode suprir nitrogênio às bactérias ruminais em uma velocidade que aperfeiçoa sua conversão em proteína microbiana, minimiza os riscos de intoxicação, pode

estimular o crescimento das bactérias que utilizam fibras e criar mais espaço para inclusão de fibra digerível e energia na ração (AKAY et al., 2004).

Segundo Akay et al. (2004), a ureia encapsulada com polímero ou ULL, confere um tempo de degradação da ureia em até 16 horas, sendo a sua solubilização lenta e constante no ambiente ruminal. Os mesmos pesquisadores avaliaram a utilização *in situ* do nitrogênio da ULL com a ureia e a soja em grãos e encontraram que a ULL seguiu um padrão mais semelhante ao da soja do que ao da ureia, com uma velocidade intermediária de utilização durante as primeiras 16 horas de fermentação ruminal, seguindo-se uma velocidade mais lenta de utilização até 30 horas após esse período. Esse padrão de utilização em duas fases para a ULL assemelhou-se ao observado para a soja.

Em avaliações com fermentadores *in vitro*, o uso de ureia encapsulada permitiu maior síntese de proteína microbiana e utilização mais rápida de nutrientes em relação à dieta controle, aumentando a utilização das fibras em detergente ácido (FDA) em 16,6%, da fibra em detergente neutro (FDN) em 6,8%, dos carboidratos (CHO) totais em 4% e da matéria orgânica (MO) em 8,0% (AKAY et al., 2004).

A proteína microbiana se destaca pelo alto valor nutricional, sendo que, dentre as fontes proteicas utilizadas pelos ruminantes, é a que apresenta um perfil de aminoácido mais semelhante ao perfil presente no leite e nos músculos, isto é, aqueles aminoácidos exigidos pelo animal (SCHWAB, 1994). A proteína microbiana também representa a principal porção de proteína bruta que chega ao intestino das vacas em lactação (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001).

Uma complementação proteica de alto valor nutricional é a PML que é uma fonte de proteína com composição em aminoácidos similar a proteína microbiana (Tabela 1). Desta forma, a PML é capaz de escapar parcialmente da degradação ruminal, devido à sua capacidade de se movimentar com a fase líquida no rúmen e assim fornecer proteína de alta qualidade ao ruminante, visto que, o rúmen sozinho não é capaz de atender às exigências para vacas em crescimento e de alta produção.

A proteína microbiana contém 15,8 e 5,2% do total de aminoácidos essenciais referentes à lisina e metionina respectivamente, enquanto que a PML contém 16,0 e 3,6% do total de aminoácidos essenciais como lisina e metionina respectivamente (SABBIA et al., 2012).

Essa capacidade que a PML tem em mover-se pela fase líquida do rúmen e escapar parcialmente da degradação ruminal, permite fornecer para a vaca em lactação um perfil de aminoácidos de alta qualidade para a produção de leite.

Tabela 1 – Perfil de aminoácidos essenciais das bactérias ruminais, da PML e do farelo de soja.

AAE[1]	% PB		
	PML[2]	Farelo de Soja[3]	Proteína Microbiana[4]
Met	2,8	1,5	2,6
Lys	8,2	6,3	7,9
Arg	7,0	7,4	5,1
Thr	5,6	4,0	5,8
Leu	7,5	7,8	8,1
Ile	5,9	4,6	5,7
Val	6,2	4,7	6,2
His	2,7	2,8	2,0
Phe	5,2	5,3	5,1
Trp	1,6	1,3	1,4
Total	**52,6**	**45,5**	**49,9**

[1]AAE = Aminoácidos Essenciais: Arg = Arginina; His = Histidina; Ile = Isoleucina; Lys = Lisina; Met = Metionina; Phe = Fenilalanina; Thr = Treonina; Trp = Triptofano; Val = Valina.
[2]PML = Proteína Microbiana derivada de Levedura. Análises realizadas pelo Olson Agricultural Analytical Services Lab, South Dakota State University (Brookings, SD).
[3]NRC, 2001.
[4]Clark et al., 1992.

Entretanto a suplementação com PML na dieta de vacas em lactação requer considerações especiais quando forem formuladas. Por exemplo, o NRC (2001) subestima a taxa de passagem e a fração proteica não degradável no rúmen da PML e superestima sua fração proteica degradável no rúmen, tempo de retenção ruminal e produção de proteína microbiana (SABBIA et al., 2012). O NRC (2001) prevê uma taxa de passagem de cerca de 7%/h para PML que é subestimada porque PML tem uma taxa de passagem muito semelhante ao da fase líquida ruminal.

A sincronização entre a proteína degradável no rúmen e energia é importante para aperfeiçoar o crescimento microbiano, a digestibilidade ruminal, a eficiência na utilização de energia e proteína e a produção de leite (HERRERA-SALDANA et al., 1990). Assim, para a utilização da PML, é necessário atender as exigências ruminais de nitrogênio e energia, para obter a máxima eficiência microbiana.

De acordo com Sabbia et al. (2012), utilizando 16 vacas da raça Holandês em lactação (12 multíparas e 4 primíparas), com média de 40 kg de leite/vaca/dia, distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos com níveis crescentes de PML (0 g, 300 g, 600 g e 900 g) e usando um delineamento de quadrado latino 4x4, verificou-se que a utilização de 300 g de PML equivalente a 1,14% da matéria seca da dieta de vacas leiteiras de alta produção pode melhorar a produção e a composição do leite, com redução nas perdas de nitrogênio. Esses

autores não encontraram diferença na produção de leite com a utilização de PML, mesmo obtendo um aumento de 1,2 kg de leite por vaca por dia.

2.2 Exigências proteicas para vacas em lactação

A exigência metabólica dos ruminantes, quanto à nutrição proteica, não é por proteína bruta (PB), proteína não degradável no rúmen (PNDR) ou por proteína degradável no rúmen (PDR), oferecida através de diferentes fontes de nitrogênio não proteico, mas sim por quantidades suficientes de cada um destes nutrientes para fornecer substrato para a síntese de proteína microbiana (Pmic), que compõe a proteína metabolizável (PM) (SANTOS, 2006) (Figura 2).

Os ruminantes têm uma digestão altamente desenvolvida e especializada, caracterizada pela retenção e fermentação pré-gástrica a qual ocorre principalmente no rúmen. Através de uma associação simbiótica com os microrganismos, os ruminantes têm melhor acesso à energia oriunda de alimentos fibrosos do que a maioria dos outros herbívoros (VAN SOEST, 1994). Esta forma única de digestão permite aos ruminantes converter os nutrientes dos alimentos não utilizáveis pelos não ruminantes, em produtos de alto valor nutritivo, tais como leite e carne. Além disso, os ruminantes têm a capacidade de utilizar a proteína dietética de baixa qualidade, como o NNP e o nitrogênio reciclado para o rúmen, e produzir proteína de alta qualidade como a Pmic. A quantidade de Pmic também depende da quantidade de energia disponível para os microrganismos.

No início da lactação, a ingestão de energia e nitrogênio é muitas vezes menor do que a necessária para suportar as altas taxas para produção de proteína no leite. Nestas circunstâncias, a proteína do tecido corporal é utilizada para suplementar a dietética e a Pmic e permitir que os aminoácidos atinjam o intestino delgado mantendo um fornecimento adequado de aminoácidos para a glândula mamária e carbono para a gluconeogênese no fígado (BEQUETTE; BACKWELL; CROMPTON, 1998). Embora as necessidades proteicas das vacas em lactação possam ser expressas como uma porcentagem da PB da dieta, na verdade é a quantidade de PM fornecida para o intestino delgado pela Pmic e pela PNDR e o seu perfil de aminoácidos essenciais, que realmente determina o rendimento e a composição do leite (NRC, 2001).

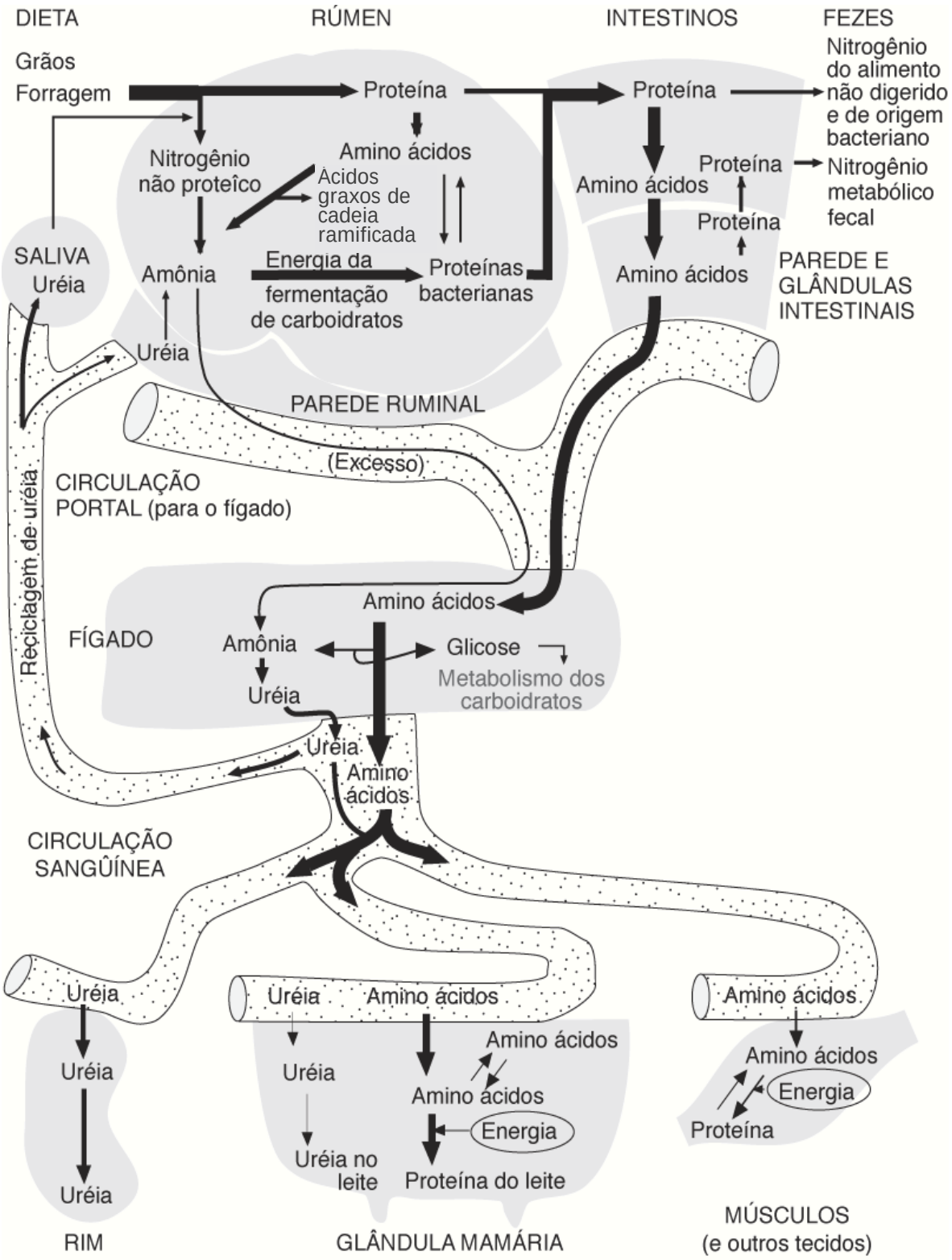


Figura 2 – Metabolismo proteico em bovinos leiteiros.
Fonte: Disponível em: http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/pt/de_05.pt.pdf, acessado 07 maio 2014.

A nutrição proteica é uma ciência complexa, particularmente em vacas de alta produção. Além disso, as atuais restrições econômicas e ambientais exigem dos nutricionistas balancearem dietas com baixos teores de PB. Isso implica em aperfeiçoar o crescimento microbiano no rúmen, no fornecimento de quantidade adequada de PNDR para atingir níveis suficientemente altos de PM para suportar a produção de leite e, ainda, reduzir a excreção de nitrogênio melhorando de maneira geral o uso do nitrogênio pela vaca.

2.2.1 Proteína bruta

As proteínas são nutrientes orgânicos basicamente compostos por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio presentes em todas as células vivas dos organismos. São grandes moléculas, polímeros de aminoácidos, ligadas por ligações peptídicas.

O teor de proteína de um alimento é mensurado a partir do teor de nitrogênio presente na amostra analisada em que a porcentagem de nitrogênio obtida é multiplicada por 6,25 e expressa como proteína bruta. Este fator é derivado da porcentagem média de nitrogênio das proteínas dos alimentos, e pode resultar em erros apreciáveis principalmente se a origem do nitrogênio for de um material não proteico ou de proteínas de composição incomum (AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION, 2007).

A análise do teor de PB é baseada no fato de que todas as proteínas possuem 16% de nitrogênio, e que todo nitrogênio do alimento está na forma proteica. Porém, o conteúdo de PB dos alimentos inclui nitrogênio proteico e nitrogênio não proteico, portanto, alguns ingredientes, como ureia (46% N; 287% proteína bruta equivalente), tem um grande impacto na PB dietética quando é incluída na dieta.

Estudos mostraram que a produção de leite pode ser facilmente aumentada pelo aumento na concentração da PB da ração. Gardner e Park (1973) relataram um aumento na produção de leite e sólidos não gordurosos quando a proteína bruta dietética aumentou de 13,2 para 15,5%. Cressman et al. (1980) mostraram resultados semelhantes em vacas multíparas quando grãos úmidos de milho foram substituídos por farelo de soja aumentando a PB da dieta de 12,4 para 17,7%. No entanto, a produção média diária de leite em primíparas não foi afetada pelo aumento de PB na dieta. Da mesma forma, a resposta na produção foi mostrada na segunda e terceira lactações, mas não na primeira lactação quando rações continham 15 a 16% em comparação com as de 12% de PB (ROFFLER et al., 1978). A resposta marcadamente diferente para suplementação proteica na produção de leite entre a primíparas e multíparas foi inexplicável.

Kung e Huber (1983) suplementaram vacas em lactação com dietas contendo 11,3, 14,5 e 17,5% de PB e observaram que a produção de leite e a ingestão de matéria seca aumentaram com o aumento no teor de proteína. A diferença foi maior entre 11,3 e 14,5% do que entre 14,5 e 17,5%. Tratamentos similares foram usados por Edwards, Bertley e Dayton (1980) que compararam rações com três diferentes teores de PB, 13, 15 e 17%. Os resultados também foram semelhantes aos descritos por Kung e Huber (1983). Houve um aumento na produção de leite entre os tratamentos com 13 e 15% de PB e não houve diferença entre os tratamentos com 15 e 17%. Uma resposta amplamente documentada é um menor retorno na produção de leite a teores já elevados de PB (NRC, 2001).

Roffler, Wray e Satter (1986) estudaram as respostas dos aumentos nas concentrações de PB da dieta na produção de leite e consumo de matéria seca de vacas em lactação. O conjunto de dados dos 17 estudos publicados era composto basicamente por dietas com milho grão, silagem de milho e feno de alfafa onde a PB na dieta era aumentada com farelo de soja de 9,5 a 20,2%. O modelo exponencial desenvolvido previu um aumento na produção de leite de 1,6 $kg.dia^{-1}$ quando a PB aumentou de 12 para 13% e apenas 0,20 $kg.dia^{-1}$ quando se aumentou de 18 para 19%. Houve também uma resposta na ingestão de matéria seca que diminuiu quando a PB na dieta aumentou. Em 2001, o comitê de leite do NRC realizou uma análise de regressão multivariada usando um conjunto de dados de 82 estudos proteicos. Este estudo resultou em uma equação que prediz respostas na produção de leite de 0,75 $kg.dia^{-1}$ quando a PB aumentou de 15 para 16% e 0,35 $kg.dia^{-1}$ quando o aumento foi de 19 para 20%. Uma máxima produção de leite é alcançada com 23% de proteína bruta na dieta. Usando um conjunto maior de dados e uma metodologia diferente do NRC (2001), Ipharraguerre e Clark (2005) utilizaram um banco de dados de 112 estudos publicados entre 1981 e 2003 e previram um aumento de 0,94 e 0,42 $kg.dia^{-1}$ quando a PB aumentou de 15 para 16% e de 19 para 20 %, respectivamente. Da mesma forma que os resultados reportados pelo NRC (2001), a produção de leite máxima foi atingida em 22,8% de PB.

Desta forma, recomenda-se cuidado na interpretação desses dados. Embora a produção de leite possa ser aumentada em dietas com concentrações extremamente elevadas de PB, os custos econômicos e ambientais devem ser avaliados e comparados com os de dietas de menor teor proteico.

Na revisão dos estudos do NRC (2001), o aumento na produção de leite com o aumento no teor de PB da ração não esteve correlacionado com aumento no consumo de matéria seca. Efeito positivo do aumento do teor de PB da ração no consumo de matéria seca é esperado quando a ração é deficiente em proteína degradável do rúmen. Essa ocorrência é

mais comum em rações com teores de PB abaixo de 15%, mesmo assim, há inconsistência nos dados (SANTOS; PEDROSO, 2011).

Ipharraguerre e Clark (2005) também verificaram que a relação entre produção de leite e teor de PB na dieta é variável, o que indica que a PB por si só não é um bom indicador para ser utilizado na formulação da dieta. Fatores que influenciam essa relação envolvem principalmente a disponibilidade de energia para utilização da proteína degradada no rúmen para síntese de proteína metabolizável e o perfil de aminoácidos da proteína não degradável no rúmen. Entretanto, as respostas também dependem do estágio de lactação e do nível de produção das vacas.

Olmos Colmenero e Broderick (2006) substituíram o milho em grão de alta umidade pelo farelo de soja para aumentar a PB de 13,5 para 19,4%. A produção de leite e o teor de proteína apresentaram tendências de respostas quadráticas para proteína bruta na dieta, atingindo um máximo de 16,5% de proteína. Por outro lado, alantoína, nitrogênio ureico do leite e nitrogênio ureico do sangue aumentaram linearmente com o aumento da proteína. Os resultados desta pesquisa mostraram que a maior eficiência (nitrogênio do leite/nitrogênio ingerido) foi alcançada quando as vacas foram alimentadas com dietas contendo 16,5% de PB.

Para atender as exigências de nitrogênio de vacas leiteiras era necessário, no passado, balancear as dietas utilizando o conceito de PB. Mas, como já enfatizado, o balanço de proteína bruta não leva em conta as proporções relativas de proteína e de nitrogênio não proteico, a taxa e extensão da degradação proteica no rúmen, a digestibilidade intestinal e a composição dos aminoácidos da proteína não degradável no rúmen (NRC, 2001).

Santos e Pedroso (2011) relataram que no Brasil, a maior parte do leite produzido ainda é proveniente de sistemas de produção que utilizam pastagens tropicais manejadas de forma inadequada, isto é, em pastos com baixa relação folha/colmo e não adubados. Nessas condições, a gramínea tropical, independente da espécie, apresenta baixo teor de PB. Para corrigir essa deficiência, faz-se necessário suplementar a vaca com concentrados com teores de PB entre 16 a 24%, dependendo da dose e da produção da vaca. Entretanto, quando essas pastagens são manejadas corretamente e adubadas para permitirem altas taxas de lotação, os teores de PB na matéria seca da forragem colhida pela vaca variam de 12 a 22%. Esses teores de PB são determinados pelo ponto ideal de colheita, mas principalmente pela dose de N aplicado no pasto. Nestas condições, o teor de PB do concentrado deve ser ajustado para evitar excesso de PB para a vaca, aumentando os custos de produção e os danos causados pela excreção ao meio ambiente.

Danés (2010) conduziu um trabalho com vacas no terço médio de lactação com produções de até 22,8 kg de leite.dia^{-1} mantidas em pastagens de capim-elefante com 18,5% de PB e as mesmas não responderam a mais do que 9,5% de PB (% da matéria seca) no concentrado (milho moído e mistura mineral). Esse resultado é próximo ao predito pelo NRC (2001).

Assim, a sustentabilidade da produção de leite, econômica e ambientalmente, é muito difícil de conseguir baseado em PB, por isso, é necessário ser mais preciso em definir as exigências proteicas das vacas leiteiras.

2.2.2 Proteína degradável no rúmen e proteína microbiana

A proteína bruta dos alimentos que é degradada no rúmen fornece uma mistura de peptídeos, aminoácidos livres e amônia para o crescimento microbiano e síntese de proteína microbiana. Os microrganismos do rúmen degradam as proteínas em aminoácidos, que podem ser diretamente incorporados em proteína microbiana quando a energia adequada está disponível, ou desaminada para ácidos graxos voláteis, dióxido de carbono e amônia (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). A eficiência em utilizar a proteína bruta dietética requer a seleção de proteínas complementares da alimentação e de suplementos de nitrogênio não proteico capazes de fornecer as quantidades adequadas de proteína degradável no rúmen a fim de suprir as necessidades de nitrogênio dos microrganismos ruminais.

A microbiota ruminal é basicamente composta por bactérias, protozoários e fungos e a fermentação dos alimentos depende da atividade que cada um destes exerce no rúmen. Considerando que as bactérias são os microrganismos com taxa metabólica mais elevada, estas serão, portanto, influenciadas de modo proporcionalmente mais intenso do que os protozoários e fungos ruminais (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2006).

A quantidade de proteína microbiana que pode ser sintetizado no interior do rúmen é limitada pela energia disponível para os microrganismos e da eficiência com que eles utilizam essa energia, e não somente da quantidade e da natureza do substrato presente no rúmen (HUNGATE, 1966; CHURCH, 1988).

Stokes et al. (1991) sugerem que teoricamente o nitrogênio bacteriano e a eficiência bacteriana continuarão a aumentar com o aumento da proteína degradável no rúmen na dieta, desde que os carboidratos não sejam limitantes. No entanto, melhorar a formulação de dietas para atender, mas sem ultrapassar a exigência de proteína degradável no rúmen pelos microrganismos melhora o crescimento microbiano, reduz a excreção de nitrogênio e melhora de modo geral a utilização do nitrogênio pela vaca (KALSCHEUR et al., 2006).

A identificação da função do nitrogênio não proteico na alimentação dos ruminantes e a importância que a microbiota do rúmen tem na utilização do mesmo, ocorreram no final do século XIX.

A suplementação com nitrogênio não proteico, além de fornecer amônia para a síntese de proteína microbiana (principalmente as bactérias) a custo reduzido (kg de N), apresenta outras vantagens tais como a ação tamponante no rúmen de forma a manter o pH ruminal em faixa mais adequada para a digestão da celulose, altera o hábito alimentar aumentando a frequência de refeições, resultando em um possível incremento na eficiência energética da dieta (HUBER, 1994). Algumas bactérias ruminais tais como, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides amylophilus*, *Methanobacterium ruminatium*e, *Eubacterium ruminatium* utilizam amônia para síntese de proteína, mesmo quando há presença de proteína verdadeira (HUNGATE, 1966). Outra vantagem da utilização do NNP é sua contribuição para a sustentabilidade do sistema de forma a minimizar a excreção de resíduos nitrogenados para o meio ambiente (TAMMINGA, 1996).

A ureia é a fonte de nitrogênio não proteico mais utilizado na alimentação de ruminantes, apresentando rápida liberação da amônia no rúmen e acima da capacidade de utilização pelos microrganismos (GOLOMBESKI et al., 2006). De acordo com Russell et al. (1992) para que os microrganismos utilizem adequadamente a amônia, devem-se fornecer fontes proteicas e energéticas que tenham sincronia na degradação, a fim de se evitar perda de nitrogênio amoniacal pelo excesso de sua liberação, redução na degradação do alimento e na produção microbiana. Isto irá levar a uma sobrecarga do nitrogênio amoniacal no fígado e maior gasto de energia para excreção de ureia, além dos riscos de intoxicação para o ruminante (NEWBOLD; RUST, 1992).

Rações para vacas leiteiras com produções superiores a 35 kg de leite.dia^{-1}, que recebem farelo de soja ou de algodão como principal suplemento proteico, geralmente apresenta excesso de PDR quando se busca adequar o suprimento de proteína metabolizável. Neste caso, dificilmente se justifica o uso de ureia. Porém, em vacas com produções inferiores a 35 kg de leite.dia^{-1} e animais de corte a partir de determinada fase de crescimento e na fase de terminação, são capazes de utilizar ureia com grande eficiência quando esta é adicionada à ração na dose correta (SANTOS, 2006).

Santos, Huber e Theurer (1998) realizaram uma revisão de literatura e compararam 23 trabalhos em que a proteína verdadeira da ração foi substituída parcial ou totalmente pela ureia. A produção de leite não foi afetada em 17 estudos, aumentou em 2 e diminuiu em

apenas 4. O teor de proteína do leite não foi afetado em 18 estudos e aumentou em 5. A produção média foi de 34 kg de leite.dia^{-1} para as vacas alimentadas com rações sem adição de ureia e de 34,3 kg para as alimentadas com ureia, mostrando que para este nível de produção, a inclusão de fontes de NNP não prejudicou a produção.

Carareto (2007) avaliou o efeito do uso da ureia para vacas em lactação e não encontrou diferença na produção de leite de vacas recebendo silagem de milho quando 30% da PB do farelo de algodão foi substituído pela ureia.

Pesquisadores têm relatado que a utilização do nitrogênio não proteico reduz a ingestão de matéria seca e vários mecanismos têm sido propostos para explicar tal redução. Oba e Allen (2003) trabalharam com infusão intrarruminal de amônia através do propionato de amônio, propionato de potássio e propionato de sódio e encontraram que o propionato de amônio reduziu o consumo quando comparado ao propionato de sódio e potássio em 11, 14 e 13,9 kg respectivamente. O número de refeições em um período de 12 horas foi 5,6; 8,0 e 7,2, para o propionato de amônio, sódio e potássio respectivamente. O intervalo entre as refeições também foi afetado, sendo 105, 72,8 e 73,9 minutos para o propionato de amônio, sódio e potássio, respectivamente. Não houve efeito no tempo de duração das refeições.

Silva, Valadares e Valadares Filho (2001) e Oliveira, Valadares e Valadares Filho (2001) utilizando níveis crescentes de ureia na ração (0; 0,70; 1,4 e 2,1%), também verificaram uma diminuição no consumo de alimentos e na produção de leite de vacas das raças Girolando e Holandês respectivamente.

Imaizumi et al. (2006), substituíram parcialmente o farelo de soja por ureia (1% na MS da ração total) em dietas de vacas em lactação alimentadas com fonte de amido de alta degradabilidade ruminal (milho processado na forma de resíduo industrial de pipoca doce) e encontraram que o consumo de MS não foi afetado, porém a produção de leite foi menor para vacas alimentadas com ureia.

Com a implantação de novas tecnologias, ao decorrer dos últimos anos foram desenvolvidos produtos que visam o controle da liberação de NNP, com intuito de reduzir os custos das dietas, melhorar a conversão do nitrogênio em proteína microbiana e minimizar os riscos de intoxicação. Desta forma, o Optigen®, uma ureia encapsulada por uma cera, é capaz de liberar lentamente o nitrogênio amoniacal por até 24 a 36 horas após sua ingestão, proporcionando um melhor sincronismo com a liberação de energia da dieta, tornando mais eficiente a conversão do nitrogênio em proteína microbiana (AKAY et al., 2004).

Vargas e Ishler (2008) avaliaram o efeito da substituição de 900 g do farelo de soja tratado e de 500 g de farelo de canola por 112 g de ULL com base na MS. A dieta controle era

composta por 50% de forragem e 16% de PB, enquanto que as dietas que continham a ULL, constituídas por 53% de forragem e 15,5% de PB. Não houve diferença na produção de leite (P=0,11) dos animais que receberam os tratamentos, porém houve um aumento de 1,15 kg de leite na produção dos animais que receberam tratamentos com a ULL.

A proteína microbiana sintetizada no rúmen normalmente fornece a maior parte dos aminoácidos que passam para o intestino delgado (NRC, 2001) e com isso, ela se destaca pelo alto valor nutricional, pois dentre as fontes proteicas utilizadas pelos ruminantes é a que apresenta o perfil de aminoácidos mais semelhantes aos presentes na carne e no leite (SCHWAB, 1994). Assim, a síntese de proteína microbiana deve ser maximizada em todo programa nutricional de ruminantes, já que pode representar mais de 50% da proteína metabolizável que chega ao intestino das vacas de alta produção (SANTOS, 2006).

Quando a síntese ruminal de proteína microbiana está sendo maximizada, é possível obter ganhos no aporte de proteína metabolizável para o animal através da suplementação com fontes proteicas ricas em proteína não degradável no rúmen, desde que estas fontes também tenham bom perfil de aminoácidos. De qualquer forma, a maximização da síntese de proteína microbiana é fundamental para se produzir leite com elevado teor de proteína (MATTOS; PEDROSO, 2005).

De acordo com Church (1988), o nitrogênio não-amoniacal que entra no intestino delgado compreende cerca de 40% de proteína bruta microbiana em dietas com alto teor de proteína dietética, ao redor de 60% em dietas com baixo teor de proteína, e 100% em dietas exclusivas com nitrogênio não proteico. Da mesma forma, Clark, Klusmeyer e Cameron (1992) resumiram inúmeros tratamentos a partir da literatura indicando que o nitrogênio microbiano supriu em média 59% do nitrogênio não amoniacal que passou para o intestino delgado com uma taxa de 34 a 89%.

Recentemente Huhtanen e Hristov (2009) publicaram um artigo de revisão com um conjunto de dados maior, incluindo 739 dietas da América do Norte, e 998 dietas do norte da Europa. Os autores afirmaram que o NRC (2001) superestima as necessidades de proteína degradável no rúmen da vaca devido à determinação imprecisa da proteína degradável no rúmen da dieta e pelo modelo não contabilizar a reciclagem da ureia para o rúmen. O NRC (2001) define a exigência de proteína degradável no rúmen para os microrganismos em 1,18, o que significa que a eficiência de captura de proteína degradável no rúmen pelos microrganismos é assumida como sendo 0,85, sem disposição para reciclagem ruminal de nitrogênio. Uma análise por Lapierre e Lobley (2001) indicou que quantidade substancial de ureia pode ser reciclada para o rúmen, e que as margens de segurança podem não ser

necessárias para satisfazer as exigências de proteína degradável no rúmen pelos microrganismos. Recentemente, Gozho, Hobin e Mutsvangwa (2008) relataram que 58 a 65% do nitrogênio não proteico sintetizado pelo fígado retornaram ao trato gastrintestinal de vacas leiteiras.

Desta forma, quando se desejam elevados níveis de produção, ocorre aumento das necessidades proteicas e, para atender estas condições, há necessidade de maximizar a eficiência da síntese de proteína microbiana e que parte da proteína dietética ingerida não seja degradada no rúmen. Assim, Russell et al. (1992) salientaram que quanto maior for a degradabilidade da proteína da ração, maior será a produção de amônia e possivelmente, maiores serão as perdas urinárias de compostos nitrogenados na forma de ureia. Para que estas perdas sejam reduzidas, e seja maximizado o crescimento microbiano, há necessidade de sincronização entre as taxas de degradação da proteína e dos carboidratos.

2.2.3 Proteína não degradável no rúmen

A quantidade de proteína que chega para ser absorvida no intestino delgado é a soma da proteína microbiana e da proteína dietética que escapa ou ultrapassa a digestão ruminal (CHURCH, 1988). Para elevadas taxas de produção de leite, a proteína microbiana sozinha pode ser insuficiente para atender à demanda da proteína metabolizável da vaca. No entanto, a melhor opção não é substituir a proteína degradável no rúmen (diminuindo a síntese de proteína microbiana) pela proteína não degradável no rúmen. Van Soest (1994) afirmou que esta abordagem enfatiza os aspectos nutricionais de um único estômago e transforma o ruminante em um não ruminante. Além disso, esta estratégia torna desnecessariamente os ruminantes mais dependentes da qualidade alimentar e os põe em concorrência com animais monogástricos (VAN SOEST, 1994).

Diversas tecnologias, incluindo o uso de calor, agentes químicos ou uma combinação de ambos sobre as sementes e alimentos oleaginosos, têm sido desenvolvidas a fim de aumentar o escape dos mesmos da fermentação ruminal para aumentar desta forma a proteína metabolizável e seu perfil de aminoácidos (NRC, 2001).

Santos et al. (1998) em uma revisão abrangente sobre os efeitos da proteína não degradável no rúmen no desempenho de vacas leiteiras afirmaram que em 22 das 29 comparações dos vários ensaios de metabolismo realizados, dietas com alto teor de proteína não degradável no rúmen diminuíram a síntese de proteína microbiana. Do mesmo modo, Ipharraguerre e Clark (2005) sugeriram que a adição de proteína não degradável no rúmen na

dieta à custa de proteína degradável no rúmen, pode levar a uma depressão na síntese proteica microbiana e no fluxo de saída do rúmen.

Adachi et al. (2000) observaram aumento de produção de leite em vacas da raça Holandês de alta produção com 10 a 20 semanas pós-parto, alimentadas com uma fonte de proteína não degradável no rúmen em relação ao farelo de soja. Moussavi et al. (2007) verificaram que a utilização de uma fonte de proteína não degradável no rúmen ou ácidos graxos n-3-polinsaturados para vacas no inicio da lactação, aumentou a ingestão de matéria seca e a produção de leite, sem nenhuma alteração na composição do leite. Entretanto, Serbester et al. (2005) não observaram efeitos do uso de proteína não degradável no rúmen sobre a produção de leite em vacas, mas verificaram aumento absoluto no teor de proteína do leite.

As respostas de vacas leiteiras à suplementação com a proteína não degradável no rúmen são muito variáveis. Uma parte destas respostas é explicada pela fonte de proteína bruta da dieta, na proporção e na fonte da proteína não degradável no rúmen, no efeito da proteína não degradável no rúmen sobre a saída ruminal da proteína microbiana, na degradabilidade e teor de aminoácidos da proteína não degradável no rúmen, e na porcentagem de proteína bruta da dieta (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2005).

Brito e Broderick (2007) substituíram a ureia por diferentes fontes de proteína verdadeira (farelo de soja com solvente, farelo de algodão e farelo de canola), resultando em rações isoproteicas (16,5% PB), mas com diferentes concentrações de proteína não degradável no rúmen e proteína degradável no rúmen. A dieta com ureia teve a maior concentração de proteína degradável no rúmen e a menor de proteína não degradável no rúmen; vacas alimentadas nesse tratamento tiveram menor produção e teores dos componentes do leite, menor eficiência alimentar e menor eficiência no uso do nitrogênio (nitrogênio do leite /N ingerido) do que as vacas suplementadas com proteína verdadeira. O farelo de algodão apresentou menor produção de leite, menor teor de sólidos do leite e menor eficiência no uso do nitrogênio em comparação com o farelo de soja com solvente e o farelo de canola. Isto sugere uma pior digestão intestinal ou um padrão de aminoácidos da proteína absorvida prejudicada pela utilização do farelo de algodão (BRITO; BRODERICK, 2007). Pode-se concluir a partir dos resultados deste estudo que não só a concentração de proteína degradável no rúmen e de proteína não degradável no rúmen na dieta é importante, mas também a composição, degradabilidade, e absorção de cada fração.

2.2.4 Proteína metabolizável

A proteína metabolizável é definida como a proteína verdadeira que é digerida pós-rúmen e seus aminoácidos absorvidos pelo intestino (NRC, 2001). Assim, a exigência de proteína metabolizável que chega ao intestino é o somatório da proteína microbiana sintetizada no rúmen, da proteína dietética não degradada no rúmen e da proteína endógena. (KALSCHEUR et al., 1999).

Como foi discutido anteriormente, o principal contribuinte da proteína metabolizável é a proteína microbiana, enquanto a proteína não degradável no rúmen é a segunda fonte mais importante de proteína verdadeira para o intestino delgado e a proteína endógena faz uma contribuição menor para a proteína metabolizável (NRC, 2001). A proteína bruta microbiana, tal como previsto pelas bactérias e protozoários é considerada por conter 80% de proteína verdadeira e 20% de ácidos nucléicos. A proteína verdadeira da proteína bruta microbiana é considerada 80% digestível. Consequentemente, a conversão de proteína bruta microbiana para proteína metabolizável é assumida como sendo 64%. A proteína não degradável no rúmen é considerada como sendo 100% de proteína verdadeira (NRC, 1989), e a sua digestibilidade de 50 a 100%, dependendo da fonte de alimento; entretanto, a conversão de proteína bruta endógena para a proteína metabolizável é assumido como sendo de 40% (NRC, 2001).

As primeiras investigações de Van Horn et al. (1975) foram comparando os diferentes níveis de proteína bruta na dieta em diferentes fontes de proteína (ureia vs farelo de soja). Neste experimento, rações com maiores teores de proteína bruta (16,8%), baseadas em maior inclusão de ureia, tinham baixa proteína metabolizável (4,7%) e menor produção de leite em comparação com dietas com baixo teor de proteína bruta (13,3%) e maiores teores de proteína metabolizável (5,6%), utilizando mais farelo de soja, preliminar para a aplicabilidade do conceito de proteína metabolizável.

Wright et al. (1998) aumentaram a concentração de proteína metabolizável na dieta de vacas em meio de lactação pelo aumento da concentração de proteína não degradável no rúmen, mantendo constante proteína degradável no rúmen. Através dessa pesquisa constatou-se um aumento linear na produção e proteínas do leite, mas uma menor eficiência do nitrogênio com aumento na concentração de proteína metabolizável na dieta. De acordo com estes resultados, Wang et al. (2007) relataram uma diminuição linear na eficiência do nitrogênio quando as vacas em meio de lactação foram alimentadas com concentrações elevadas de proteína metabolizável pelo aumento da concentração de proteína não degradável no rúmen na dieta. Estes autores encontraram também um aumento linear na produção de

leite, entretanto houve efeitos quadráticos sobre os componentes do leite (proteína, gordura, sólidos totais e extrato seco desengordurado). Do mesmo modo, a importância do balanço de proteína metabolizável na produção de leite em vacas em meio de lactação foi recentemente estudada por Agle et al. (2010). Neste experimento três dietas com valores decrescentes de proteína bruta (15,4; 13,4 e 12,9%) e de proteína degradável no rúmen (10,3; 8,4 e 7,1%), forneceram saldos de proteína degradável no rúmen de 162, -326 e -636 $g.dia^{-1}$, e saldos de proteína metabolizável de 323, -44 e 40 $g.dia^{-1}$, respectivamente. A produção e os componentes do leite não foram afetados pelos tratamentos, enquanto que o nitrogênio ureico do leite e o nitrogênio excretado na urina e fezes foram menores para as dietas com teores médio e baixo de proteína bruta comparada com as dietas com elevado teor de proteína bruta. Desta forma, quando as exigências de proteína metabolizável forem atendidas na dieta para vacas leiteiras com concentrações reduzidas de proteína bruta e proteína degradável no rúmen, produziram-se excreções com menor potencial de emissão de amônia, sem afetar negativamente o desempenho produtivo da vaca.

2.2.5 Exigência em aminoácidos

Os aminoácidos absorvidos, utilizados principalmente para a síntese de proteínas, são essenciais para a manutenção, crescimento, reprodução e produção das vacas leiteiras. Um padrão ideal de aminoácidos absorvidos existe presumivelmente, para cada uma destas funções fisiológicas. Dos vinte aminoácidos que ocorrem nas proteínas, dez são classificados como "essenciais" (ou indispensáveis). Estes incluem arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, e valina. Os aminoácidos essenciais não podem ser sintetizados pelos tecidos animais ou se o forem, são em um taxa não suficientemente elevada para satisfazer as exigências, em especial durante as fases iniciais do crescimento ou níveis elevados de produção (NRC, 2001).

Embora cada um dos 10 aminoácidos essenciais em ruminantes tenha sido citado como limitante em alguns estudos, metionina e lisina são os mais frequentemente considerados como potencialmente limitantes para bovinos leiteiros.

A lisina parece ser o primeiro aminoácido limitante em dietas baseadas em milho (silagem de milho) e suplementadas com fontes proteicas derivadas do milho (farelos e subprodutos). A metionina foi primeiro aminoácido limitante quando as dietas tinham um teor de forragem elevado e todas ou a maioria das proteínas não degradáveis no rúmen era fornecida pelo farelo de soja, proteína animal (farinha de carne, sangue, etc.), ou ambos (SCHWAB et al., 1992).

A relação entre os aminoácidos essenciais disponíveis para o animal é importante para eficiência da síntese proteica pelos tecidos (LAPIERRE; LOBLEY, 2001).

O perfil ideal de aminoácidos essenciais na proteína metabolizável para vacas em lactação vem sendo estudada, no entanto, alcançar uma concentração ótima dos aminoácidos mais limitantes na proteína metabolizável é o primeiro passo para balancear os aminoácidos nas dietas. Rulquin et al. (1993) realizaram uma revisão e mostraram que as concentrações ótimas de lisina e metionina para a produção de proteínas do leite como porcentagem da proteína metabolizável foram, respectivamente, 7,3 e 2,5%, (relação de 2,92:1). Valores semelhantes são relatados pelo NRC (2001) com uma concentração ótima de lisina e metionina na proteína metabolizável igual a 7,2 e 2,4% (3:1), respectivamente.

2.3 Compostos nitrogenados no leite e no sangue

A avaliação da quantidade de nitrogênio dietético realmente aproveitado pelos ruminantes é um problema comum na pecuária leiteira, mas pode ser feita a partir das concentrações de nitrogênio ureico.

As determinações dos teores de nitrogênio ureico no sangue e no leite tem sido uma importante ferramenta para monitorar a nutrição e evitar problemas metabólicos. Esses parâmetros permitem ajustes nas dietas visando maximizar a produção quando as dietas estão com teores de proteína insuficientes, ou mesmo evitar perdas econômicas quando a inclusão do nitrogênio está acima do necessário por determinada categoria animal (PERES, 2001).

O nitrogênio ureico pode gerar informações tanto do metabolismo proteico como energético por apresentar rápida difusão tissular e permitir sua análise no plasma sanguíneo (EICHER; BOUCHARD; BIGRAS-POULIN, 1999) e no leite (PEIXOTO JR., 2003). As concentrações de nitrogênio ureico no leite têm mostrado elevada correlação e variando de 0,88 a 0,96 em relação aos teores de nitrogênio no sangue conforme reportado por Baker, Ferguson e Chalupa (1995) e desta forma, se o nitrogênio ureico no sangue estiver elevado o nitrogênio no leite também estará.

Almeida (2012) afirmou que o teor de nitrogênio ureico no leite é um bom indicador de quão adequado estão os níveis proteicos e energéticos da dieta, bem como a eficiência de utilização do N pelas vacas em lactação, isto é, a relação entre a quantidade de nitrogênio secretado no leite e o consumo de nitrogênio pelos animais.

A utilização da determinação do nitrogênio ureico no leite como uma ferramenta para avaliar a condição nutricional das vacas em lactação é simples, rápida, barata e direta bastando apenas, coletar, de forma não invasiva, amostras do leite durante as ordenhas.

Os níveis de nitrogênio ureico médio no leite recomendados pela literatura encontram-se entre 10 e 17 $mg.dL^{-1}$. Segundo Hutjens e Barmore (1995) valores de nitrogênio ureico no leite entre 12 e 17 $mg.dL^{-1}$ eram considerados referências, Moore e Varga (1996) consideravam valores entre 10 e 14 $mg.dL^{-1}$, Jonker, Kohn e Erdman (1998) entre 10 e 16 $mg.dL^{-1}$ e Jonker e Khon (1998) relatam valores entre 12 e 16 $mg.dL^{-1}$.

Normalmente, níveis abaixo de 10 e acima de 16 $mg.dL^{-1}$, podem refletir um desequilíbrio no manejo nutricional. De acordo com Machado (2012), a Clínica do Leite da ESALQ/USP analisando mensalmente, o teor de nitrogênio ureico de aproximadamente 65.000 tanques detectou que 33% dos resultados estavam acima de 14 $mg.dL^{-1}$ e 30% abaixo de 10 $mg.dL^{-1}$. Se considerarmos a recomendação da literatura internacional de 10 a 14 $mg.dL^{-1}$ como indicativo de dietas bem balanceadas, somente 37% das propriedades avaliadas estavam com as dietas de suas vacas balanceadas adequadamente para energia e proteína, o que mostra uma grande oportunidade para os produtores de leite melhorarem a situação financeira de seus empreendimentos.

Vargas e Ishler (2008) avaliaram o efeito da substituição de 900 g do farelo de soja tratado e de 500 g de farelo de canola por 112 g de ULL com base na MS. A dieta controle era composta por 50% de forragem e 16% de PB, enquanto que as dietas que continham a ULL eram constituídas por 53% de forragem e 15,5% de PB. Esses autores encontraram teores de NUL iguais 9,83 $mg.dL^{-1}$ para os tratamentos com a ULL e 8,64 $mg.dL^{-1}$ para o tratamento controle.

O monitoramento mensal do teor de nitrogênio ureico no leite pode ser uma importante ferramenta no manejo dos rebanhos leiteiros, de acordo com Jonker, Kohn e Erdman (1998), pois o excesso do consumo de proteína pode comprometer a eficiência reprodutiva, onerar a produção visto que os suplementos proteicos são ingredientes caros e ainda, gerar um impacto ambiental negativo devido ao excesso na excreção de nitrogênio.

Alterações no teor de nitrogênio ureico do leite podem ser um indicativo de problemas nutricionais no rebanho. Valores elevados de nitrogênio ureico no leite podem indicar excessos de proteína bruta na dieta, tanto da fração proteica degradável como da proteína não degradável no rúmen, baixa taxa de fermentação ruminal de carboidratos não fibrosos, ou ainda relação proteína/energia aumentada. Quando os valores de nitrogênio ureico do leite encontram-se baixos pode indicar deficiência de proteína bruta na dieta, quantidades limitadas das frações proteicas degradáveis, não degradáveis, ou ambas, no rúmen e até mesmo alta taxa de fermentação ruminal de carboidratos não fibrosos (JONKER; KOHN; ERDMAN, 1999).

Quando o uso da proteína na dieta for ineficiente e houver perdas pela urina esta situação pode ser monitorada pelo teor de nitrogênio ureico do leite, cujo nível maior no leite está relacionado com perdas de ureia pela urina. Quanto maior o nitrogênio ureico do leite, tanto menor o seu teor de caseína. Assim, o nitrogênio ureico no leite interessa não só ao produtor de leite como também à indústria láctea.

A concentração plasmática de ureia era utilizada para monitorar se o consumo de proteína dietética estava próximo à quantidade necessária para cada categoria animal. De acordo com Broderick e Clayton (1997), o consumo excessivo de proteína pode afetar o desempenho reprodutivo dos ruminantes, aumentando sua exigência em energia ou ainda, o custo da ração.

2.4 Parâmetros sanguíneos

A avaliação do equilíbrio de diversos parâmetros sanguíneos é capaz de fornecer informações fundamentais para o diagnóstico, prognóstico, decisão terapêutica de diversas enfermidades, principalmente metabólicas, assegurando a homeostase nos bovinos. Além disso, a avaliação dos parâmetros sanguíneos colabora na caracterização dos indivíduos, onde a visualização do seu perfil metabólico ajuda na compreensão da sua resposta nutricional (GONZÁLEZ, 2000).

A dinâmica dos parâmetros sanguíneos tem sido estudada por vários autores.

No exame de gasometria sanguínea, os parâmetros mais relevantes para manutenção da homeostase e avaliação do equilíbrio ácido base são pH, pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2), pressão parcial de oxigênio (PO_2), bicarbonato (HCO_3^-), total de dióxido de carbono (TCO_2), base extra (BE), e intervalo aniônico ou janela aniônica ou ânion gap (AnGAP) (DIBARTOLA, 2012).

Os valores de referencias para eletrólitos e gases sanguíneos no sangue venoso de bovinos, de acordo com Carlson (1997), Radostits et al. (2007) e Kaneko et al. (2008), estão representados na Tabela 2.

No exame gasométrico, o ponto de partida para iniciarmos a avaliação é o pH. O pH é o resultado final da interação de todos os elementos envolvidos no equilíbrio ácido-base. A redução no valor de pH indica uma acidemia, causada por acidose metabólica, respiratória ou ambas. Elevação no pH indica alcalemia, podendo ser causada por alcalose metabólica, respiratória ou ambas. Valores de pH dentro do intervalo de referência não excluem alterações do equilíbrio ácido-base pois podem indicar uma desordem primária devidamente

compensada ou um distúrbio misto no qual as influências da acidose e alcalose no pH se anulam (GOEL; CALVERT, 2012; MONNIG, 2013).

Tabela 2 – Valores de referencia para alguns eletrólitos, ânion gap, potencial hidrogeniônico venoso, pressão parcial de dióxido de carbono e bicarbonato sanguíneos na espécie bovina.

Parâmetros	Bovinos		
	CARLSON, 1997	RADOSTITS et al., 2007	KANEKO et al., 2008
Sódio, $mEq.L^{-1}$	132 – 152	132 – 152	132 – 152
Potássio, $mEq.L^{-1}$	3,9 – 5,8	3,9 – 5,8	3,9 – 5,8
Cloro, $mEq.L^{-1}$	97 – 111	95 – 110	97 – 111
Anion gap, $mEq.L^{-1}$	13,9 – 20,2	17,2	10 – 20
pH	7,35 – 7,50	7,35 – 7,50	7,31 – 7,53
PCO_2, mm Hg	35 – 44	-	-
HCO_3^-, $mEq.L^{-1}$	20 – 30	20 – 30	17 – 29

Após a avaliação do pH, deve-se investigar se a causa da alteração é metabólica, respiratória ou ambas.

A PCO_2 e a concentração sérica do íon bicarbonato formam o par de tampões utilizados para o monitoramento do pH no líquido extra celular (ROSE; POST, 2001). A PCO_2 é indicativa de ventilação pulmonar e é considerada como o componente respiratório do equilíbrio ácido-base. Elevações em seu valor indicam acidose respiratória e reduções indicam alcalose respiratória.

Os tampões são constituídos de pares conjugados de ácidos e bases fracas, que possuem a capacidade de doar ou receber prótons respectivamente. Além disso, os tampões são capazes de se dissociarem parcialmente, tornando a regulação do pH mais eficiente (DIBARTOLA, 2000). O par conjugado bicarbonato-ácido carbônico é o sistema de tamponamento mais importante. O bicarbonato é abundante no líquido extracelular e pode ser recuperado pelos rins, enquanto o CO_2, produzido pela respiração celular tecidual, pode ser eliminado pela ventilação alveolar nos pulmões, caracterizando um sistema aberto (ROSE; POST, 2001). O CO_2 produzido nos tecidos, ao difundir-se na corrente sanguínea, combina-se instantaneamente com H_2O, formando o ácido carbônico (H_2CO_3), um ácido fraco, que, devido a sua instabilidade, dissocia-se em H^+ e HCO_3^-. Esta reação é mediada pela anidrase carbônica, que está presente nos eritrócitos (DIBARTOLA, 2000).

A concentração sérica do bicarbonato é, em média, de 24 $mEq.L^{-1}$ Já a concentração do ácido carbônico dificilmente é mensurada devido a sua instabilidade (CUNNINGHAM, 2004).

Há uma relação direta entre a concentração de CO_2 no sangue, determinada pela pressão parcial de CO_2, PCO_2, e a quantidade de ácido carbônico (H_2CO_3) sanguíneo. Desta forma, a determinação da PCO_2 é o método utilizado para a avaliação da concentração do H_2CO_3. Os valores fisiológicos da PCO_2 para os bovinos variam de 34,7 a 44 mmHg (CARLSON, 1997; GOMES, 1997).

O HCO_3^- é considerado o componente metabólico do equilíbrio ácido-base, sendo que sua redução indica acidose metabólica e sua elevação indica alcalose metabólica.

O TCO_2 envolve a soma do HCO_3^- e do CO_2, sendo ligeiramente maior que o HCO_3^-. Sua redução indica uma acidose e sua elevação indica uma alcalose, porém, por envolver os componentes metabólicos e respiratórios, é pouco específico quanto à origem do desequilíbrio (ROSSELL; ROUSSEL, 2007; FREITAS et al., 2010).

Para quantificar o componente metabólico do desequilíbrio, criou-se o conceito de excesso de base que significa a quantidade de base, ou ácido, necessária para titular a amostra de 1L de sangue até o pH de 7,4 a 37ºC com a PCO_2 em 40 mmHg (BOOKALLIL, 2009). Sua variação é interpretada de maneira semelhante ao HCO_3^-, sendo que a redução indica acidose metabólica e elevação indica alcalose metabólica. O excesso de base também é utilizado para calcular a dose de bicarbonato de sódio no tratamento da acidose metabólica (GOMES, 1997).

O conceito de intervalo aniônico, janela aniônica ou ânion gap foi criado para auxiliar a caracterizar mais especificamente os desequilíbrios metabólicos. O ânion gap é calculado pela diferença entre os principais cátions, sódio e potássio, e os principais ânions, cloreto e bicarbonato, do líquido extracelular. No entanto, essa diferença não é real, pois a homeostase do organismo exige a manutenção da eletroneutralidade, ou seja, a soma da carga de todos os cátions deve ser igual à soma da carga de todos os ânions. O ânion gap é equivalente à diferença entre os ânions não mensurados e cátions não mensurados. A principal alteração no ânion gap se deve a elevação de ânions não mensurados que, atendendo ao princípio da eletroneutralidade, resulta em uma redução dos ânions mensurados e, consequentemente, num aumento do ânion gap. Ânions não mensurados incluem fosfatos, sulfatos, lactato e corpos cetônicos. A vantagem do ânion gap é que ânions não mensurados como lactato e corpos cetônicos são clinicamente relevantes (RUSSELL; ROUSSEL, 2007; FREITAS et al., 2010). Aumento do ânion gap em bovinos pode ocorrer em importantes condições clínicas como a cetose, a diarreia de bezerros e a acidose lática ruminal, devido ao acúmulo de corpos cetônicos e lactato respectivamente (MÜLLER et al., 2012).

Os constituintes do plasma sanguíneo têm relação direta com a composição química e a digestibilidade dos componentes da dieta. Desta forma, as diferentes fontes de volumosos para vacas em lactação apresentam efeitos sobre a composição do plasma e, em consequência, sobre a composição do leite, determinando, em parte, a qualidade desse produto (CALIXTO JUNIOR et al., 2010).

A glicose é um monossacarídeo vulgarmente utilizado como uma fonte de energia. Os ruminantes têm basicamente a mesma exigência de glicose para o seu metabolismo que outras espécies, embora o nível de glicose encontrado no sangue seja de 40 a 60 $mg.dL^{-1}$ (FRASER, 1991), o que corresponde praticamente à metade do nível encontrado nos outros animais.

Payne e Payne (1987) consideraram a glicose como componente de escolha no perfil metabólico, que, em condições de campo, quando ocorre balanço de energia severamente negativo, podem ser observados casos de hipoglicemia nos animais. Entretanto, o nível de glicose plasmático é o indicador menos expressivo do perfil para avaliar o status energético, devido à insensibilidade da concentração de glicose no sangue às mudanças nutricionais.

O Na^+ é o principal cátion presente no liquido extracelular representando aproximadamente 75% do sódio corporal total (CARLSON, 1997; CUNNINGHAM, 2004). O volume do líquido extracelular, assim como sua osmolalidade, é determinado pelo conteúdo do Na^+ e seus ânions acompanhantes. Desta forma, um aumento na concentração de Na^+ pode levar à expansão do líquido extracelular, com consequente hipertensão sistêmica e formação de edemas. Da mesma forma, a redução deste eletrólito resulta em hiponatremia, ocasionando a redução do conteúdo extracelular e desidratação (DIBARTOLA, 2000; ROSE; POST, 2001).

Acompanhante do sódio, o Cl^- é o ânion mais abundante no liquido extracelular. Está presente nos alimentos, comumente associado com o sódio ou potássio. O cloro é um importante componente em muitas secreções, como suor, saliva e secreções gástricas (ROSSELL; ROUSSEL, 2007). As alterações do teor de cloro normalmente estão associadas às alterações do teor de sódio e do balanço hídrico. A hipercloremia é normalmente observada em animais com acidose metabólica, sendo a alta concentração deste íon associada ao aumento da reabsorção renal do cloreto, em resposta à baixa relação entre os íons cloreto e bicarbonato, devido à redução do bicarbonato plasmático. A concentração sérica do cloro tende a variar inversamente à concentração de bicarbonato (DIBARTOLA, 2000; ROSE; POST, 2001; CUNNINGHAM, 2004).

Através da gasometria, ainda pode-se avaliar a hemoglobina, a qual é uma proteína que atua como o tampão intracelular mais abundante no organismo, cerca de 80%, e tem a capacidade de fixar CO_2 e H^+.

2.5 Balanço de nitrogênio

O N dietético oriundo das forragens e alimentos concentrados fornecidos às vacas em lactação para a produção de leite é acompanhado de perdas inevitáveis ao meio ambiente através das excretas (fezes e urina) contribuindo para um aumento na poluição ambiental (TAMMINGA, 1992).

O balanço dos compostos nitrogenados (BN) permite avaliar a eficiência do metabolismo proteico dos ruminantes e seu valor é obtido pela diferença entre a quantidade de nitrogênio ingerido e a quantidade de nitrogênio excretado nas fezes, urina e também secretado no leite.

De acordo com Highstreet et al. (2010), inúmeras pesquisas têm sido realizadas com objetivo de diminuir a excreção do nitrogênio proveniente da dieta e maximizar o desempenho produtivo dos animais. Desta forma, o uso eficiente das proteínas pelos ruminantes ganhou a atenção dos pesquisadores e ambientalistas de várias partes do mundo. Estratégias de alimentação animal que reduzem os níveis de ureia nas excretas podem colaborar para uma redução nas emissões de amônia devido à ação de ureases fecais e ambientais, visto que as perdas de nitrogênio pelas excretas podem afetar a qualidade da água e do ar pela emissão de óxido nitroso e amônia (WANAPAT et al., 2009).

A ureia é uma molécula que se difunde facilmente nos tecidos do organismo, constituindo a principal forma de eliminação do nitrogênio metabólico em ruminantes. Em casos de deficiência energética e excesso de proteína degradável no rúmen, a taxa de produção de amônia supera a sua utilização pelos microrganismos ruminais, dessa forma, observa-se aumento em sua concentração no rúmen, com consequente incremento na excreção de ureia, crescente gasto energético para síntese de ureia, havendo, assim, perda do valor biológico das proteínas (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

Níveis acima dos valores basais também aumentam a excreção urinária de ureia, sugerindo desperdício da proteína dietética, sendo que, em ruminantes, as concentrações de ureia na urina são altamente correlacionadas com as concentrações plasmáticas de ureia. Quando o aporte proteico dietético é baixo, ocorre um decréscimo na concentração de amônia no rúmen, com uma consequente diminuição nos teores de ureia nos líquidos corpóreos (MOURO; BRANCO; MACEDO, 2002).

Desta maneira, os teores de ureia no sangue e na urina se apresentam como importantes ferramentas para uma correta avaliação do padrão nutricional dos animais, principalmente, do equilíbrio entre energia e proteína.

Hoffman et al. (2001) observaram que novilhas de rebanhos leiteiros utilizadas para reposição possuíam exigências específicas de proteína dietética para suportar o crescimento, porém, o consumo excessivo de proteína bruta (PB) aumentava a excreção de nitrogênio fecal e urinário.

Carper, Cady e Bauman (2009) comparando os impactos ambientais oriundos da bovinocultura leiteira com os ocorridos na década de 40 nos Estados Unidos da América, dentre os inúmeros resultados, os autores encontraram que as excreções de N representam hoje 45,3% do que seriam em 1944. Esta melhoria é explicada principalmente pelos maiores volumes de leite hoje produzidos.

Um importante parâmetro na adequação dos níveis proteicos nas dietas das vacas em lactação é a eficiência com que as vacas utilizam o nitrogênio, isto é a relação entre a quantidade de N secretado no leite e o N ingerido pelos animais. De acordo com o NRC (2001), a eficiência de utilização do N em vacas leiterias é reduzida, em torno de 25 a 30%, podendo ser menor que 20% em rebanhos mantidos a pasto (KOLVER, 1998).

Santos et al. (2011) verificaram que os ruminantes são ineficientes na utilização de N, visto que excretaram para o leite cerca de 26% do N ingerido e perderam através da urina cerca de 27%. Reforçando essa ineficiência, Tamminga (1992) relatou perdas acima de 70% do N ingerido, perdido nas fezes e urina. Isso é preocupante quando se leva em consideração os impactos ambientais maléficos que podem ser causados pela excreção de N.

Frank e Swensson (2002) relataram que o incremento de proteína na dieta resultou em um aumento na produção de fezes, sendo que para cada aumento de 1% de PB na dieta, resultou no incremento de quase 1 kg de fezes por dia. Em dietas a base de gramíneas ou leguminosas com elevado teor de PB, a produção é ainda maior.

O excesso de PB nas dietas não é devido apenas à baixa eficiência de utilização do N, mas também a baixa eficiência da utilização de outros nutrientes, acarretando maiores custos dietéticos e maiores excreções de N para o ambiente. Para cada g de N excretado são desperdiçados 13,3 kcal de energia digestível (BRODERICK, 2003). Para exemplificar, uma vaca consumindo 23 kg de $MS.dia^{-1}$ um excesso de apenas 1% de PB na dieta total, representa 230 $g.dia^{-1}$, sendo desperdiçados 27,8 MJ de energia digestível para excreção do N, quantidade de energia necessária para a produção de 2 kg de leite.

Assim, a alimentação de vacas leiteiras especializadas deve ser baseada na oferta dos nutrientes de forma a atender suas exigências adequadamente, sem que ocorra falta ou excesso de qualquer nutriente. A proteína, quando em excesso na dieta, além de promover uma maior produção de fezes (WATTIAUX; KARG, 2004) aumentando os custos de produção decorrentes da ineficiência na utilização dos nutrientes da dieta e também dos custos com transportes e deposição de esterco é também responsável pela ineficiência de utilização do N para a produção de leite e aumento dos impactos ambientais.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A adição de uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura melhora o desempenho produtivo de vacas da raça Holandês em lactação, bem como a composição do leite e o balanço nitrogenado e a sua combinação com uma fonte de nitrogênio não proteico de liberação lenta, aumenta a eficiência produtiva.

3.2 Objetivo

Avaliar o efeito da substituição parcial do farelo de soja por uma fonte de proteína microbiana derivada de levedura, associada ou não a uma fonte de nitrogênio não proteico de liberação lenta, em dieta de vacas da raça Holandês em lactação sobre o consumo de MS, produção e composição do leite, bem como alguns parâmetros sanguíneos e o balanço nitrogenado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, de acordo com o parecer técnico, protocolo nº 162 (Anexo A).

4.1 Local e animais

O projeto foi conduzido no Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio (CAPTA) – Bovinos de Leite, pertencente ao Instituto de Zootecnia, localizado no município de Nova Odessa, SP, a uma altitude de 550 m, coordenadas 22º 33' 02" de latitude Sul e 47º 38' 05" de longitude Oeste. O clima da região é do tipo Cwa da classificação Köppen,

tropical, quente e úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. A temperatura média no período experimental foi de 24ºC, com pluviosidade total durante o período experimental igual a 285,5 mm e com ventos predominantes do sudeste.

Figura 3 – Baias experimentais individuais em instalações do tipo *free-stall.*

Foram utilizadas oito vacas da raça Holandês, primíparas, com médias de 75 ± 8 dias em lactação, 558± 98 kg de peso vivo, escore de condição corporal de 3,5, de acordo com a classificação de Wildman et al (1982) (em uma escala de 1 = muito magra a 5 = excessivamente gorda) e com produção média diária de 26± 3 kg de leite no início do período experimental. As vacas foram alojadas em sistema tipo *free* stall, porém individualizadas em baias com camas de areia lavada, cochos para fornecimento da dieta total e bebedouros automáticos.

4.2 Dieta basal e tratamentos

As vacas foram alimentadas com dietas que continham uma razão volumoso concentrado de 49:51, sendo 46,8% de silagem de milho e 2,2% de feno de Tifton. Os quatro tratamentos experimentais foram compostos por um tratamento controle (CTL = sem PML e sem ULL), cuja principal fonte proteica era o farelo de soja, e outros três tratamentos nas quais o farelo de soja foi parcialmente substituído por 15 g/kg MS de proteína microbiana derivada de levedura (PML) neste estudo foi utilizado Demp® (*Dietary Escape Microbial Protein*) ou por 7,5 g/kg MS de ureia de liberação lenta (ULL) neste estudo foi utilizado Optigen®, ou por ambos 15 g/kg MS PML + 7,5 g/kg MS de ULL (PML + ULL). As fontes de PML e de ULL utilizada em substituição ao farelo de soja foram produzidas pela Alltech Inc. Nicholasvile, KY, EUA.

A composição percentual dos ingredientes nas dietas, a composição bromatológica dos alimentos volumosos e concentrados e a composição química das dietas encontram-se nas Tabelas 3, 4 e 5 respectivamente.

Tabela 3 – Composição percentual dos ingredientes das dietas, expressa com base na matéria seca (% MS).

INGREDIENTES	Dietas[1]			
	CTL	ULL	PML	PML+ULL
Feno de Tifton	2,18	2,18	2,18	2,18
Silagem de milho	46,82	46,82	46,82	46,82
Casca de soja	13,50	13,50	13,50	13,50
Milho moído	15,27	19,46	15,27	19,46
Farelo de soja 45%	19,41	14,46	17,91	12,96
PML	0,00	0,00	1,50	1,50
ULL	0,00	0,75	0,00	0,75
Calcário calcítico	0,40	0,40	0,40	0,40
Núcleo[2]	2,43	2,43	2,43	2,43

[1] Dietas formuladas e balanceadas utilizando o programa *Spartan Ration Evaluator-Balancer for Dairy Catlle* versão 3.0.3 – Michigan State University, Departamento of Animal Science, e os concentrados confeccionados pela Premix®.
CTL = Controle (sem PML e sem ULL), ULL = Ureia de Liberação Lenta (sem PML e com ULL), PML = Proteína Microbiana Derivada de Levedura (com PML e sem ULL) e PML+ULL = Proteína Microbiana Derivada de Levedura e Ureia de Liberação Lenta (com PML e com ULL).
[2] Núcleo mineral e vitamínico composto por kg do produto: 15-20 g Ca, 6.900 mg P, 4.300 mg S, 200 mg Na, 4,42 mg Co, 43,95 mg Cu, 141,82 mg Zn, 0,91 mg Se, 3,13 mg I, 9.550 UI vit. A, 34,5 UI vit. E, 2.400 UI vit. D.

Tabela 4 – Composição bromatológica dos volumosos e dos concentrados que compunham as dietas com base na MS.

Composição Química (%)[1]	Volumosos		Concentrados[4]			
	Feno	Silagem Milho	CTL	ULL	PML	PML+ULL
Matéria Seca	95,48	34,04	93,26	92,66	92,92	92,93
Proteína Bruta	11,19	6,45	27,55	26,13	26,77	26,03
Extrato Etéreo	1,13	2,57	1,81	2,04	2,06	2,03
Extrativo Não Nitrogenado	47,81	65,62	47,10	49,66	47,77	49,46
Matéria Mineral	7,36	4,11	10,92	10,05	10,91	10,02
NDT[2]	54,46	67,20	72,14	72,87	72,29	72,84
Fibra em Detergente Ácido	38,14	30,42	17,70	17,31	17,78	18,03
Fibra em detergente Neutro	77,49	51,15	25,36	24,88	25,27	25,90
CNF[3], %	2,83	35,72	34,36	36,90	34,99	36,02
Nitrogênio aderido à FDA	0,76	0,52	1,60	1,46	1,56	1,43
Nitrogênio aderido à FDN	4,75	0,90	3,65	2,67	3,34	2,78
Hemicelulose	39,36	20,72	16,53	17,21	16,97	17,36
Celulose	32,67	25,57	16,19	16,09	16,49	16,70
Lignina	4,43	3,66	0,72	0,91	0,79	0,83

[1] Análises químicas dos alimentos realizada pelo Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa-SP.
[2] Nutrientes Digestíveis Totais: estimativa de NDT calculado de acordo com a fórmula de Weiss et al. (1992).
[3] CNF = Carboidratos não fibrosos = 100 – (PB+EE+cinzas+FDN)
[4] Concentrados: CTL = Controle (sem PML e sem ULL), ULL = Ureia de Liberação Lenta (sem PML e com ULL), PML = Proteína Microbiana Derivada de Levedura (com PML e sem ULL) e PML+ULL = Proteína Microbiana Derivada de Levedura e Ureia de Liberação Lenta. (com PML e com ULL).

As dietas foram balanceadas através do programa *Spartan Ration Evaluator-Balancer for Dairy Catlle versão 3.0.3* para vacas em lactação que utiliza o sistema NRC (2001), para terem a mesma concentração de nitrogênio, de acordo com a produção diária de leite e com consumo de aproximadamente 20 kg de MS.dia^{-1}

Tabela 5 – Composição química das dietas experimentais com base na MS e teor de aminoácidos essências.

Composição Química[1]	Dietas[5]			
	CTL	ULL	PML	PML+ULL
Matéria Seca, %	64,83	64,52	64,57	64,59
Proteína Bruta, %	17,26	16,47	16,90	16,40
Proteína Degradável no Rúmen[2], %	10,47	9,92	10,20	9,92
Extrato Etéreo, %	2,29	2,44	2,41	2,44
Extrativo Não Nitrogenado, %	55,17	56,69	55,56	56,67
Matéria Mineral, %	8,14	7,32	7,91	7,37
Nutrientes Digestíveis Totais[3], %	68,24	67,26	66,86	67,37
Fibra em Detergente Ácido, %	24,35	23,97	24,24	24,31
Fibra em detergente Neutro, %	38,54	38,18	38,32	38,54
Nitrogênio aderido à FDA, %	7,17	7,16	7,42	7,51
Nitrogênio aderido à FDN, %	13,57	12,33	13,31	12,47
Energia metabolizável, Mcal.kg^{-1}	2,50	2,52	2,50	2,51
Energia Líquida Lactação, Mcal.kg^{-1}	1,56	1,58	1,56	1,57
Carboidratos não fibrosos[4], %	33,77	35,59	34,46	35,25
Celulose, %	21,98	21,68	22,04	22,04
Lignina, %	2,32	2,31	2,25	2,29
Hemi-celulose, %	14,20	14,22	14,10	14,23
Aminoácidos[6], g/kg de PB	Dietas[4]			
	CTL	ULL	PML	PML+ULL
Arginina	137,09	98,22	118,15	108,13
Histidina	62,30	46,92	53,76	51,72
Isoleucina	98,12	72,48	86,08	81,46
Leucina	193,53	148,89	166,85	163,97
Lisina	123,85	89,23	108,91	100,62
Metionina	35,65	27,43	32,10	31,71
Fenilalanina	114,47	85,13	98,85	93,92
Treonina	89,32	66,77	78,74	75,44
Triptofano	24,69	17,81	21,66	20,03
Valina	109,33	82,11	95,92	92,24

[1] Análises químicas dos alimentos realizada pelo Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa-SP.
[2] Proteína Degradável no Rúmen estimada de acordo com o NRC (2001).
[3] Nutrientes Digestíveis Totais (NDT): estimativa de NDT calculado de acordo com a fórmula de Weiss et al. (1992).
[4] Carboidratos não fibrosos (CNF) = 100 – (PB+EE+cinzas+FDN).
[5] Dietas: CTL = Controle (sem PML e sem ULL), ULL = Ureia de Liberação Lenta (sem PML e com ULL), PML = Proteína Microbiana Derivada de Levedura (com PML e sem ULL) e PML+ULL = Proteína Microbiana Derivada de Levedura e Ureia de Liberação Lenta (com PML e com ULL.
[6] Teor de aminoácido estimado de acordo com o NRC (2001).

A ração diária de cada animal era pesada, sendo metade oferecida às 8 horas da manhã e o restante às 16 horas, imediatamente após as ordenhas, em cochos individuais. A

quantidade de alimento oferecido diariamente foi ajustada em função das sobras do dia anterior, de forma a permitir sobras de 10% sobre a quantidade ofertada.

4.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino duplo balanceado, com quatro tratamentos em quatro períodos, sendo duas repetições por tratamento de acordo com o esquema da Tabela 6. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2x2, com a presença ou ausência da proteína microbiana derivada de levedura, combinado com a presença ou ausência da ureia de liberação lenta, na MS da dieta e a interação. Os tratamentos foram aleatoriamente distribuídos entre os animais em cada período, de modo que cada vaca recebesse o mesmo tratamento uma única vez.

Tabela 6 – Delineamento de dois quadrados latinos 4x4, balanceados, com 4 animais, 4 tratamentos[1] e 4 períodos cada.

	ANIMAL			
PERÍODO	1	2	3	4
I	CTL	PML+ULL	PML	ULL
II	PML+ULL	PML	ULL	CTL
III	ULL	CTL	PML+ULL	PML
IV	PML	ULL	CTL	PML+ULL
	ANIMAL			
PERÍODO	5	6	7	8
I	CTL	PML+ULL	PML	ULL
II	PML+ULL	PML	ULL	CTL
III	ULL	CTL	PML+ULL	PML
IV	PML	ULL	CTL	PML+ULL

[1] Tratamentos: CTL = Controle (sem PML e sem ULL), ULL = Ureia de Liberação Lenta, PML = Proteína Microbiana Derivada de Levedura e PML+ULL = Proteína Microbiana Derivada de Levedura e Ureia de Liberação Lenta.

Os quatro períodos experimentais tiveram duração de quatro semanas (28 dias) cada, sendo três semanas de adaptação (21 dias) e uma semana para coleta de dados (sete dias), totalizando 112 dias de estudo.

4.4 Medições e amostragens

O consumo individual de matéria seca, CMS, foi avaliado diariamente entre o 22º ao 28º dia de cada período experimental. O nível de oferta foi ajustado para manter o consumo *ad libitum* permitindo 10% de sobras da matéria natural durante todo o período experimental.

A amostragem de alimentos e sobras para análises químicas foram realizadas diariamente do 22º ao 28º dia e posteriormente foi feito um *pool*, semanal, representando o período experimental para cada animal. Após cada coleta, as amostras foram congeladas para posteriores análises bromatológicas. O CMS diário foi calculado pela diferença entre a quantidade de MS da dieta fornecida no dia e a quantidade da MS das sobras do dia seguinte.

Para as determinações bromatológicas e cálculo do consumo baseado na matéria seca, as amostras foram secas em estufa a 55º por 72 horas, moídas em moinho tipo Willey e peneiras com malhas de 1 mm e compostas por cada sub período experimental.

As pesagens de leite foram realizadas diariamente e no 27º dia de cada período experimental, uma amostra de leite foi tomada proporcionalmente a produção individual de cada animal por ordenha, sendo que neste experimento os animais foram ordenhados duas vezes ao dia (as 8 e as 16 horas), para posteriores análises de contagem células somáticas (CCS) e determinações de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, caseína e nitrogênio ureico. Para a CCS, foi realizada uma transformação logarítmica em base decimal (log (CCS)).

Figura 4 – Ordenha diária dos animais e amostragem do leite para análise de composição.

As amostras foram preservadas em frascos plásticos contendo conservantes (2-bromo-2 nitropropano-1-3 diol) e encaminhadas para a Clínica do Leite – ESALQ/USP – Piracicaba-SP, para realização das análises. A produção de leite obtida foi corrigida para 4% de gordura (LCG, leite corrigido para gordura) de acordo com a equação proposta pelo NRC (2001):

LCG (kg/dia) = (0,4 x produção de leite (kg)) + (15 x produção gordura (kg/dia)),

e também corrigida para energia (LCE, leite corrigido para energia) de acordo com a equação proposta por Ulbrich[1] et al.,(2004 apud Maysami, 2013, p.148):

[1] ULBRICH, M., HOFFMANN, M.; DROCHNER, W. Fütterung ung Tiergesundheit. Eugen Ulmer Verlage, Stuttgart, Germany. 2004.

LCE (kg) = ((0,38 x gordura (%) + 0,21 x proteína (%) + 1,05) x produção de leite (kg)) / 3,28.

A eficiência na produção de leite foi computada para cada vaca, dividindo-se a produção média diária de leite pela ingestão média diária de MS da última semana de cada período experimental (VALADARES FILHO et al., 2000).

As coletas de sangue foram realizadas às cinco horas da manhã do 22º dia de cada período experimental para determinação do teor de nitrogênio ureico. O horário de coleta foi adotado em função da temperatura ambiente mais amena, visto que a elevação da temperatura acarretava erros de leitura no aparelho de gasometria e perdas de cartuchos. A coleta de sangue foi através da punção da veia jugular, utilizando materiais descartáveis e individuais. A agulha para a coleta foi 40 x 16 mm e seringas de, no máximo, 3 mL para evitar a formação de bolhas de ar nas mesmas que acarretava erros na leitura do aparelho e perda do cartucho.

Figura 5 – Materiais para coleta de sangue, analisador portátil e cartuchos para análises dos parâmetros sanguíneos.

As amostragens de urina foram realizadas por três dias consecutivos, do 22º dia ao 24º dia, quatro horas após o fornecimento da alimentação matinal, com indução à micção por estimulação através de massagem na vulva. Posteriormente as amostras foram compostas por animal de modo a representar o período experimental. Para o cálculo do balanço de nitrogênio foi realizada a determinação da concentração de creatinina (VALADARES et al., 1999) a partir de 50 mL de urina da amostra *spot*. Para análise da concentração de creatinina, 50 mL de urina foi coletada, e após homogeneização e filtragem, alíquotas de 5 mL foram obtidas e diluídas em 20 mL de ácido sulfúrico 0,036 N. Estas amostras tiveram seu pH ajustado para abaixo de 3 a fim de evitar destruição bacteriana dos derivados de purina, e foram

acondicionadas em recipientes plásticos devidamente identificados e congelados (-20ºC) para posterior análise. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação de nitrogênio.

Figura 6 – Amostras de urina para análise do teor de nitrogênio e creatinina para o cálculo do balanço nitrogenado.

Amostragens de fezes foram realizadas por três dias consecutivos, do 22º ao 24º dia de cada período experimental, diretamente da ampola retal de cada animal. Posteriormente as amostras foram compostas por animal de modo a representar o período experimental. Para determinação do volume de fezes excretadas para o cálculo do balanço de nitrogênio, foi realizada a coleta e pesagem total das fezes excretadas por cada animal durante um período de 72 horas, sendo iniciada assim que os animais voltavam para o *free stall*, após a ordenha da manhã do 22º dia até o mesmo horário do 25º dia de cada período experimental.

Figura 7 – Coleta total de fezes para determinação do teor de N nas fezes e cálculo do balanço nitrogenado.

4.5 Análises laboratoriais

As análises químicas dos alimentos e sobras foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, SP. As amostras foram analisadas

para determinações de matéria seca (MS) através do resíduo da secagem da amostra em estufa a 103 - 105°C, matéria mineral (MM) através do resíduo da incineração da amostra em forno mufla a 500 - 550°C, proteína bruta (PB) pelo método de Kjeldahl (micro) e extrato etéreo (EE) através do resíduo de substâncias solúveis em éter de petróleo de acordo com as metodologias descritas no AOAC (1990). O extrativo não nitrogenado (ENN) foi obtido pela equação ENN = (100) - (%PB + %MM + %EE + %FB). A fibra em detergente ácido (FDA), a fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidas de acordo com Van Soest (1963) e a hemicelulose de acordo com Van Soest et al. (1991). A lignina e celulose obtida por hidrólise em ácido sulfúrico a partir do resíduo de FDA de acordo com o método de Van Soest et al.(1991). O nitrogênio retido na fração FDN e na fração FDA, N-FDN e N-FDA respectivamente, foram obtidos pela análise do nitrogênio contido no resíduo da FDN ou FDA, resultado expresso como % do N ou PB total da amostra pelo método de Kjeldahl e nutrientes digestíveis totais (NDT) de acordo com a equação de Weiss, Conrad e Stpierre (1992).

Todas as determinações feitas nas amostras de leite foram realizadas pelo laboratório da Clínica do Leite, do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ, Piracicaba, SP. As análises do teor de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado do leite foram analisadas pelo método de infravermelho através do analisador Bentley 2000 (Bentley Instruments®), a contagem de células somáticas foi determinada por citometria de fluxo pelo analisador Somacont 300 (Bentley Instruments®), o teor de caseína foi determinado pelo método de infravermelho transformado de Fourier, com o analisador Combi Foss 6000 FTIV e o teor de nitrogênio ureico foi determinado por metodologia enzimática, colorimétrica ou infravermelha pelo analizador ChemSpec 150 (Bentley Instruments®).

Amostras individuais de sangue venoso foram cuidadosamente coletadas e imediatamente inseridas nas células dos cartuchos de gasometria para determinações sanguíneas. O modelo do cartucho utilizado foi o EC8+ da marca Abbott® (Abbott Park, IL, USA). Além do teor de nitrogênio ureico, este modelo de cartucho permite também as determinações de sódio, potássio, cloreto, glicose, pH, pressão parcial de dióxido de carbono e hematócrito no sangue total. A partir desses valores medidos ainda foram determinados bicarbonato, dióxido de carbono total excesso de bases, ânion gap e hemoglobina. O procedimento exigiu uma quantidade exata de sangue para preencher a célula do cartucho no momento de inseri-lo no analisador. O cartucho apresentava uma marcação pré-determinada indicando o nível máximo de sangue para cada amostra. Em seguida o cartucho era inserido

no analisador automático portátil, i-STAT® (Portable Clinical Analyser – iSTAT Corporation, NJ, EUA) e após 2 minutos os resultados eram apresentados.

As determinações na urina do teor de nitrogênio e de creatinina foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia (Nova Odessa/ SP) e no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), respectivamente.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM®. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4.900 µL de água deionizada. Os resultados obtidos foram calculados pela seguinte fórmula:

Creatinina ($mg.dL^{-1}$) = creatinina ($mg.dL^{-1}$)*0,020*50 (COOPER; BIGGS, 1961).

O volume urinário total diário foi estimado através da relação entre a excreção diária de creatinina na urina e os valores de creatinina encontrados na amostra *spot*, de acordo com Oliveira et al. (2001b). A excreção diária de creatinina na urina foi estimada a partir da proposição de 24,05 $mg.kg\ PV^{-1}$ (CHIZZOTTI et al., 2008). Assim, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina ($mg.dL^{-1}$) na amostra *spot*, foi estimado o volume urinário total diário (L/vaca/dia).

O consumo de nitrogênio foi determinado retirando-se o valor de conversão do nitrogênio total das amostras para obtenção do valor de proteína bruta (6,25), obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumido. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de proteína bruta nas fezes, obtendo-se a excreção total de nitrogênio em $g.kg^{-1}$ de MS.

Para a determinação do nitrogênio nas amostras de urina, a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina foi obtida pela divisão do valor de PB da amostra de urina pelo fator 6,25 e para a amostra de leite o valor de PB foi dividido pelo fator 6,38 (SILVA; QUEIROZ, 2002).

O cálculo do balanço de nitrogênio foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio em gramas consumido pelos valores de nitrogênio na urina, fezes e leite, obtendo-se os valores de nitrogênio retido em gramas e em porcentagem de nitrogênio total.

4.6 Análises estatísticas

Os efeitos dos tratamentos sobre as características avaliadas foram analisados por análise de variância, utilizando o procedimento GLM - *General Linear Model* do software SAS (*Software Analyses Statistical* – versão 9.2, SAS Institute, Inc. Cary, NC, EUA, 2009), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo Proc GLM. Os dados foram analisados de acordo com os efeitos principais da presença ou ausência da PML, e da presença ou ausência da ULL, e a interação, pelo comando Proc MIXED do SAS, adotando-se nível de significância de 5%, de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = \mu + D_i + O_j + D_i x O_j + Q_k + V(Q)_l + P_m + \varepsilon_{ijklm}$$

Onde:

Y_{ijkl} = é a observação referente à fonte nitrogenada i e j, no quadrado latino k, na vaca l, no período m.

μ = média geral do experimento;

D_i = efeito de PML, (i = 1 a 2), 1 = Sem PML e 2 = Com PML;

O_j = efeito de ULL, j (j = 1 a 2), 1 = Sem ULL e 2 = Com ULL;

$D_i x O_j$ = Interação entre PML e ULL;

Q_k = Efeito do quadrado latino k, (k = 1 a 2);

$V(Q)_l$ = Efeito de vaca dentro de cada quadrado latino, l (l = 1 a 8); l = Animal dentro de quadrado latino;

Pm = Efeito do período m, (m = 1 a 4);

ε_{ijklm} = Erro aleatório associado a cada observação.

Quando foi observado efeito significativo de tratamento pelo teste F ($P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste t-Student.

5 RESULTADOS

5.1 Consumo de MS

Para a variável de consumo de matéria seca houve interação entre a PML e ULL, (P=0,0003). Para os animais que receberam os tratamentos sem PML, o consumo foi maior quando a ULL também não estava presente (P=0,001), sendo que os valores médios de CMS foram 20,9 e 18,0 kg.dia^{-1} para os animais que receberam os tratamentos CTL (sem PML e sem ULL) e ULL respectivamente. Para os animais que receberam os tratamentos que

continham a PML, o maior consumo médio foi verificado quando as dietas também continham a ULL (P=0,03), sendo que os valores médios de CMS foram 18,0 e 19,8 kg.dia^{-1} para os animais que receberam os tratamentos PML e PML+ULL, respectivamente. Nos tratamentos que não continham a ULL, o CMS dos animais submetidos ao tratamento CTL (sem PML e sem ULL) foi maior do que dos animais que receberam o tratamento PML (P=0,001). Já para os animais que receberam tratamentos que continham ULL, o consumo foi maior quando a PML também estava presente (P=0,03), sendo que os valores médios de CMS foram de 18,0 e 19,8 kg.dia^{-1} para os animais que receberam os tratamentos ULL e PML+ULL, respectivamente. O mesmo comportamento foi encontrado para o CMS quando expresso em porcentagem do peso vivo conforme Tabela 7.

5.2 Produção de leite

Para a variável produção de leite houve interação entre PML e ULL (P=0,0013), conforme Tabela 7.

Para os animais que receberam tratamentos sem PML a produção de leite foi maior quando a ULL não estava presente (P=0,03), isto é, quando a principal fonte proteica da dieta foi o farelo de soja (CTL = sem PML e sem ULL).

Tabela 7 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre o consumo de matéria seca e a produção de leite obtida e corrigida para 4% gordura e para energia.

Variáveis	Tratamentos				EPM[3]	Pr > F		
	Sem PML		Com PML			PML	ULL	PML x ULL
	Sem ULL	Com ULL	Sem ULL	Com ULL				
CMS, kg	20,9Aa	18,0bB	18,0bB	19,8aA	0,53	0,262	0,311	0,0003
CMS, % PV	3,9Aa	3,4bB	3,4bB	3,7Aa	0,09	0,300	0,255	0,0001
Leite, kg.dia^{-1}	25,2aA	23,4aB	22,6bB	24,7aA	0,52	0,216	0,693	0,0013
LCG 4%[1], kg.dia^{-1}	24,8Aa	22,5aB	22,2bB	24,0aA	0,55	0,290	0,699	0,0018
LCE[2], kg.dia^{-1}	24,7aA	22,3aB	22,0bB	23,7aA	0,53	0,276	0,551	0,0011

A,B– Médias seguidas por letras maiúsculas dentro dos tratamentos sem a proteína microbiana derivada de levedura (sem PML) e com a proteína microbiana derivada de levedura (com PML) diferem entre si, P<0,05.
a,b – Médias seguidas por letras minúsculas nos tratamentos sem a ureia de liberação lenta (sem ULL) e com a ureia de liberação lenta (com ULL) diferem entre si, P<0,05.
[1] LCG 4% = Produção de leite corrigida para 4 % gordura.
[2] LCE = Produção de leite corrigida para energia.
[3] EPM = Erro Padrão da Média.

Para os animais que receberam tratamentos com a PML as maiores produções de leite foram obtidas quando a ULL estava associada (P=0,008). Os animais que receberam as dietas sem a ULL tiveram maiores produções de leite quando a PML também não estava presente, (P=0,002). Já os animais que receberam dietas com a ULL não houve diferença na produção de leite em relação à presença da PML, isto é para os tratamentos ULL e PML+ULL (P=0,09). Os animais que receberam o tratamento que associava a PML+ULL tiveram as maiores produções de leite e não diferiram dos tratamentos sem a PML (CTL e ULL). A presença da ULL não acarretou diferença na produção de leite, independente da presença da PML.

Tanto a produção de leite corrigida tanto para 4% de gordura (LCG 4%) quanto para energia (LCE) apresentaram o mesmo comportamento que a variável produção de leite não corrigida, conforme Tabela 7.

5.3 Eficiência de produção

Em relação à eficiência na produção de leite, não houve interação entre a PML e a ULL (P=0,069) e não houve diferença entre os tratamentos que continham ou não a PML (P=0,860) e entre os tratamentos que continham ou não a ULL (P=0,074), conforme Figura 8.

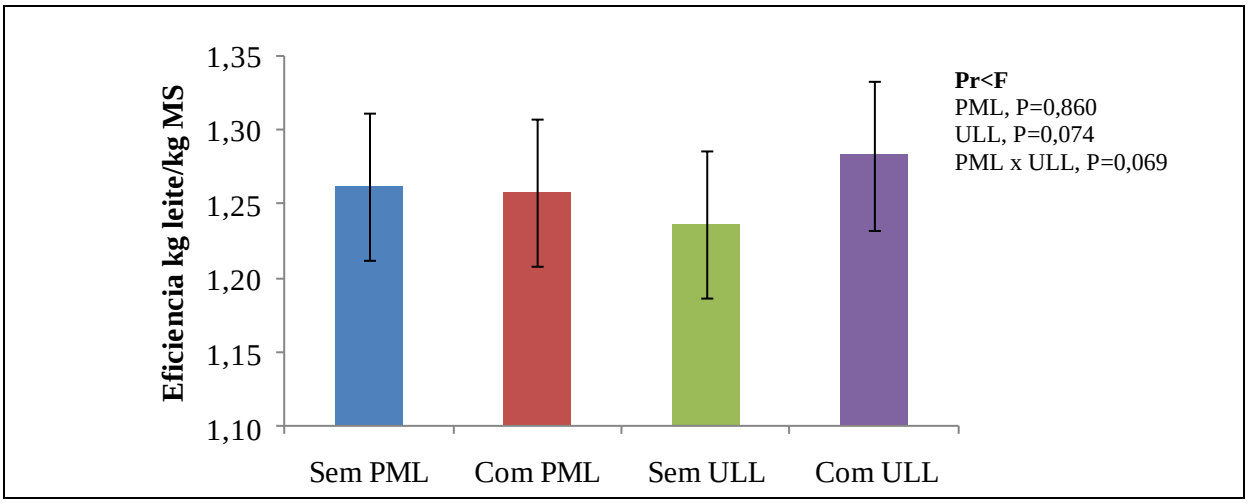


Figura 8 – Efeito da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre a eficiência de produção de leite.

Foram avaliadas também as eficiências da produção de leite corrigida para 4% de gordura e para energia, e os resultados foram apresentados, conforme Tabela 8.

Não houve interação entre a PML e a ULL para a eficiência na produção de leite corrigida para 4% gordura (P=0,826) e não houve diferença entre os tratamentos que

continham ou não a PML (P=0,65) e nem entre os tratamentos que continham ou não a ULL (P=0,12).

Tabela 8 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre a eficiência da produção de leite obtida e corrigida para 4% de gordura e para energia.

Variáveis	Tratamentos[4]				EPM[5]	Pr> F		
	PML		ULL			PML	ULL	PML x ULL
	Sem	Com	Sem	Com				
EP[1]	1,262	1,257	1,236	1,283	0,017	0,860	0,074	0,069
EP LCG 4%[2]	1,031	1,025	1,019	1,038	0,008	0,647	0,120	0,826
EP LCE[3]	1,038	1,032	1,023b	1,047a	0,007	0,539	0,031	0,640

[1] EP = Eficiência na produção de leite.
[2] EP LCG 4%= Eficiência na produção de Leite Corrigida para 4% de Gordura.
[3] EP LCE= Eficiência na produção de Leite Corrigida para Energia.
[4] PML = Proteína Microbiana Derivada de Levedura, ULL = Uréia de Liberação Lenta.
[5] EPM= Erro Padrão da Média.

Para a eficiência na produção de leite corrigida para energia, não houve interação entre a PML e a ULL (P=0,64) e não houve diferença entre os tratamentos que continham ou não a PML (P=0,54). Porém, para os tratamentos que continham ou não a ULL, a presença da ULL resultou em uma maior eficiência, comparado aos valores obtidos nos tratamentos em que a ULL não estava presente (P=0,03).

Os animais submetidos ao tratamento que continha apenas a ULL tiveram um consumo menor de MS não havendo diferença na produção de leite quando comparados aos animais submetidos ao tratamento que associava a PML+ULL. A presença da ULL na dieta desses animais os tornou mais eficientes para produção de leite corrigida para energia quando comparados com os tratamentos que não continham a ULL na dieta independente da presença da PML.

5.4 Composição do Leite

Os resultados da composição do leite produzido pelos animais que receberam as dietas experimentais encontram-se na Tabela 9.

Não houve interação entre a PML e a ULL para as variáveis de composição do leite expressas em % (P>0,09), exceto para o extrato seco desengordurado (P=0,009 e P=0,0007, expressos em % e g.dia^{-1}, respectivamente) e para a produção diária de gordura (P=0,005), proteína (P=0,0004), lactose (P=0,002). e sólidos totais (P=0,0008) , conforme Tabela 9.

Tabela 9 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre os componentes totais do leite.

Variáveis	Tratamentos[1]				EPM[6]	Pr > F		
	Sem PML		Com PML			PML	ULL	PML x ULL
	Sem ULL	Com ULL	Sem ULL	Com ULL				
Gordura, %	3,90	3,77	3,91	3,80	0,08	0,835	0,156	0,883
Gordura,g.dia^{-1}	0,98Aa	0,88Ba	0,88Ab	0,94Aa	0,03	0,395	0,443	0,005
Proteína, %	3,25	3,09	3,24	3,16	0,03	0,366	0,002	0,298
Proteína,g.dia^{-1}	0,82Aa	0,72Bb	0,73Ab	0,78Aa	0,02	0,282	0,161	<0,001
Lactose, %	4,60	4,56	4,52	4,56	0,02	0,168	0,898	0,107
Lactose, g.dia^{-1}	1,16Aa	1,07Ba	1,02Bb	1,13Aa	0,03	0,167	0,684	0,002
ST[2], %	12,67	12,34	12,59	12,47	0,10	0,816	0,027	0,291
ST[2], g.dia^{-1}	3,19Aa	2,89Ba	2,83Ba	3,07Aa	0,07	0,237	0,673	<0,001
ESD[3], %	8,77Aa	8,57Bb	8,69Aa	8,67Aa	0,03	0,859	0,002	0,009
ESD[3], g.dia^{-1}	2,21Aa	2,00Ba	1,96Bb	2,14Aa	0,05	0,208	0,847	<0,001
NUL[4],mg.dL^{-1}	16,20	17,60	17,19	16,79	0,88	0,922	0,578	0,322
Caseína, %	2,46	2,30	2,44	2,39	0,03	0,265	0,003	0,094
Caseína, % proteína	75,63	74,34	75,14	75,52	0,50	0,501	0,383	0,113
log CCS[5], céls./mL	2,37	2,44	2,21	2,03	0,20	0,501	0,383	0,113

A,B– Médias seguidas por letras maiúsculas dentro dos tratamentos sem a proteína microbiana derivada de levedura (sem PML) e com a proteína microbiana derivada de levedura (com PML) diferem entre si, P<0,05.
a,b – Médias seguidas por letras minúsculas nos tratamentos sem a ureia de liberação lenta (sem ULL) e com a ureia de liberação lenta (com ULL) diferem entre si, P<0,05.
[1] PML = Proteína microbiana derivada de levedura, ULL = Ureia de Liberação Lenta.
[2] ST = Sólidos Totais, representa todos os componentes do leite, exceto a água.
[3] ESD = Extrato Seco Desengordurado, representa todos os componentes do leite, exceto a água e a gordura.
[4] NUL = Nitrogênio Ureico no Leite.
[5] log CCS = Contagem de Células Somáticas transformados para logaritmo na base 10 (log 10).
[6] EPM = Erro Padrão da Média.

O teor médio de gordura no leite dos animais que receberam os tratamentos sem a PML e com a PML foram 3,84 e 3,85%, respectivamente (P=0,84). Os animais que receberam

os tratamentos sem a ULL e com a ULL tiveram teores de gordura no leite iguais a 3,90 e 3,78% respectivamente, não havendo diferença entre si (P=0,16). Já para a produção diária de gordura no leite, os animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) tiveram maior produção diária de gordura quando comparados aos animais que receberam o tratamento contendo apenas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,0116). Os animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) também tiveram maior produção diária de gordura quando comparados aos animais que receberam o tratamento apenas com PML (com PML e sem ULL) (P=0,01). Não houve diferença na produção diária de gordura para os animais que receberam tratamentos com PML independente da presença da ULL (P=0,106) bem como para os animais que receberam tratamentos com a ULL independente da presença da PML (P=0,119).

O teor de proteína no leite dos animais que receberam os tratamentos que não continham a ULL foi maior do que os animais que receberam os tratamentos que continham a ULL (P=0,002) e não houve diferença no teor de proteína no leite dos animais que receberam os tratamentos que continham ou não a presença da PML (P=0,37). Comportamento semelhante foi encontrado para o teor de caseína. Os animais que receberam os tratamentos que não continham a ULL apresentaram os maiores teores de caseína no leite em relação aos animais que receberam os tratamentos que continham a ULL (P=0,003). Para os animais que receberam tratamentos que continham ou não a PML não houve diferença quanto ao teor de caseína no leite (P=0,27). Para a produção diária de proteína no leite, os animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) tiveram maior produção diária de proteína comparada aos animais que receberam o tratamento que continha apenas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,0007). Os animais que receberam o tratamento CTL também tiveram maior produção diária de proteína quando comparados aos animais que receberam o tratamento que continha apenas a PML (com PML e sem ULL) (P=0,0013). Os animais que receberam o tratamento que continha a associação da PML e da ULL (com PML e com ULL) tiveram maior produção de proteína diária no leite do que os animais que receberam o tratamento que continha a penas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,0376). Não houve diferença na produção diária de proteína no leite dos animais que receberam tratamentos com PML independente da presença da ULL (P=0,0614).

A produção diária de lactose no leite dos animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) foi maior do que a dos animais que receberam o tratamento que continha apenas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,033) bem como superior a dos animais que receberam o tratamento que continha apenas a PML (com PML e sem ULL) (P=0,002).

Os animais que receberam o tratamento que associava a PML com a ULL (com PML e com ULL) tiveram a produção diária de lactose superior a dos animais que receberam o tratamento que continha apenas a PML (com PML e sem ULL) (P=0,0097) Não houve diferença na produção diária de lactose no leite dos animais que receberam o tratamento que continha a ULL independente da presença da PML (P=0,1306).

O teor de sólidos totais no leite dos animais que receberam os tratamentos que não continham a ULL foi maior do que os encontrados no leite dos animais que receberam os tratamentos que continham a ULL (P=0,03) e não houve diferença no teor de sólido no leite dos animais que receberam os tratamentos que continham ou não a PML (P=0,82). A produção diária de sólidos totais no leite dos animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) foi maior do que a produção diária dos animais que receberam o tratamento contendo apenas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,0057) bem como superior a produção diária dos animais que receberam o tratamento que continha apenas a PML (com PML e sem ULL) (P=0,0016). Os animais que receberam o tratamento que associava a PML e a ULL (com PML e com ULL) tiveram maior produção diária de sólidos totais no leite quando comparados aos animais que receberam o tratamento que continha apenas a PML (com PML e sem ULL) (P=0,0209). Não houve diferença na produção diária de gordura para os animais que receberam tratamentos com ULL independente da presença da PML (P=0,0646).

Houve interação entre a PML e a ULL para o teor de extrato seco desengordurado do leite (P=0,009). Os animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) tiveram o teor de extrato seco desengordurado maior comparado aos animais que receberam o tratamento que continha apenas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,0002). Para os animais que receberam os tratamentos que continham a PML não houve diferença no teor de extrato seco desengordurado no leite dos animais independente da presença da ULL (P=0,656). Não houve diferença no extrato seco desengordurado no leite dos animais que receberam os tratamentos sem a presença da ULL, independente da presença da PML (P=0,066). Os animais que receberam o tratamento que continha a PML associada com a ULL (com PML e com ULL) tiveram um teor de extrato seco desengordurado maior do que os animais que receberam o tratamento que continha apenas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,040). A produção diária de extrato seco desengordurado no leite dos animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) foi maior do que a dos animais que receberam o tratamento contendo apenas a ULL (sem PML e com ULL) (P=0,0072) bem como superior a dos animais que receberam o tratamento apenas com PML (com PML e sem ULL) (P=0,0013). Os animais que receberam o tratamento que associava a PML e a ULL (com

PML e com ULL) tiveram produções diárias maiores e extrato seco desengordurado no leite do que os animais que receberam o tratamento que continha apenas a PML (com PML e sem ULL) (P=0,0131). Não houve diferença na produção diária de extrato seco desengordurado para os animais que receberam tratamentos com ULL independente da presença da PML (P=0,0645).

5.5 Parâmetros sanguíneos

Não houve interação entre a PML e a ULL (P>0,10) para os parâmetros sanguíneos avaliados conforme Tabela 10, exceto para o teor de potássio sanguíneo (P=0,01) conforme Figura 9.

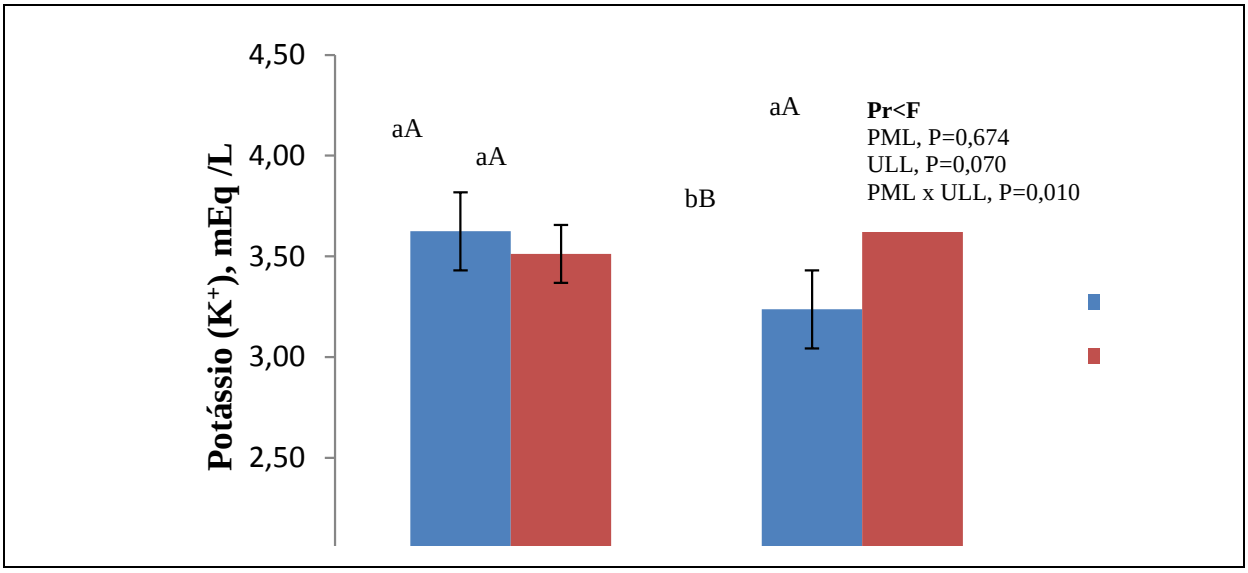
Tabela 10 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre os valores obtidos por gasometria dos metabólitos e gases sanguíneos.

Variáveis[1]	Tratamentos[2]				EPM[3]	Pr> F		
	PML		ULL			PML	ULL	PML x ULL
	Sem	Com	Sem	Com				
Na^+, $mEq.L^{-1}$	138,00	139,19	138,25	138,84	0,756	0,281	0,528	0,281
Cl^-, $mEq.L^{-1}$	98,94	99,19	99,06	99,06	0,896	0,846	1,000	0,292
Glu, $mg.dL^{-1}$	65,16	65,07	64,10	66,13	0,896	0,942	0,131	0,613
pH	7,46	7,46	7,46	7,46	0,006	0,834	0,917	0,135
PCO_2, mmHg	42,60	42,02	41,78	42,84	0,595	0,498	0,225	0,169
NUS, $mg.dL^{-1}$	15,94	17,00	15,00	17,94	1,008	0,466	0,054	0,897
Ht, %	26,19B	27,31A	26,06b	27,44a	0,312	0,020	0,006	0,272
HCO_3^-, $mEq.L^{-1}$	29,82	29,91	29,69	30,04	0,605	0,914	0,693	0,725
TCO_2, $mEq.L^{-1}$	31,31	31,45	30,08	31,69	0,503	0,852	0,415	0,723
EB, $mEq.L^{-1}$	6,38	6,06	5,94	6,50	0,583	0,709	0,504	0,823
AnGAP, $mEq.L^{-1}$	12,88	13,56	13,25	13,19	0,277	0,096	0,875	0,096
Hb, $g.dL^{-1}$	8,91B	9,28A	8,86b	9,33a	0,106	0,022	0,005	0,228

A, B – Médias seguidas por letras maiúsculas dentro dos tratamentos sem a proteína microbiana derivada de levedura (sem PML) e com a proteína microbiana derivada de levedura (com PML) diferem entre si, P<0,05.
a, b – Médias seguidas por letras minúsculas nos tratamentos sem a ureia de liberação lenta (sem ULL) e com a ureia de liberação lenta (com ULL) diferem entre si, P<0,05.
[1] Glu = glicose, pH = Potencial hidrogeniônico, PCO_2 = Pressão parcial de dióxido de carbono, NUS = nitrogênio ureico no sangue, Ht = hematócrito, HCO_3^- = bicarbonato, TCO_2 = Dióxido de carbono total, BE = excesso de bases, AnGAP = anion gap ou janela aniônica, Hb = hemoglobina.
[2] PML = Proteína Microbiana Derivada de Levedura, ULL = Ureia de Liberação Lenta
[3] EPM = Erro padrão da média.

Os valores encontrados para os eletrólitos Na^+, K^+ e Cl^- estão expressos em $mEq.L^{-1}$. Para os eletrólitos Na^+ e Cl^-, não houve interação entre a PML e a ULL (P=0,28 e P=0,29, respectivamente), nem diferença quanto à presença ou ausência da PML (P=0,28 e P=0,85, respectivamente) bem como quanto à presença ou ausência da ULL (P=0,53 e P= 1,00, respectivamente).

Para o eletrólito K^+, houve interação entre a PML e a ULL (P=0,01). Para os animais que receberam os tratamentos que não continham a PML, não houve diferença para o teor de K^+ sanguíneo independente da presença da ULL (P=0,505). Para os animais que receberam tratamentos que continham a PML, houve diferença quanto a presença ou não da ULL (P=0,003) e os teores médio de K^+ encontrados foram iguais a 3,24 e 3,80 $mEq.L^{-1}$ para os animais que receberam os tratamentos PML e PML+ULL respectivamente. Para os animais que receberam os tratamentos que não continham a ULL, houve diferença quanto a presença ou não da PML (P=0,031) e os teores médios de K^+ encontrados foram iguais a 3,63 e 3,24 $mEq.L^{-1}$ para os animais que receberam os tratamentos CTL (sem PML e sem ULL) e PML (com PML e sem ULL) respectivamente. Os animais que receberam os tratamentos que continham a ULL, não apresentaram diferença no teor médio de K^+ independente da presença da PML (P=0,10) sendo que os teores médios de K^+ encontrados foram iguais a 3,51 e 3,80 $mEq.L^{-1}$ para os animais que receberam os tratamentos com a ULL e com a associação da PML+ULL respectivamente.



A, B– Médias seguidas por letras maiúsculas dentro dos tratamentos sem a proteína microbiana derivada de levedura (sem PML) e com a proteína microbiana derivada de levedura (com PML) diferem entre si, P<0,05.
a, b – Médias seguidas por letras minúsculas nos tratamentos sem a ureia de liberação lenta (sem ULL) e com a ureia de liberação lenta (com ULL) diferem entre si, P<0,05.

Figura 9 – Teores médios de K sanguíneo, $mEq.L^{-1}$, obtidos por gasometria em função dos tratamentos.

Não houve interação entre a PML e a ULL para os valores de hematócrito sanguíneo (P=0,272), mas houve diferença quanto à presença ou não da PML e da ULL. Os animais que receberam tratamentos que continham a PML tiveram valores de hematócrito mais elevados do que os animais que receberam tratamentos que não continham a PML (P=0,02) e os animais que receberam tratamentos que continham a ULL tiveram valores de hematócrito maiores do que os animais que receberam os tratamentos que não continham a ULL (P=0,006).

Comportamento semelhante ao hematócrito foi encontrado para hemoglobina. Não houve interação entre a PML e a ULL para os valores de hemoglobina (P=0,228), mas houve diferença quanto à presença ou não da PML ou da ULL. Os animais que receberam tratamentos que continham a PML tiveram valores de hemoglobina mais elevados do que os animais que receberam tratamentos que não continham a PML (P=0,022) e os animais que receberam tratamentos que continham a ULL tiveram valores de hemoglobina maiores do que os animais que receberam tratamento que não continham a ULL (P=0,005).

5.6 Balanço nitrogenado

Os valores obtidos para eficiência do uso do N são apresentados na Tabela 11 e Figura 10.

Houve interação entre a PML e a ULL para o consumo médio total de N ingerido por dia (P<0,001). Os animais que receberam os tratamentos que não continham a PML tiveram diferença na ingestão média de N e apresentaram valores iguais a 574,7 e 474,8 $g.dia^{-1}$ quando na ausência e presença da ULL respectivamente (P<0,0001). Para os animais que receberam os tratamentos com a PML, não houve diferença no consumo médio de N independente da combinação com a ULL (P=0,073). Os animais que receberam tratamentos que não continham a ULL tiveram diferença na ingestão média de N quanto a presença ou não da PML, sendo que os animais que receberam o tratamento sem PML e sem ULL (CTL) tiveram um consumo maior é igual a 574,7 $g.dia^{-1}$ comparado aos animais que receberam o tratamento com a PML os quais tiveram um consumo de 483,3 $g.dia^{-1}$ (P<0,0001).

Já os animais que receberam tratamentos que continham a ULL tiveram consumos maiores e iguais a 518,2 $g.dia^{-1}$ quando a PML também estava presente (PML+ULL),

Tabela 11 – Efeitos da proteína microbiana derivada de levedura e da ureia de liberação lenta sobre os valores obtidos para ingestão de nitrogênio, excreção e balanço nitrogenado.

Variáveis	Tratamentos				EPM[1]	Pr> F		
	Sem PML		Com PML			PML	ULL	PML x ULL
	Sem ULL	Com ULL	Sem ULL	Com ULL				
			Consumo, g.dia^{-1}					
Nitrogênio	574,7aA	474,8bB	483,3bA	518,2aA	12,92	0,079	0,022	<0,001
			Excreção de N, g.dia^{-1}					
Fezes	177,9aA	170,2aA	153,4bB	178,1aA	6,88	0,244	0,233	0,031
Urina	105,1	103,4	108,2	90,2	8,34	0,552	0,251	0,341
Leite	122,3	118,5	116,3	121,8	2,23	0,558	0,700	0,051
			Balanço, g.dia^{-1}					
Nitrogênio	169,4aA	82,7bB	105,4bA	128,1aA	14,05	0,513	0,035	0,001
			Excreção de N, % do Nitrogênio Total					
Fezes	30,9	35,9	31,8	34,5	1,05	0,804	0,002	0,282
Urina	18,3	22,1	22,9	17,7	2,00	0,961	0,727	0,039
Leite[2]	21,3bB	25,0aA	24,2aA	23,7aA	0,48	0,112	0,003	<0,001
			Balanço, % do Nitrogênio Total					
Nitrogênio retido	29,5aA	16,9bB	21,1bA	24,1aA	2,42	0,797	0,061	0,005
			Volume, L					
Urina	28,5	25,7	31,4	22,9	2,36	0,989	0,107	0,399

A, B – Médias seguidas por letras maiúsculas dentro dos tratamentos sem a proteína microbiana derivada de levedura (sem PML) e com a proteína microbiana derivada de levedura (com PML) diferem entre si, P<0,05.
a, b – Médias seguidas por letras minúsculas nos tratamentos sem a ureia de liberação lenta (sem ULL) e com a ureia de liberação lenta (com ULL) diferem entre si, P<0,05.
[1] EPM = Erro Padrão da Média.
[2] Eficiência da utilização de N: mensurada através da relação entre o teor de N presente no leite e a quantidade de N consumido pela vaca, dividido por 100.

comparados aos animais que receberam o tratamento em que o farelo de soja foi substituído apenas pela ULL em que o consumo médio de N foi igual a 474,8 g.dia^{-1} (P=0,029).

Houve interação entre a PML e a ULL para o teor médio de nitrogênio diário excretado nas fezes (P=0,031). Os animais que receberam os tratamentos sem a presença da PML, não apresentaram diferença quanto ao teor médio de N fecal independente da presença da ULL (P=0,442). Os animais que receberam tratamentos que continham a PML apresentaram diferença na excreção de N fecal, sendo maior e igual a 178,1 g.dia^{-1} no

tratamento PML+ULL, comparado ao tratamento PML que foi igual a 153,4 g.dia^{-1} (P=0,021). Já os animais que receberam tratamentos que não continham a ULL, a excreção de N fecal foi menor no tratamento com a PML, do que dos animais que receberam o tratamento CTL, sendo iguais a 153,4 e 177,9 g.dia^{-1} respectivamente (P=0,022). Os animais que receberam tratamentos que continham a ULL, não tiveram diferença quanto ao teor de N excretado nas fezes, independente da presença da PML (P=0,430). Entretanto, não houve interação entre a PML e a ULL para o teor relativo de N fecal (% N total) (P= 0,282). Os animais que receberam os tratamentos sem ULL e com ULL tiveram diferença nos valores relativos médios de N fecal sendo que os valores encontrados foram de 31,3 e 35,2% respectivamente (P=0,002). Já os animais que receberam os tratamentos sem a presença da PML e com a presença da PML não apresentaram diferença entre si quanto ao teor relativo médio de N nas fezes, sendo os valores iguais a 33,4 e 33,1% respectivamente (P=0,804).

Não houve interação entre a PML e a ULL (P=0,341), nem diferença entre os tratamentos sem e com a presença da PML (P=0,552) e nem entre os tratamentos que continham ou não a ULL (P=0,251) em relação ao teor médio diário de N excretado na urina. Os teores médios de N urinário foram iguais a 104,2 e 99,2 g.dia^{-1} para os tratamentos sem e com a presença da PML respectivamente e 106,7 e 96,8 g.dia^{-1} para os tratamentos sem e com a presença da ULL respectivamente. Entretanto, em relação ao teor relativo médio de N na urina (% N total), houve interação entre a PML e a ULL (P=0,039), porém não houve diferença entre nenhum dos tratamentos testados (P>0,05).

Houve interação entre a PML e a ULL (P=0,05) para o teor médio diário de N secretado no leite (P=0,05), mas não houve diferença entre os tratamentos CTL (sem PML e sem ULL), PML, ULL e PML+ULL (P>0,05). Entretanto, houve interação entre a PML e a ULL na proporção média de N secretado no leite (% N total) (P=0,0003). Os animais que receberam os tratamentos que não continham a PML tiveram proporções médias de N mais elevadas e iguais a 25,0% quando a ULL estava presente comparado aos animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) que tiveram valores iguais a 21,3% (P<0,001). Já os animais que receberam tratamentos que continham a PML, não apresentaram diferença quanto à proporção média de N no leite, independente da presença da ULL (P=0,454). Para os animais que receberam tratamentos que não continham a ULL, as proporções médias de N no leite foram maiores nos animais que tinham a PML associada na dieta, 24,6%, comparados aos animais que receberam o tratamento CTL (sem PML e sem ULL) e apresentaram valores de 21,3% (P=0,0004). Não houve diferença nas proporções

médias de N no leite dos animais que receberam tratamentos que continham a ULL, independente da presença da PML na dieta dos animais (P=0,062).

Houve interação entre a PML e a ULL os valores médios diário do balanço de N (P=0,001). Os animais que receberam os tratamentos que não continham a PML tiveram diferença no balanço nitrogenado, sendo que valores iguais a 169,5 e 82,7 $g.dia^{-1}$ foram obtidos quando na ausência e presença da ULL, respectivamente (P=0,0004). Para os animais que receberam os tratamentos que continham a PML, não houve diferença nos valores médios do balanço nitrogenado independente da combinação com a ULL (P=0,268). Para os animais que receberam tratamentos que não continham a ULL, houve diferença quanto à ausência ou presença da PML sendo que os valores médios do balanço de N foram 169,5 e 105,4 $g.dia^{-1}$ para os animais que receberam os tratamentos CTL (sem PML e sem ULL) e PML respectivamente (P=0,005). Da mesma forma, houve diferença no balanço de N para os animais que receberam os tratamentos que continham a ULL, sendo que os valores médios foram 82,7 e 128,1 $g.dia^{-1}$ para os tratamentos ULL e PML+ULL, respectivamente (P =0,035). Comportamento semelhante foi encontrado para os valores de balanço relativo de N (% N total) em que também houve interação entre a PML e a ULL para os valores relativos médios diários do balanço de N (P=0,005). Os animais que receberam os tratamentos que não continham a PML tiveram diferença no balanço nitrogenado, sendo que valores iguais a 29,5 e 16,9% foram obtidos quando na ausência e presença da ULL, respectivamente (P=0,002). Para os animais que receberam os tratamentos que continham a PML, não houve diferença nos valores relativos médios do balanço nitrogenado independente da combinação com a ULL (P=0,402). Para os animais que receberam tratamentos que não continham a ULL, houve diferença quanto à ausência ou presença da PML sendo que os valores médios do balanço de N foram 29,5 e 21,1% para os animais que receberam os tratamentos CTL (sem PML e sem ULL) e PML respectivamente (P=0,024). Da mesma forma, houve diferença no balanço de N para os animais que receberam os tratamentos que continham a ULL, sendo que os valores relativos médios do balanço nitrogenado foram 16,9 e 24,1% para os tratamentos ULL e PML+ULL respectivamente (P=0,05).

Com relação ao volume urinário diário dos animais, não houve interação entre a PML e a ULL (P=0,399), bem como diferença entre os tratamentos, sendo que os valores médios encontrados foram 27,1 e 27,2 L para os tratamentos sem e com a presença da PML respectivamente (P=0,989) e 30,0 e 24,3 L para os tratamentos sem e com a presença da ULL, respectivamente (P=0,107), conforme Figura 11.

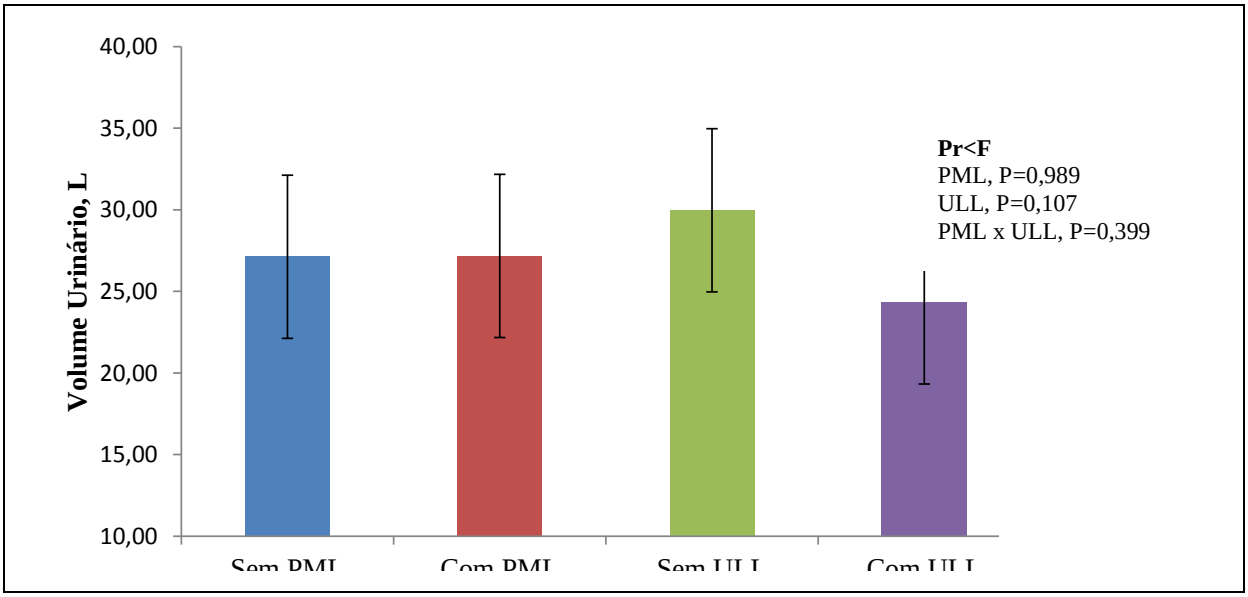


Figura 10 – Efeito da proteína microbiana derivada de levedura (PML) e da ureia de liberação lenta (ULL) sobre o volume médio urinário das vacas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Consumo de MS

Segundo o NRC (2001), o CMS determina a quantidade de nutrientes a serem utilizados pelos ruminantes para suprir sua exigência nutricional de mantença e produção, e com valores equivalentes a 3,0 e 3,5% de seu peso vivo em matéria seca. No presente estudo encontramos valores médios que variaram entre 3,4 e 3,9% PV dos animais. Este consumo, um pouco mais elevado, pode ser devido ao fato deste trabalho ter sido realizado com fêmeas primíparas, que além das exigências de mantença e produção, ainda possuem as exigências de crescimento. Além disso, esta oscilação de consumo pode ser influenciada por diversos fatores como estádio da lactação, nível de PB da dieta e digestibilidade dos alimentos, que pode levar a alterações no desempenho produtivo dos animais.

No presente estudo, os menores consumos de MS foram encontrados nos tratamentos que utilizaram apenas a ULL ou apenas a PML. Porém, quando essa ureia encapsulada estava associada à PML (PML+ULL), o consumo de MS foi maior e não diferiu do tratamento que utilizava o farelo de soja como principal fonte proteica na dieta (CTL).

Resultados semelhantes foram relatados nos trabalhos de Wilson et al. (1975) e Oba e Allen (2003) que encontraram redução no consumo de MS com a inclusão de uréia.

Entretanto, Kertz (2010) não encontrou impactos negativos no CMS até a inclusão de 1% de NNP.

A inclusão de uma fonte de NNP, normalmente, diminui a ingestão de MS que pode ser, entre outros fatores, devido à baixa palatabilidade, fatores sensoriais ou por mecanismos sistêmicos. Inúmeros mecanismos têm sido propostos para explicar a redução do consumo devido à utilização do NNP.

Porém, pelo fato do teor de NNP utilizado neste estudo ter sido de apenas 0,75% da matéria seca e ainda de degradação ruminal lenta devido a sua proteção, a redução no consumo devido a fatores sensoriais parece pouco provável de ter ocorrido.

De forma semelhante Akay et al. (2004) relataram uma diminuição de 0,90 $kg.dia^{-1}$ no CMS quando um produto similar a ULL foi utilizado em substituição ao farelo de soja, ureia e caroço de algodão na dieta de controle de vacas em lactação, sem afetar a produção de leite.

O impacto negativo no CMS com a substituição do farelo de soja pela PML observado neste estudo foi inesperado, sendo que o mecanismo pelo qual a suplementação com PML diminuiu o CMS é difícil de explicar.

Concordando com os resultados obtidos por Neal (2014) que trabalhou com substituição da fonte proteica na dieta de vacas da raça Holandês em lactação e também encontrou, de forma inexplicada, que o CMS diminuiu quando o farelo de soja foi substituído pela PML.

Sabbia et al. (2012) trabalharam com vacas da raça Holandês em lactação suplementadas com teores crescentes de PML, substituindo o farelo de soja em dietas ricas em volumoso, e encontraram efeito cúbico sobre CMS nas vacas alimentadas com 0, 1,14, 2,28, e 3,41% de PML com base na MS. Diferente dos resultados observados neste estudo, Sabbia et al. (2012) observaram um aumento na CMS em vacas alimentadas com 1,14% DM (300 g/d) de PML comparado com o controle.

Allen (2000) relatou que o CMS continuou a aumentar até a capacidade máxima de expansão gástrica, e em seguida diminui com um excesso de combustíveis metabólicos. As vacas que receberam suplementos proteicos neste estudo (PML, ULL ou ambos) podem ter recebido todos os nutrientes necessários já com baixos consumos dietéticos, diminuindo o CMS. Outra possibilidade é que as mudanças no metabolismo energético, devido à adição de PML, ULL ou ambos podem ter contribuído para regular o consumo dessas vacas de forma a reduzi-lo. Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para determinar o mecanismo de regulação do CMS, quando as dietas de vacas em lactação são complementadas com PML, ULL ou ambos.

6.2 Produção de leite e eficiência

Eficiência na produção de leite é a habilidade que a vaca tem em transformar os alimentos ingeridos em leite, assim este índice é responsável pela resposta fisiológica da vaca submetida a uma dieta e a um manejo.

A produção individual de leite diária das vacas submetidas a todos os tratamentos durante o período experimental foi em média, 24,0 kg. Quando corrigida para 4% de gordura (LCG) e para energia (LCE) a produção foi em média igual a 23,4 e 23,2 $kg.dia^{-1}$, respectivamente. Os animais que receberam os tratamentos que continham a ULL, independente da presença da PML, não tiveram diferença nas produções de leite. Os animais que receberam os tratamentos que utilizavam a ULL tiveram menores consumos, sendo 1,8 kg de MS a menos, quando a ULL não estava associada à PML, sem afetar a produção de leite. Assim, esses animais que receberam o tratamento que continham apenas a ULL foram mais eficientes comparados aos animais submetidos ao tratamento PML+ULL. Vale destacar que no tratamento que associava a proteína microbiana derivada de leveduras com a ureia de liberação lenta, PML+ULL, as vacas tiveram produções de leite similares ao tratamento que utilizava o farelo de soja como principal fonte proteica na dieta, CTL, sem diferença no CMS, justificando a substituição da fonte proteica.

A substituição do farelo de soja pela PML ou pela ULL diminuiu a produção de leite. Diferente dos resultados encontrados por Inostroza et al. (2010) que trabalharam com vacas em lactação e observaram que a adição de ureia protegida na dieta aumentou a produção de leite.

Entretanto, Holter, Colovos, Dawis (1968), Souza et al. (2010) e Santos et al. (2011) não encontraram diferença na produção de leite com a inclusão de ureia (protegida ou não) na dieta.

Santos et al. (2011) encontraram que o uso de NNP reduziu o consumo diário de matéria seca em 0,8 kg, sem influenciar a produção de leite. Assim, a substituição de farelo de soja por NNP e polpa cítrica melhorou a eficiência alimentar, sem afetar o balanço de nitrogênio.

Os valores médios obtidos para a produção de leite das vacas em estudo são devidos às condições fisiológicas das vacas, sendo que, estes animais, por serem primíparas, ainda não atingiram a maturidade fisiológica completa, possuindo altas necessidades nutricionais, pois além das exigências para mantença e produção de leite ainda necessitavam de nutrientes para atender seu crescimento (RESTLE; PACHECO; MOLETTA, 2003).

A eficiência da produção de leite, que foi em média 1,26, não foi afetada pela presença ou não da PML (P=0,86) e/ou da ULL (P=0,07) nos tratamentos. Comportamento semelhante foi encontrado para eficiência da produção de leite corrigida para 4% de gordura que foi, em média, igual a 1,03. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Vagnoni e Broderick (1997), Dinn Shelford e Fisher (1998) e Oliveira, Valadares e Valadares Filho (2001) os quais não observaram efeito das dietas sobre a eficiência das vacas em lactação.

Já os valores de eficiência obtida para produção de leite corrigida para energia foram maiores nos tratamentos com a ULL do que nos tratamentos em que a ULL não estava presente, sendo, respectivamente, 1,05 e 1,02. Assim a presença da ULL, associado ou não a PML melhorou a eficiência na produção de leite das vacas. De acordo com a Alltech Inc. Nicholasvile, KY, EUA, para cada kg de farelo de soja retirado da dieta, utiliza-se por volta de 0,11kg de ULL, devendo-se considerar o nível de inclusão máximo de proteína bruta proveniente do nitrogênio não proteico. No espaço gerado pode optar-se por incluir fontes de volumosos, de energia ou o que for mais conveniente para cada caso. Assim, as vacas conseguem produzir mais leite para cada kg de alimento consumido. Além disso, a ULL é apresentada como uma alternativa econômica entre os concentrados de nutrição proteica gerando nutrientes às bactérias ruminais, assim como níveis adequados de PDR, que em conjunto com fontes de energia de alta qualidade oferecem maior eficiência na nutrição.

Shain et al. (1998), trabalharam com dietas ricas em alto concentrado, baseadas em milho e silagem de milho, observaram que estas eram capazes de fornecer PM além do necessário pelo ruminante e, além disso, eram deficientes em PDR, o que poderia reduzir o crescimento microbiano, causando redução na fermentação ruminal e consequentemente redução na eficiência da produção de leite. Assim, a eficiência da vaca em produzir leite depende, entre vários fatores, de uma nutrição ruminal adequada principalmente em PDR, que neste estudo foi utilizada a ULL para a nutrição dos microrganismos ruminais.

A eficiência da produção leiteira exerce grande impacto sobre a lucratividade do sistema de produção, visto que vacas mais eficientes promovem além do benefício direto sobre a lucratividade, um menor impacto sobre o meio ambiente, uma vez que vacas mais eficiente produzem menos poluentes.

6.3 Composição do leite

A composição do leite de acordo com a legislação vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) que determina valores mínimos de

seus componentes, é norma para o produto que apresente teor de gordura mínimo de 3%, proteína total mínimo de 2,9% e extrato seco desengordurado mínimo de 8,4%. Os valores médios encontrados no leite das vacas submetidas aos quatro tratamentos desse estudo foram 3,84, 3,19 e 8,68% para teor de gordura, proteína e extrato seco desengordurado respectivamente, isto é, valores adequados com o padrão preconizado na legislação brasileira. Esses valores são similares aos relatados por Santos e Fonseca (2007) que encontraram, para o leite proveniente de vacas da raça Holandês, valores de gordura, proteína e sólidos totais iguais a 3,54, 3,29 e 12,16%, respectivamente.

A gordura é a principal fonte de energia do leite, sendo o componente do leite que mais varia, pois seu teor é afetado pela alimentação, condições orgânicas, duração do período de lactação, número de ordenhas diárias, idade dos animais ao parto, rebanho, estação e ano de parição (GIANNONI, 1987).

Em relação ao teor de gordura do leite, não foram observadas diferença entre os tratamentos. Entretanto, a adição da ULL proporcionou menores teores de gordura no leite coerente com o pequeno aumento no teor dietético de amido de milho nesses tratamentos (ULL e PML+ULL). Resultados semelhantes foram relatados por Silveira (2013) que trabalhou com a substituição parcial do farelo de soja por ULL e encontrou diferença de 0,07 pontos percentuais no teor de gordura do leite devido à adição da ULL.

Wattiaux (1999) encontrou para o leite proveniente de vacas teores igual a 3,2% de proteína, 3,4% de gordura, e 4,7% de lactose. Ruegg (2001) encontrou teores iguais a 3,4, 3,8 e 4,5% para proteína, gordura e lactose, respectivamente. No presente estudo, os teores de gordura, proteína e lactose foram próximos aos valores encontrados pelos autores acima citados.

O principal carboidrato do leite é a lactose, a qual é formada a partir da glicose e da galactose. A concentração de lactose no leite é relativamente constante e ao contrário da concentração de gordura e proteína, a concentração de lactose é similar em todas as raças leiteiras e não pode ser alterado facilmente por práticas na dieta alimentar (WATTIAUX, 1999). Constatação similar foi feita por Ribeiro (1989) e Senna (1996), que verificaram uma variação de apenas 0,1% no teor de lactose em vacas submetidas a diferentes tratamentos alimentares, indicando que o teor de lactose é relativamente insensível às mudanças na dieta das vacas.

No presente estudo, o teor médio de lactose encontrado foi 4,6%, muito próximo ao valor encontrado por Santos e Fonseca (2007) cujo teor de lactose foi igual a 4,68% e superior

ao teor encontrado por Ruegg (2001) e não houve diferença no teor de lactose entre os tratamentos estudados.

De acordo com Oliveira et al. (2010) o teor de gordura, o extrato seco desengordurado e a lactose foram as características estudadas que mais variaram no decorrer do período de lactação e os valores encontrados para esses componentes do leite em vacas com 30 dias de lactação foram 4,45, 7,58 e 4,42%, respectivamente, sendo apenas o teor de gordura com valores acima do que foi encontrado neste estudo.

No presente estudo, os maiores teores de proteína, incluindo a caseína, sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD) presentes no leite foram encontrados nos tratamentos que não tinham a presença da ULL, exceção para o teor de ESD que devido ao fato de ter havido interação entre a PML e a ULL, nos tratamentos em que a PML estava presente, não houve diferença no teor de ESD no leite independente da presença da ULL.

Concordando com Mattos e Pedroso (2005), os maiores valores de proteína incluindo a caseína foram obtidos nos tratamentos em que a proteína microbiana foi maximizada com a suplementação de fontes proteicas ricas em proteína não degradável no rúmen como a proteína microbiana derivada de levedura, PML ou por fontes com bom perfil de aminoácidos, como o farelo de soja, CTL, obtendo ganhos no aporte de proteína metabolizável para o animal e maximizando a síntese de proteína microbiana, fundamental para se produzir leite com elevado teor de proteína.

Neste estudo foi encontrada diferença no teor de ST, uma vez que este componente reflete a composição de todos os componentes do leite, exceto a água. Desta forma, apesar de não ter ocorrido diferença nos teores de gordura, mas considerando-se que os teores de proteína (incluindo sua fração caseína e seu respectivo percentual) sofreram variações significativas relacionadas aos tratamentos avaliados, essa diferença no teor de ST provavelmente são devido à diferença encontrada no teor de proteína. Os menores valores foram obtidos nos tratamentos com a ULL (12,40%) comparados aos tratamentos sem a ULL (12,63%). Concordando com Souza et al. (2010) que avaliaram o efeito da substituição parcial do farelo de soja por ureia protegida sobre a composição do leite e encontraram que a suplementação de ureia protegida diminuiu as porcentagens de gordura e de sólidos totais no leite. Vale ressaltar, que o menor teor de ST encontrado no leite dos animais submetidos aos tratamentos que continham ULL, foi maior que o valor descrito por Santos e Fonseca (2007).

O ESD compreende todos os elementos do leite, menos a água e a gordura. Neste estudo, para esta variável, houve interação entre a PML e a ULL e foi encontrado um valor médio de ESD de 8,68%, valor superior ao encontrado por Oliveira et al. (2010). Houve

diferença no teor de ESD dos animais submetidos aos tratamentos sem PML (CTL vs ULL) e com ULL (ULL vs PML+ULL). Os animais submetidos ao tratamento CTL apresentaram teores de ESD no leite maiores do que os animais que receberam o tratamento ULL. Já os animais que receberam o tratamento que associava a PML+ULL tiveram maiores teores de ESD no leite do que os animais que receberam o tratamento ULL, não havendo diferença entre os teores de ESD no leite dos animais que receberam os demais tratamentos. Essa variação do ESD provavelmente também se confirma ser devido às diferença ocorrida para o teor de proteína, incluindo a caseína, visto que está variável não inclui o teor de gordura.

Highstreet et al. (2010) relataram que a ULL pode ser uma fonte alternativa e segura de NNP para ruminantes e que o uso da ULL em substituição à ureia pecuária em vacas no início da lactação, aumentou as produções de proteína verdadeira e de gordura no leite, assim como a energia, mas não influenciou a composição do leite de vacas no meio da lactação.

A produção diária de gordura, proteína, lactose, ST e ESD no leite das vacas diminuíram com a substituição do farelo de soja pela PML e pela ULL. Entretanto vale ressaltar que as vacas que receberam o tratamento que associava PML+ULL não tiveram diferenças na produção diária dos componentes do leite. Diferente dos resultados relatados por Inostroza et al. (2009) que trabalharam com 16 rebanhos diferentes compostos aproximadamente por 150 vacas cada, utilizaram 140g diárias de ULL por animal substituindo parcialmente o farelo de soja não encontraram diferenças para produção de gordura e proteína ($p>0,10$).

Os valores médios de NUL encontrados no leite dos animais submetidos aos tratamentos que continham ou não a PML e para os tratamentos que continham ou não a ULL foram 16,9 $mg.dL^{-1}$ leite para ambos, visto que não houve interação entre a PML e a ULL. Os valores de NUL variaram de 16,69 a 17,19 $mg.dL^{-1}$ leite. Esses valores de NUL estão acima dos considerados referência por Moore e Varga (1996), Jonker et al. (1998) e Jonker e Khon (1998), porém ainda estão de acordo com os valores considerados por Hutjens e Barmore (1995).

Doska (2010) trabalhou com 118.796 controles leiteiros mensais de 14.125 vacas leiteiras inscritas no Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandês, oriundas de 86 rebanhos distribuídos em 11 regiões paranaenses e encontrou valores médios de NUL iguais a $14,5 \pm 4,5$ $mg.dL^{-1}$.

Os valores de NUL encontrados neste estudo são próximos aos valores apresentados por Doska (2010) que encontrou uma média de NUL superior ($P<0,01$) em vacas primíparas (16,2 mg dL^{-1}) comparadas às médias de vacas com 2 (16 $mg.dL^{-1}$) e 3 ou mais partos (15,5

mg.dL^{-1}), e obteve um efeito linear da covariável idade da vaca ao parto, evidenciando que vacas mais jovens apresentaram médias de NUL superiores (P<0,01) às vacas mais velhas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Jonker e Kohn (1998), porém discordam com os apresentados por Oltner, Emanuelson e Wiktorsson (1985), Arunvipas et al. (2003) e Johnson e Young (2003), os quais observaram valores de NUL mais baixo em vacas de primeira lactação. Isto pode ser explicado simplesmente pela menor produção de leite das vacas primíparas e também ao fato dos animais nessa categoria apresentarem um metabolismo mais acelerado e com isso, terem uma maior capacidade de utilização dos aminoácidos e menor transformação em ureia. Os valores mais elevados de NUL podem ser indicativos de excesso de amônia absorvida pelo rúmen em relação à menor produção de leite das vacas primíparas em relação às vacas mais velhas, ou seja, uma menor diluição do nitrogênio ureico do leite.

Os animais submetidos a tratamentos com fontes de NNP, isto é com a presença da ULL, apresentaram os menores teores de proteína no leite comparados com os animais que receberam os tratamentos sem a ULL. Segundo Jonker, Kohn e Erdman (1999), dietas com baixos níveis de energia e excesso nas quantidades necessárias de PDR em relação às exigências da vaca podem resultar em decréscimo na produção de leite e, consequentemente, da secreção de proteína do mesmo.

Johnson e Young (2003) verificaram que quanto maior a porcentagem de proteína no leite menor é o valor de NUL. Esta tendência também foi verificada com a porcentagem de gordura no leite, porém de forma menos acentuada. Comportamento semelhante foi observado no presente estudo, visto que entre os tratamentos em que a ULL não estava presente, valores mais elevados na porcentagem de proteína, porcentagem de caseína e sólidos totais foram encontrados. Apesar de não ter sido encontrada diferença no teor de NUL, houve uma tendência em apresentar valores menores quando a ULL não estava presente.

De acordo com Santos e Fonseca (2007), mudanças na composição do leite podem alterar significativamente seu valor como matéria-prima para fabricação de derivados. Os mesmos autores relatam ainda que uma diminuição de 0,1% de proteínas ou 1% de sólidos totais pode acarretar perdas de 1 tonelada de queijo ou até 5 toneladas de leite em pó, respectivamente, para cada um milhão de litros de leite processado.

Devido à conscientização dos consumidores em relação aos valores nutricionais e calóricos dos alimentos e a preocupação com a saúde, a proteína é atualmente o componente do leite mais valorizado na maioria dos países em detrimento ao teor de gordura (SANTOS; FONSECA, 2007).

6.4 Parâmetros sanguíneos

Não houve interação entre a PML e a ULL para os valores de pH sanguíneo. O valor médio do pH sanguíneo encontrado para todos os animais independente do tratamento foi igual a 7,46. Alguns autores relataram que os valores de pH do sangue venoso dos bovinos deve variar de 7,35 a 7,53, sendo que os valores inferiores a esta variação podem ser indícios de acidose e, para valores superiores, alcalose (CARLSON, 1997; RADOSTITS et al., 2007, KANEKO et al., 2008). Porém, vale ressaltar que a ocorrência de acidose ou alcalose não depende apenas de alterações nos valores do pH. Os valores de pH fora da faixa de referência para espécie podem indicar problemas, entretanto, valores de pH aparentemente "normais" não descartam a possibilidade de alterações no equilíbrio ácido-base (CARLSON,1997).

A regulação do pH está entrelaçada com um rigoroso e preciso controle da concentração de íons H^+ intra e extracelulares. Este processo é realizado, basicamente, por três vias metabólicas que estão interligadas. São elas: tampões intracelulares e extracelulares, eliminação de CO_2 via pulmonar e regulação renal de íons H^+ e HCO_3^- (DRAGE; WILKINSON, 2001; ROSE; POST, 2001).

De acordo com González (2000), o Na^+ e o Cl^- participam de inúmeras funções metabólicas (sozinhos ou não) importantes para manutenção das funções vitais dos organismos, tais como: a regulação da pressão osmótica, regulação do equilíbrio ácido-básico, condução nervosa, transporte ativo de nutrientes, contração muscular, controle do equilíbrio hídrico, formação de HCl no suco gástrico, entre outros.

Para os valores de Na^+ e Cl^- sanguíneos, não houve diferença nos teores dos mesmos entre os tratamentos sem e com a presença da PML e entre os tratamentos sem e com a presença da ULL, visto que não houve interação entre as fontes proteicas utilizadas em substituição ao farelo de soja. De acordo com Swenson e Reece (2006), teores de sódio e cloreto em ruminantes são esperados encontrar valores entre 132-152 e 97-111 $mEq.L^{-1}$, respectivamente. Nos tratamentos, sem a PML, com a PML, sem a ULL e com a ULL, os teores observados estão dentro dessa variação.

González (2000) relatou também a importância vital do K^+ participando de funções metabólicas como a regulação da pressão osmótica, transmissão de impulsos nervosos, regulação do equilíbrio ácido-básico, contração muscular, controle do equilíbrio hídrico, entre outras, sendo também essencial para o crescimento de certas espécies de microrganismos que compõem a microflora ruminal.

Para os valores de K^+ sanguíneo, Carlson (1997), Swenson e Reece (2006), Radostits et al. (2007) e Kaneko et al. (2008), relataram que em ruminantes é esperado encontrar valores variando entre 3,9 e 5,8 $mEq.L^{-1}$.

As exigências dietéticas de K^+ normalmente são atendidas, pois sua concentração é elevada nos alimentos, sendo necessária excreção deste íon para evitar a toxicidade. Nos bovinos a maior parte do K^+ é excretada pela urina, mas o suor, as secreções do trato gastrintestinal e as fezes também contribuem para a eliminação deste íon (CARLSON, 1997).

Os valores de K^+ encontrados entre os tratamentos avaliados neste estudo estão um pouco abaixo da faixa de valores relatados na literatura (CARLSON, 1997; SWENSON; REECE, 2006; RADOSTITS et al., 2007; KANEKO et al., 2008). Entretanto, Ferreira et al. (2009) considerou valores de referência para o teor de K^+ sanguíneo variando de 3,5 a 5 $mEq.L^{-1}$, o que torna aceito os valores médios obtidos neste estudo para o teor de K^+.

Assim, como todas as dietas foram balanceadas de acordo com as necessidades da categoria animal, acredita-se que essa pequena redução nos valores de K^+, esteja relacionada ao manejo. Na semana de coleta, as vacas foram constantemente manipuladas e ainda que com toda cautela, inevitavelmente gerava-se momentos de estresse para os animais. Aliada a temperaturas elevadas, aumento do consumo de água e consequentemente aumento da micção e sudorese, acredita-se que isso possa ter influenciado nessa redução no teor de K^+ sanguíneo, visto que nenhuma sintomatologia clínica foi verificada no decorrer de todo o experimento.

Outro fator que pode levar a obtenção de menores valores de K^+, de acordo com Trajano (2013), seria devido ao fato de serem primíparas. Trajano (2013) avaliou 154 amostras de sangue provenientes de vacas prímiparas e multíparas da raça Holandês, com produções médias diárias de 24 kg leite e verificou diferença no teor de K^+ entre os diferentes grupos de animais obtendo valores menores e para as prímiparas no início da lactação.

O menor teor de K^+ foi verificado nas vacas submetidas ao tratamento em que o farelo de soja foi substituído apenas pela PML.

O K^+ está relacionado com diversas funções bioquímicas, transmissões dos impulsos nervosos, contrações musculares e também influência no metabolismo de carboidratos.

O K^+, Na^+ e o Cl^-, são elementos essenciais nos processos metabólicos do organismo animal, pois participam da criação de um meio ótimo para suporte dos microrganismos, visto que, o compartimento estomacal dos ruminantes é um sistema biológico fechado, mantendo seu meio interno constante, devido à ação tampão, pressão osmótica, concentração relativa de íons (PEDREIRA; BERCHIELLI, 2006). Assim, as mudanças nas concentrações séricas dos íons, principalmente de Na^+, Cl^- e K^+ devem ser interpretadas juntamente com as alterações na

concentração total de dióxido de carbono (TCO_2) e pH, pois a dinâmica dos íons nos líquidos intra e extra celulares são modificados nos caso de acidose ou alcalose metabólica.

Não houve interação entre a PML e a ULL e não houve diferença nos valores da TCO_2 entre os tratamentos sem e com a PML e entre os tratamentos sem e com a ULL, sendo que os valores médios variaram de 30,08 a 31,69 $mEq.L^{-1}$, estando dentro dos valores de referência para espécie (CARLSON, 1997).

A pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) corresponde à pressão de plasma livre de CO_2. É o componente respiratório do equilíbrio ácido- base sendo expressa mmHg .

Neste estudo não houve interação entre a PML e a ULL e não houve diferença nos valores da PCO_2 entre os tratamentos sem a PML e com a PML e entre os tratamentos sem a ULL e com a ULL, sendo que os valores variaram de 41,78 a 42,84 mmHg, estando dentro dos valores de referência para espécie (CARLSON, 1997).

Baker, Ferguson e Chalupa (1995) apresentaram que existe uma elevada correlação entre as concentrações de NUL e de NUS variando de 0,88 a 0,96, desta forma, se o nitrogênio ureico no sangue estiver elevado o nitrogênio no leite também estará. Apesar de não ter sido encontrado interação entre a PML e a ULL e nem diferença nos valores do NUL e do NUS entre os tratamentos sem a PML e com a PML e entre os tratamentos sem a ULL e com a ULL, vale ressaltar que houve um comportamento semelhante do NUL e do NUS entre os tratamentos.

Swenson e Reece (2006) consideram como referência uma faixa de variação para os valores de NUS de 10 a 30 $mg.dL^{-1}$, sendo que neste estudo todos os valores de NUS encontrados estão dentro desta variação.

A glicose é o mais importante combustível para a oxidação respiratória sendo vital para o metabolismo do cérebro e na lactação. O nível de glicose sanguíneo pode ser um indicativo de falhas na homeostasia, que ocorre em doenças tais como as cetoses. Porém, devido aos eficientes mecanismos homeostáticos do organismo, o teor de glicose sanguínea sofre pouca variação, visto que na digestão dos ruminantes, pouca glicose proveniente do trato alimentar entra na corrente sanguínea (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002).

Apesar de a glicose ser o metabólito de eleição para avaliar o status energético dos ruminantes, trabalhos tem demonstrado certa contrariedade nos resultados, uma vez que mecanismos homeostáticos que controlam a glicemia tornam difícil estabelecer uma clara relação entre estado nutricional e níveis de glicose, pois além de grande parte dos tecidos utilizarem ácidos graxos livres e corpos cetônicos como fonte energética, o fígado destes animais possui alta função neoglicogênica (PEIXOTO; OSORIO, 2007).

Assim, os teores de glicose sanguínea considerados como referência em ruminantes variam muito entre os pesquisadores. Carlson (1997) considera como referência uma faixa de 45 a 75 $mg.dL^{-1}$, incluindo os valores encontrados neste estudo.

O bicarbonato (HCO_3^-) é o tamponante do plasma sanguíneo mais abundante e responsável pelo equilíbrio ácido-base sendo que também está presente na saliva de ruminantes e é frequentemente adicionado em dietas ricas em concentrado, para evitar possíveis problemas metabólicos. Os valores de HCO_3^- presente no sangue de animais utilizados neste estudo estavam dentro da faixa de referência para a espécie (CARLSON, 1997).

O excesso de base de sangue, também conhecido como base extra (BE) indica a quantidade de tampões presentes no sangue, isto é a quantidade de ácido, em $mEq.L^{-1}$, necessário para restabelecer o pH de um litro de sangue, a 37 °C e PCO_2 de 40 mmHg ao valor de 7,4 (BOOKALLIL, 2009). Os valores encontrados neste estudo estão acima dos valores descritos por Carlson (1997), o que poderia representar uma possível alcalose. No entanto, a alcalose observada em vista os valores obtidos não podem ser avaliadas separadamente de outros parâmetros do sangue e como todos os demais parâmetros sanguíneos foram considerados dentro dos valores de referência para a espécie estudada, em particular o pH do sangue e do bicarbonato, aliada a falta de sintomatologia clínica, é improvável que os animais tenham tido um quadro de alcalose metabólica.

A janela aniônica ou ânion gap é a diferença entre os cátions e os ânions medidos no sangue. Esta diferença é virtual, pois o princípio básico da homeostase é a manutenção da neutralidade elétrica. Como não são mensurados todos os eletrólitos presentes no sangue, para simplificação da definição, adota-se como valor de janela aniônica a seguinte equação (CONSTABLE, 1999): Ânion gap = $[Na^+ + K^+] - [Cl^- + HCO3^-]$.

Nos bovinos, os valores de referência do ânion gap variam de 12-18 $mmol.L^{-1}$. O aumento destes valores sugere uma acidose metabólica ou insuficiência renal (retenção de ácidos). A avaliação deste parâmetro é outra ferramenta utilizada para a determinação do prognóstico clínico do animal (DIBARTOLA, 2000). Os resultados médios encontrados neste estudo para a variável ânion gap concordam com os resultados apresentados no estudo de Dibartola (2000).

Existem fatores que afetam o hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e contagem de eritrócitos, como anemias e alterações na hidratação, que podem refletir diretamente na proporção células vermelhas/plasma do sangue.

A hemoglobina corresponde, em média, a 1/3 do hematócrito e neste estudo essa relação foi obedecida.

Não houve interação entre PML e ULL para os teores de Ht e Hb, mas houve diferença entre os tratamentos que continham ou não a PML e entre os tratamentos que continham ou não a ULL, isto é, animais que receberam tratamentos com a PML apresentaram teores mais elevados de Ht e Hb do que os animais que receberam os tratamentos sem a PML e os animais que receberam tratamentos com a ULL apresentaram teores mais elevados de Ht e Hb do que os animais que receberam os tratamentos sem a ULL.

Concordando com Gonçalves (2013) que trabalhou com substituição do farelo de soja por diferentes fontes de N para vacas lactantes confinadas e encontrou diferença nos valores de Ht e Hb com a inclusão da ULL na dieta em substituição ao farelo de soja, sendo os menores valores de Ht e Hb para o tratamento controle.

Segundo Swenson e Reece (2006), quanto maior o número de hemácias, maior a capacidade de oxigenação dos tecidos, já que durante a passagem dos eritrócitos pelos capilares pulmonares a hemoglobina combina-se com o oxigênio, formando a oxihemoglobina. Pode-se assumir, então, que os animais não apresentaram o quadro de anemia, pois não foi observada a redução do hematócrito, do número de eritrócitos ou da concentração de hemoglobina dos animais em nenhum dos tratamentos experimentais, quando comparados aos valores sugeridos como referência pela literatura (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000).

Os rins produzem um hormônio, a eritropoetina, que estimula a produção e o amadurecimento das células vermelhas do sangue (hemácias), e a incorporação do ferro dentro das mesmas. Uma das hipóteses pode estar relacionada ao fato de a ULL ter alguma participação na produção dessas hemácias, pelo maior necessidade de oxigênio pelos tecidos (THRALL, 2007).

6.5 Balanço nitrogenado

Devido às reduções observadas no CMS com adição dos suplementos protéicos substituindo o farelo de soja, o consumo de N diminuiu nas dietas que continham ULL, PML ou ambos, comparado ao tratamento que utilizou apenas o farelo de soja (CTL).

A diferença no balanço de N ($g.dia^{-1}$) entre os tratamentos foi devida as diferenças obtidas com a ingestão diária e a excreção fecal diária de N pelos animais, visto que não foram encontradas diferenças na excreção diária de N urinário bem como para secreção diária de N no leite.

O consumo de nitrogênio nas dietas experimentais foi próximo ao valor encontrado por Vasconcelos et al. (2010), quando utilizaram soja e ureia na dieta de vacas leiteiras, sendo um valor de 533,48 g/dia.

De acordo com os valores encontrados as perdas de N urinário foram menores do que as perdas fecais de N em todos os tratamentos analisados. Não foi encontrado diferença nos valores de N excretado na urina independente da fonte proteica utilizada. Isto é benéfico, pois a ureia presente na urina bovina em contato com o solo promove reações químicas que levam à liberação de óxido nitroso (N_2O) que ao ganhar a atmosfera, esse gás bloqueia a saída de raios solares do ambiente terrestre, acentuando o efeito estufa.

Embora não tenham sido detectadas diferenças na excreção de N urinário e no volume da urina produzida pelas vacas submetidas aos tratamentos avaliados, vale ressaltar a necessidade de mais estudos visto que, os animais submetidos ao tratamento que associava a PML+ULL, excretaram menos N através da urina e produziram 5,6 L de urina a menos do que os animais submetidos ao tratamento sem PML e sem ULL (CTL), podendo ser uma justificativa aceitável para a substituição do farelo de soja pela combinação dessas duas fontes de nitrogênio, uma vez que diminui a contaminação ambiental.

De acordo com Kebreab et al. (2001) a eficiência do uso de N pelas vacas pode ser mensurada através da relação entre o teor de N presente no leite e a quantidade de N consumido pela vaca. Castillo et al. (2000) revisando sobre a eficiência da utilização de N, relatou que o consumo de N em quantidades superiores a 400 g/dia proporciona um aumento na quantidade de N excretada nas fezes e urina, sugerindo a adequação de um valor de 15% de PB com base na MS a fim de reduzir as perdas de N para o meio ambiente, sem afetar a produtividade animal. No presente estudo as médias obtidas para consumo de N variaram de

474,8 a 574,7 g.dia^{-1}, sendo superiores aos valores recomendados por Castillo et al. (2000), inclusive no teor de PB com base na MS. Entretanto, estão próximos ao relatado por Olmos Colmenero e Broderick (2006) que sugeriram teores de 16,5% de PB com base na MS, na dieta de vacas com aproximadamente 100 dias em lactação, a fim de se obter máxima produção de leite e mínima excreção de N para o meio ambiente.

Neste estudo, foi relatado diferença na proporção média de N secretado no leite visto que a substituição do farelo de soja pela PML, ULL ou ambos proporcionou aumento nesses teores. Entretanto, estão abaixo dos valores citados pelo NRC (2001), que relata a eficiência de utilização do N em vacas leiterias como sendo reduzida, e variando entre 25 e 30%.

Silano (2014) encontrou valor médio igual a 20,3% para a secreção do N total no leite (N leite g/ % N total) e relatou que uma menor secreção se relaciona com uma menor excreção de NNP. É provável que isso ocorra devido ao perfil de aminoácidos presente principalmente no farelo de soja que pode promover um melhor aproveitamento pelos microrganismos ruminais e consequentemente reduzir a excreção de compostos nitrogenados.

Santos et al. (2011) verificaram que os ruminantes são ineficientes na utilização de N, visto que excretaram para o leite cerca de 26% do N ingerido e perdem através da urina cerca de 27%. Reforçando essa ineficiência, Tamminga (1992) relatou perdas acima de 70% do N ingerido, perdido nas fezes e urina. Isso é preocupante quando se leva em consideração os impactos ambientais que podem ser causados pela excreção de N.

Neal (2014) trabalhou com substituição proteica para vacas em lactação e encontrou maior eficiência da razão N-leite/N-ingerido no tratamento que utilizava a PML em comparação ao tratamento sem PML e sem ULL (CTL). Apesar da ingestão de N ter diminuído acredita-se que a principal razão para o aumento dessa eficiência, foi o fato de que PML ser capaz de escapar de fermentação ruminal e fornecer aminoácidos de alta qualidade, podendo afetar a eficiência N para a produção de leite. No entanto, resultados inconsistentes foram relatados em muitos estudos que investigam a suplementação de diferentes fontes PNDR. Por exemplo, o fornecimento de quantidades diferentes e fontes de PNDR têm sido atribuídos à depressão da síntese de Pmic ou a incapacidade de o PNDR para fornecer o aminoácido limitante.

Para a proporção média de N excretada nas fezes, não houve interação entre PML e ULL, mas houve diferença entre os tratamentos que continham ou não a ULL.

Uma maior excreção fecal foi encontrada entre os tratamentos com a presença da ULL, sendo de 35,2%, confirmando que a presença da ULL aumentou a excreção de N nas fezes, mesmo quando a ingestão de N, foi menor. De forma semelhante, Gonçalves (2013) utilizou 0,9% de ULL com base na MS e encontrou uma maior excreção de N fecal com o valor de 36,25%.

A soma do N excretado nas fezes e urina e secretado no leite em todos os tratamentos foi maior que o balanço retido. Logo, é observado quanto aos aspectos de menor excreção fecal, em tratamentos que obtiveram um maior balanço de N retido. No presente trabalho, em virtude da taxa de degradação dos compostos nitrogenados, a velocidade de utilização de N pelos microrganismos ruminais para seu crescimento pode ter causado um desequilíbrio entre o N e a energia no rúmen, uma diminuição da eficiência de utilização dos compostos nitrogenados e, consequentemente, uma maior síntese de ureia pelo fígado, com posterior excreção urinária. Associando-se essa variável à ingestão de N, observou-se um quadro de maior excreção de N, o que não é desejável nos sistemas de produção (PEREIRA et al., 2007).

Em nenhuma das dietas experimentais avaliadas foi encontrado um balanço negativo. O balanço de nitrogênio positivo para todas as dietas experimentais sugere que o consumo de proteína bruta supriu as exigências de mantença e produção de todos os animais submetidos às quatro dietas experimentais.

7 CONCLUSÕES

A inclusão da PML, ULL ou ambos como substitutos parciais do farelo de soja na dieta de vacas leiteiras afetou a produção de leite. A presença da ULL proporcionou uma melhora na eficiência da produção. A dieta com ambos os ingredientes, PML+ULL, tiveram resultados semelhantes na produção de leite comparado a dieta contendo apenas o farelo de soja, permitindo espaço na fórmula dietética para a inclusão dos subprodutos mais baratos, como casca de soja, polpa cítrica, farelo de trigo ou milho em grão, diminuindo custos e aumentando a oferta de energia para o animal.

A inclusão de PML, ULL ou ambos como substitutos parciais de farelo de soja na dieta de vacas leiteiras afetou a composição do leite. A PML proporcionou resultados semelhantes ao farelo de soja na composição do leite. Dietas sem ULL resultou em um aumento da proteína, caseína, sólidos totais e extrato seco desengordurado afetando a eficiência e qualidade dos produtos lácteos, resultado interessante para a indústria láctea e para produtores que recebem benefícios econômicos a partir de atributos de qualidade do leite.

A substituição do farelo de soja pela PML, ULL ou ambos, melhorou a eficiência de utilização de N.

8 REFERÊNCIAS

ADACHI, N. et al. Effect of supplemental fish meal on milk yield and milk composition of Holstein cows during early lactation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 13, n. 3, p. 329-333, 2000.

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

AKAY, V. et al. Optigen®1200: controlled release on non-protein nitrogen in the rumen. In: SYMPOSIUM NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 22., 2004, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech Symposium, 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,** New York, v. 83, n. 7, p. 1598-1624. 2000.

ALMEIDA, R. Nitrogênio ureico no leite como ferramenta para ajuste de dietas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM FORMULAÇÃO DE DIETAS PARA GADO DE LEITE, 2., 2012, Lavras. **Anais…** Lavras, MG, 2012. p. 35-65.

AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION. **Merriam-webster's medical dictionary**. Chicago: Merriam-Webster Inc., 2007.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição dos ruminates.** Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 111-140.

ARUNVIPAS, P. et al. The effect of non-nutritional factors on milk urea nitrogen levels in dairy cows in Prince Edward Island, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 59, p. 83-93, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**.15 ed. Washington D.C.: AOAC, 1990. 1141 p.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 88, Suppl. 1, p. E9-21. 2005.

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,** New York, v. 78, p. 2424-2434, 1995.

BEQUETTE, B. J.; BACKWELL, F. R. C.; CROMPTON, L. A. Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 81, n. 9, p. 2540-2559, 1998.

BOOKALLIL, M. J. **pH of the blood: acid base balance**. 2009. Disponível em: <http://www.anaes.med.usyd.edu.au/ lectures/acidbase_mjb/acidbase.html.> Acesso em: 05 jan. 2015.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002, Anexo IV. Disponível em:<http://www.leite.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/anexo_IV.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2013.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Projeções do Agronegócio. Brasil 2012/2013 a 2022/2023. Projeções de Longo Prazo. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2014.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011. Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, Distrito Federal, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

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**, New York, v. 90, n. 4, p. 1816-1827, 2007.

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

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical of animal and nutrition factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 80, p. 2964-2971, 1997.

CALIXTO JUNIOR, M. et al. Constituintes sangüíneos de vacas da raça holandesa alimentadas com silagens de milho ou de capim-elefante. **Ciências Agrárias**, Londrina v. 31, n. 2, p. 429-438, 2010.

CAMPBELL, W. **The raw truth about milk**. Panama: Rhino Publishing S.A., 2007. 319 p.

CARARETO, R. **Uso de ureia de liberação lenta para vacas alimentadas com silagem de milho ou pastagens de capim Elefante manejadas com intervalos fixos ou variáveis entre desfolhas**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba 2007.

CARLSON, G. P. Fluid, electrolyte and acid-base balance. In: KANEKO, J. J. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals.** 5. ed. New York: Academic Press, 1997. p. 485-516.

CARPER, J. L.; CADY, R. A.; BAUMAN, D. E. The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. **Journal of Animal Science,** Champaign, v. 67, p. 2160-2167, 2009.

CASTILLO, A. R. et al. A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-32, 2000.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – ESALQ/USP (CEPEA). **CEPEA soja**. 2012. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/agromensal/2012/12_dezembro/Soja.htm>. Acesso em: 17 fev. 2013.

CHIZZOTTI, M. L. et al. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science,** Amsterdam, v. 113, p. 218–225, 2008.

CHURCH, D. C. **The ruminant animal**: digestive physiology and nutrition. Long Grove, IL.: Waveland Press Inc., 1988.

CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 75, n. 8, p. 2304-2323, 1992.

CONSTABLE, P. D. Clinical Assessment of acid-base status: strong ion difference theory. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, v. 15, n. 3, p. 447-472, 1999.

COOPER, J. M.; BIGGS, H. G. An evaluation of four methods of measuring urinary creatinine. **Clinical Chemistry**, Chicago, v. 7, p. 665-673, 1961.

CRESSMAN, S. G. et al. Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle in early lactation. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 63, n. 11, p. 1839-1847, 1980.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 454 p.

DANÉS, M. A. C. **Teor de proteína no concentrado de vacas em lactação mantidas em pastagens de capim elefante**. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

DIBARTOLA, S. P. **Fluid therapy in small animal practice**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2000. 720 p.

DIBARTOLA, S. P. Introduction to acid-base disorders. In: DIBARTOLA, S. P. **Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice.** 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. cap. 9, p. 231-252.

DINN, N. E.; SHELFORD, J.A.; FISHER, L. J. Use of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, New York, v. 81, p. 229-237, 1998.

DOSKA, M. A. **Nitrogênio ureico no leite e seu impacto na produção e reprodução de rebanhos leiteiros do Paraná**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

DRAGE, S.; WILKINSON, D. Acid-base balance. **Pharmacology**, Basel, v. 3, n. 12, p. 1-13, 2001.

EDWARDS, J. S.; BERTLEY, E. E.; DAYTON, A. D. Effects of dietary protein concentration on lactating cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 63, n. 2, p. 243-248, 1980.

EICHER, R.; BOUCHARD, E.; BIGRAS-POULIN, M. Factors affecting milk urea nitrogen and protein concentrations in Quebec dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 39, p. 53-63, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAO Statistical Yearbook 2013**. Disponível em:<http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em: 21 abr. 2014.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm´s veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins, 2000. 1174 p.

FERREIRA, F et al. Parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e hormonais de bovinos submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 769-776, 2009.

FRANK, B.; SWENSSON, C. Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk, and ammonia emissions. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 85, p. 1829-1838, 2002.

FRASER, C. M. **Manual merck de veterinária**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1991. 2169 p.

FREITAS, M. D. et al. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 12, p. 2608-2615, 2010.

GARDNER, R. W.; PARK, R. L. Protein requirements of cows fed high concentrate rations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 56, n. 3, p. 390-394, 1973.

GIANNONI, M. A. **Gado de leite:** genética e melhoramento. Jaboticabal: Nobel, 1987.

GOEL, N.; CALVERT, J. Understanding blood gases/acid–base balance. **Paediatrics and Child Health,** Oakville, v. 22, n. 4, p. 142–148, 2012.

GOLOMBESKI, G. L. et al. Slow-release urea and highly fermentable sugars in diet fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 89, n. 11, p. 4395-4403, 2006.

GOMES, O. M. **Interpretação clínicas das alterações acidobásicas e distúrbio da oxigenação**. Belo Horizonte: Edictor, 1997. 254 p.

GONÇALVES, G. S. **Fontes de compostos nitrogenados para vacas lactantes em confinamento**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga, 2013.

GONZÁLEZ, F. H. D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLES, F. H. D. et al. **Perfil metabólico em ruminantes:** seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 63-73.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado, 2002.

GOZHO, G. N.; HOBIN, M. R.; MUTSVANGWA, T. Interactions between barley grain processing and source of supplemental dietary fat on nitrogen metabolism and urea-nitrogen recycling in dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 91, n. 1, p. 247-259, 2008.

HERRERA-SALDANA, R. et al. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 73, n. 1, p. 142-148, 1990.

HIGHSTREET, A. et al. Response of Holstein cows to replacing urea with a slowly rumen released urea in a diet high in soluble crude protein. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, p. 179-185, 2010.

HOFFMAN, P. C. et al. Short communication: effect of dietary protein on growth and nitrogen balance of Holstein heifers. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 84, p. 843-847, 2001.

HOLTER, J. B.; COLOVOS, N. F.; DAWIS, H. A. Urea for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 51, p. 1243-1248, 1968.

HUBER, J. T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 39, p. 141-155, 1994.

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

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes.** New York: Academic Press, 1966.

HUNTINGTON, G. B.; ARCHIBEQUE, S. L. Pratical aspects of urea e ammonia metabolism in ruiminants. In: AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 1999, North Carolina. **Proceedings...** North Carolina: North Carolina State University, 1999.

HUTJENS, M. F.; BARMORE, J. Milk urea test gives us another tool. **Hoard's Dairyman**, Fort Atkinson, v. 140, n. 10, p. 401, 1995.

IMAIZUMI, H. et al. Fontes proteicas e de amido com diferentes degradabilidades ruminais para alimentar vacas leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1413-1420, 2006.

IMAIZUMI, H. **Suplementação proteica uso de subprodutos agroindustriais e processamento do milho em dietas de vacas leiteiras em confinamento.** 2005. 182 f. Tese

(Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

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

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 88, Suppl. 1, p. E22-37. 2005.

JOHNSON, R. G.; YOUNG, A. J. The association between milk urea nitrogen and DHI production variables in Western commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 86, p. 3008-3015, 2003.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 81, p. 2681-2692, 1998.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A. MUN: testing: useful but ambiguous. **Hoard's Dairyman,** Fort Atkinson, v. 143, n. 6, p.252, 1998.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to National Research Council recommendations. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 82, n. 6, p. 1261-1273, 1999.

KALSCHEUR, K. F. et al. Effects of dietary crude protein concentration and degradability on milk production responses of early, mid, and late lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York**,** v. 82, n. 3, p. 545-554, 1999.

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

KANEKO, J. J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animal**. 6. ed. San Diego, California: USA Elsevier, 2008. 918 p.

KEBREAB, E. et al. Nitrogen pollution by dairy cows and its mitigation by dietary manipulation. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 60, p. 275-285, 2001.

KERTZ, A. F. Urea feeding to dairy cattle: a historical perspective and review. **The Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 26, p. 257-272, 2010.

KOLVER, E. S. Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. **Proceedings of the Nutrition Society,** Palmerston North, v. 62, p. 291-300, 1998.

KUNG, L.; HUBER, J. T. Performance of high producing cows in early lactation fed protein of varying amounts, sources, and degradability. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 66, n. 2, p. 227-234, 1983.

LAPIERRE, H.; LOBLEY, G. E. Nitrogen recycling in the ruminant: a review. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 84, Suppl. 1, p. E223-E236, 2001.

MACHADO, P. F. **Reduzindo o teor de proteína bruta em dietas para vacas leiteiras.** Disponível em:<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/nutricao/reduzindo-o-teor-de-proteina-bruta-em-dietas-para-vacas-leiteiras-79305n.aspx>. Acesso em: 24 jun. 2012.

MATTOS, W. R. S.; PEDROSO, A. M. Influência da nutrição sobre a composição de sólidos totais no leite. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA LEITEIRA, 5., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2005. p.103-127.

MAYNARD, L. A. et al. **Animal nutrition**. 3. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1984. 736 p.

MAYSAMI, M. **Energy efficiency in dairy cattle farming and related feed production in Iran**. 2013. 148 f. Dissertation (Completion of the Academic Degree doctor rerum agriculturarum) - Faculty of Agriculture and Horticulture at Humboldt University of Berlin, Berlin, 2013.

MONNIG, A. A. Practical acid-base in veterinary patients. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,** Maryland Heights, v. 43, n. 6, p. 1273-1286, 2013.

MOORE, D. A.; VARGA, G. BUN and MUN: urea nitrogen testing in dairy cattle. **Compendium on continuing education for prating veterinarian**, Yardley, v. 18, p. 712-721, 1996.

MOURO, G. F.; BRANCO, A. F.; MACEDO, F. A. F. Substituição do milho pela farinha de mandioca de varredura em dietas de cabras em lactação: fermentação ruminal e concentração de ureia plasmática e no leite. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1840-1848, 2002.

MOUSSAVI, A. R. H. et al. Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on milk yield and metabolic responses in early lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 90, p. 136-144, 2007.

MÜLLER, K. R. et al. Importance of the effective strong ion difference of an intravenous solution in the treatment of diarrheic calves with naturally acquired acidemia and strong ion (metabolic) acidosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 26, n. 3, p. 674-683, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6. ed. Washington, DC.: National Academy Press, 1989. 157 p.

_____. **Nutrient requirements of dairy cattle**.7. ed. Washington D. C.: National Academy Press, 2001. 381 p.

NEAL, K. **Nutrient utilization, lactational performance, and profitability of dairy cows by feeding protein supplements in high-forage lactation diets**. 2014. 89 f. Thesis (Degree of Master of Science in Animal, Dairy Veterinary Sciences) - Utah State University, Logan, Utah, 2014.

NEWBOLD, J. R.; RUST, S. R. Effects of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 2, p. 538-546, 1992.

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,** New York, v. 86, n. 4, p. 1398-1404, 2003.

OLIVEIRA, A. S.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C. Consumo, digestibilidade aparente, produção e composição do leite de vacas alimentadas com quatro níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 1358-1366, 2001.

OLIVEIRA, A. S. et al. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1621-1629, 2001.

OLIVEIRA, E. N. A. et al. Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 409-415, 2010.

OLMOS COLMENERO, J. J.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 89, n. 5, p. 1704-1712. 2006.

OLTNER, R.; EMANUELSON, M.; WIKTORSSON, H. Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 12, p. 47-57, 1985.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. The metabolic profile test. New York: Oxford University Press, 1987.

PEDREIRA, M. S.; BERCHIELLI, T. T. Minerais. In: BERCHIELLI, T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006, 583 p.

PEIXOTO, L. A. O.; OSÓRIO, M. T. M. Perfil metabólico protéico e energético na avaliação do desempenho reprodutivo em ruminantes. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 3, p. 299-304, 2007.

PEIXOTO JR., K. C. **Nitrogênio ureico do leite como indicador de desempenho reprodutivo de rebanhos leiteiros.** São Paulo, 2003. 89 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEREIRA, K. P. et al. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos

alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 29, n. 4, p. 433-440, 2007.

PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: GONZÁLEZ, F.D; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Eds.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 30-45.

PINA, D. S. et al. Consumo e digestibilidade aparente total dos nutrientes, produção e composição do leite de vacas alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 4, p. 1543-1551, 2006.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine:** a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 2156 p.

RESTLE, J.; PACHECO, P. S.; MOLETTA, J. L. Grupo genético e nível nutricional pós-parto na produção e composição do leite de vacas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 3, p. 585-597, 2003.

RIBEIRO, E. L. A. **Influência de diferentes sequências de pastagens na produção de leite e no desempenho de vacas de dois grupos genéticos**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1989. 149 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1989.

ROFFLER, R. E. et al. Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle during early lactation. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 61, n. 10, p. 1422-1428. 1978.

ROFFLER, R. E.; WRAY, J. E.; SATTER, L. D. Production responses in early lactation to additions of soybean meal to diets containing predominantly corn silage. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 69, n. 4, p. 1055-1062, 1986.

ROSE, D. B.; POST, T. W. **Clinical physiology of acid – base and electrolyte disorders**. 5. ed. New York: Mcgraw-Hill, 2001. 992 p.

RUEGG, P. L. Secreción de leche y estándares de calidad. Instituto Babcock Universidad de Wisconsin. **Novedades Lácteas Ordeño & Calidad de Leche**, n. 404, 2001. Disponível em: < http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/documents/productdownload/du_404.es_.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2015.

RULQUIN, H. et al. Milk production and composition as a function of post ruminal lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 37, p.69-90, 1993.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I - ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.

ROSSELL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, v. 23, n. 3, p. 406-426, 2007.

SABBIA, J. A. et al. Soybean meal substitution with a yeast-derived microbial protein source in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 95, n. 10, p. 5888-5900, 2012.

SANTOS, F. A. P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 538-601.

SANTOS, F. A. P; HUBER, J. T.; THEURER, C. B. Milk yield and composition of lactating cows fed steam-flaked sorghum and graded concentrations of ruminally degradable protein. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 81, p. 215-220, 1998.

SANTOS, F. A. P; PEDROSO, A. M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 265-297.

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

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

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** Barueri: Manole, 2007.

SCHWAB, C. G. et al. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation 1,2. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 75, n. 12, p. 3486-3502, 1992.

SCHWAB, C. G. Optimizing amino acid nutrition for optimum yields of milk and milk protein. In: SOUTHWEST NUTRIRION AND MANAGEMENT CONFERENCE, 1994, Tucson. **Proceedings…** Tucson: University of Arizona, 1994. p. 114-129.

SENNA, D. B. **Desempenho reprodutivo e produção de leite de vacas de quatro grupos genéticos, desterneiradas precocemente, submetidas a diferentes períodos de pastagem cultivada**. 1996. 85 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1996.

SERBESTER, U. et al. The effects of sprinkler plus fan, fish meal or dietary fat on milk yield and milk composition of dairy cows in mid lactation during summer. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 14, n. 4, p. 639-653, 2005.

SHAIN, D. H. et al. Effect of degradable intake protein level on finishing cattle performance and ruminal. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 242-248, 1998.

SILANO, C. **Fontes nitrogenadas e teor de proteína bruta em dietas com cana de açúcar para vacas em lactação: balanço de nitrogênio e análise econômica**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SILVA, R. M. N.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C. Ureia para vacas em lactação. 1. Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1639-1649, 2001.

SILVEIRA, V. A. **Substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta para vacas leiteiras.** 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

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

STOKES, S. R. et al. Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 74, n. 3, p. 871-881, 1991.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos.** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 926 p.

TAMMINGA, S. A. Nutrition Management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 75, n. 1, p. 345-357, 1992.

TAMMINGA, S. A. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 3112-3124, 1996.

THRALL. M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

TRAJANO, H. P. **Parâmetros clínicos e laboratoriais de vacas leiteiras no período de transição manejadas em *free stall***. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

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

VALADARES FILHO, S. C. et al. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on nutrient utilization and milk production. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 83, p. 106-114, 2000.

VALADARES, R. F. D. et al. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 82, n. 12, p. 2686-2696, 1999.

VAN HORN, H. H. et al. Complete rations for dairy cattle. III. Evaluation of protein percent and quality, and citrus pulp-corn substitutions. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 58, n. 8, p. 1101-1108, 1975.

VAN SOEST, P. J. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. **Journal Association of Official Analytical Chemists,** Washington, DC, v. 46, p. 825-835, 1963.
VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J.; LEWIS, B. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P.J. Integrated feeding systems. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. p. 140-155.

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, 2008, Lexington. **Proceedings**… Lexington: Alltech, 2008. CD-ROM.

VASCONCELOS, A.M.; LEÃO, M.I.; VALADARES FILHO,S.C.; VALADARES, R.F.D.; DIAS,M.; MORAIS, D.A.E.F. Parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção microbiana de vacas leiteiras alimentadas com soja e seus subprodutos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.425-433, 2010.

WANAPAT, M. et al. Effects of treating rice straw with urea or urea and calcium hydroxide upon intake, digestibility, rumen fermentation and milk yield of dairy cows. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 125, p. 238-243, 2009.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; STPIERRE, N. R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forage and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 39, n. 1-2, p. 95-110, 1992.

WANG, C. et al. Effect of level of metabolizable protein on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 90, n. 6, p. 2960-2965, 2007.

WATTIAUX, M. A. Milk composition and nutritional value. **Dairy Essentials.** The Babcock Institute for International Dairy Research and Development, 1999. chapter 19. Disponível em: <http://.babcock.wisc.edu/node/198>. Acesso em: 05 jan. 2015.

WATTIAUX, M. A.; KARG, K. L. Protein level for alfafa and corn silage based diets. II. Nitrogen balance and manure characteristics. **Journal of Dairy Science,** New York**,** v. 87, p. 3492-3502, 2004.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L.; TROUTT JR., H.F.; LESCH T.N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science,** Albany, v.65, n. 3. p. 495-501, 1982.

WILSON, G. et al. Evaluation of factors responsible for reduced voluntary intake of urea for ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 41, n. 5, p. 1431-1437, 1975.

WRIGHT, T. C. et al. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on nitrogen balance and milk protein production in dairy cows. **Journal of Dairy Science,** New York, v. 81, n. 3, p. 784-793, 1998.

9 ANEXO

Anexo A: Parecer ético

PROTOCOLO Nº 162

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto de Zootecnia

Comissão de Ética no Uso de Animais

(Trabalhando pelo bem-estar e pela dignidade dos animais de produção)

Parecer Técnico

Prezada Senhora

Conforme solicitação aos integrantes da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia (CEUA/IZ) para avaliar o Protocolo Experimental no Uso de Animais e Metodologia do Trabalho do Projeto de Pesquisa intitulado como ***"Efeitos da substituição parcial do farelo de soja por uma fonte d proteína de escape ruminal-DEMP- em dietas de vacas Holandesas em lactação, sobre a produção e composição do leite, teor de nitrogênio uréico no sangue e balanço nitrogenado"*** e constatamos que este está dentro dos princípios em ética e experimentação animal.

Nova Odessa, 18 de setembro de 2012

Luciana Morita Katiki
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal