



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Eficiência na utilização de nitrogênio por bovinos de leite

Carlos Giovanni Pancoti^{1*}, Raphael de Castro Mourão¹, André Moraes Moura², Ana Luiza da Costa Cruz Borges³, Ricardo Reis e Silva³, Fernando César Ferraz Lopes⁴

¹ Doutorando em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, Bolsista do CNPq.

² Mestrando em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

³ Professor do Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

⁴ Analista da Embrapa Gado de Leite, Brasil.

* E-mail para correspondência: cgpncoti@yahoo.com.br

Resumo

Esta revisão teve como objetivo abordar o metabolismo do nitrogênio (N), a utilização de diferentes fontes de N protéico e não protéico em dietas de vacas de leite e discutir seus efeitos sobre o consumo, a digestibilidade, o ambiente ruminal, o desempenho produtivo, a composição do leite e principalmente sobre a eficiência de utilização do N (EUN). Ruminantes têm baixa EUN. Esta baixa eficiência tem implicações não somente na eficiência produtiva e econômica, mas também na emissão de contaminantes no ambiente. Diversos fatores influenciam a utilização do nitrogênio pelo ruminante, entre eles a

fonte de nitrogênio e sua concentração na dieta, a relação proteína:energia, a suplementação mineral, a ração total e o período de adaptação da dieta. A EUN pode ser diretamente melhorada, compreendendo e modificando os processos chave de regulação da EUN, incluindo captura de N no rúmen, degradação protéica, digestão e absorção no trato gastrointestinal e utilização de aminoácidos (AA). Esse entendimento dos processos que envolvem a utilização do N pelo ruminante, possibilita o desenvolvimento de estratégias que possam manipular ou regular o suprimento de AA para os microorganismos, para o animal e para a glândula mamária, garantindo uma maior eficiência, conciliada a uma menor excreção nitrogenada para o ambiente.

Palavras-chave: aminoácido, otimização, proteína, ruminante

Efficiency of nitrogen use for dairy cattle

Abstract

The objective of this review is to address the metabolism of nitrogen (N), the use of different sources of N protein and non-protein in diets of dairy cows and discuss their effects on intake, digestibility, ruminal environment, productive performance, milk composition and especially on the N use efficiency (NUE). Ruminants have low NUE. This low efficiency has implications not only in economic and productive efficiency, but also in the emission of contaminants into the environment. Several factors influence the nitrogen utilization by ruminants, including the source of nitrogen and its concentration in the diet, the protein:energy rate, mineral supplementation, the total ration and diet adjustment period. NUE can be directly improved, understanding and modifying key processes regulating the NUE, including capture of N in the rumen, protein degradation, digestion and absorption in the gastrointestinal tract and use of amino acids (AA). This understanding of the processes involving the use of N by the ruminant, enables the development of strategies to manipulate or regulate the supply of AA for microorganisms to the animal

and the mammary gland, ensuring greater efficiency, reconciled to a lower excretion nitrogen to the environment.

Keywords: amino acid, optimization, protein, ruminant.

1. INTRODUÇÃO

A eficiência produtiva e econômica dos sistemas de produção animal depende, em grande parte, do uso de medidas racionais de manejo, sobretudo no tocante à nutrição dos animais, uma vez que a alimentação representa uma fração significativa dos custos de produção. Neste sentido, o correto balanceamento das dietas possui grande importância, sendo necessário para isso o acurado conhecimento das exigências nutricionais dos animais, assim como da composição bromatológica e da disponibilidade de nutrientes nos distintos alimentos.

Durante muito tempo, o enfoque da nutrição animal era simplesmente o aumento da produção, justificado pela baixa produtividade dos rebanhos. Nos últimos 30 anos, diversos estudos foram conduzidos com o uso de fontes protéicas para ruminantes, tendo como objetivo maximizar a eficiência de utilização da proteína dietética, melhorar o desempenho animal e reduzir perdas de nitrogênio (N) para o ambiente (Santos et al., 1998).

A maioria dos aminoácidos absorvidos pelos ruminantes é oriunda da proteína microbiana ruminal. A nutrição protéica nos ruminantes pode ser definida como a adequação da quantidade de proteína degradável no rúmen (PDR), para que ocorra maior eficiência nos processos fermentativos no rúmen e, com isso, melhor aproveitamento no desempenho animal com menor teor de proteína bruta (PB) na dieta. Segundo o NRC (2001), a maximização da eficiência do uso da PB da dieta requer a escolha de fontes nitrogenadas protéicas e não protéicas que possam disponibilizar quantidades adequadas de PDR que atendam às exigências para a máxima síntese de proteína microbiana e, em determinadas situações, aliar fontes de proteína não degradável no rúmen (PNDR) que forneçam aminoácidos (AA) absorvíveis no intestino delgado em complementação à PDR.

Ampliando a definição de requerimentos de proteína para a quantidade de aminoácidos essenciais (AAE) requeridos, é possível o desenvolvimento de dietas que promovam a máxima eficiência de utilização do nitrogênio (EUN) e minimizem perdas nas fezes, urina e gases (NRC, 2001).

Ruminantes têm uma eficiência média de utilização de N (g de N produzido/g de N consumido) em torno de 25% (Huhtanen e Hristov, 2009) com uma grande margem de variação entre experimentos (15% a 40%). Esta baixa eficiência tem implicações não somente na eficiência produtiva, reprodutiva e econômica, mas também na emissão de contaminantes no ambiente. A eficiência de utilização do N pode ser diretamente melhorada, compreendendo e modificando os processos chave de regulação da eficiência da utilização do N, incluindo captura de N no rúmen, degradação protéica, digestão e absorção no trato gastrointestinal, além da utilização de aminoácidos nos tecidos periféricos.

O objetivo desta revisão é abordar a variação na eficiência de utilização de N, identificar os fatores que afetam esta eficiência e o potencial para a sua manipulação, principalmente em gado de leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMBIENTE RUMINAL

O rúmen funciona como uma câmara de fermentação, que é controlada pelos microrganismos ruminais e que, por sua vez, sofrem influência da dieta oferecida. Maximizar a degradação dos nutrientes com mínima alteração no ambiente ruminal é o desejado. A manutenção de uma população microbiana ativa depende de algumas características ruminais que são mantidas pelo animal hospedeiro, como o suprimento de alimento (mastigado ou ruminado), remoção dos produtos de fermentação, tamponantes e nutrientes via saliva, remoção de resíduos indigestíveis, manutenção do potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, anaerobiose e umidade ideais para o crescimento microbiano.

Russel et al. (1981) descreveram fisicamente o ambiente ruminal, o qual apresenta uma faixa de pH de 5,5 a 7,0 (segundo Van Soest (1994), valores de pH abaixo de 6,0 podem inibir microorganismos celulolíticos e afetar a síntese de proteína microbiana); temperatura entre 38 e 40°C, facilitando a manutenção de uma população ativa; osmolaridade entre 250 e 350 mOsm/kg; potencial redutor entre -350 e -400 mV, refletindo em ausência de oxigênio e excesso de potencial redutor. Quimicamente, as concentrações dos principais ácidos graxos voláteis – AGV's (acético, propiônico e butírico) - variam de 60 a 90; 15 a 30 e 10 a 25 mM, respectivamente. O ácido láctico normalmente tem concentração abaixo de 10 mM. A fase gasosa consiste de H₂ (0,2%), O₂ (0,6%), N₂ (7%), CH₄ (27%) e CO₂ (65%).

Neste sentido, a manutenção do ambiente ruminal com alta capacidade tamponante, pressão osmótica, baixa concentração de oxigênio e baixo potencial redox, garante a seleção de determinadas populações microbianas que colonizam o rúmen.

2.2 MICROORGANISMOS RUMINAIS

No ecossistema ruminal, os microorganismos estabelecem relações simbióticas entre as diferentes populações e também com o animal. Segundo Kamra (2005), no rúmen são encontrados principalmente bactérias (10¹⁰ a 10¹¹ células/ml), protozoários (10⁴ a 10⁶ células/ml) e fungos (10³ a 10⁵ células/ml).

Existem centenas de espécies de microorganismos ruminiais, sendo estas divididas de acordo com o substrato a ser fermentado. Segundo o CNCPS (2004), existem os microorganismos que degradam carboidratos estruturais e os que utilizam carboidratos não estruturais. Uma descrição condensada com relação aos microorganismos bacterianos pode ser observada na tabela 1.

Os protozoários também apresentam participação ativa na degradação ruminal da proteína apesar de serem menos numerosos. Devido ao seu maior tamanho, representam porção significativa da massa microbiana total do rúmen. Com relação ao seu metabolismo protéico, ao invés de se ligarem às

partículas (adsorção) formando complexos, como as bactérias, os protozoários ingerem totalmente as partículas (bactérias, fungos e pequenas partículas), sendo as bactérias sua principal fonte de proteína ingerida (Jouany et al., 1999).

Em geral, os protozoários compreendem os grupos dos ciliados (*Holotrichia*) e os entodimorfos (*Entodinia*). Apresentam atividade de degradação dos componentes fibrosos, mas degradam carboidratos não estruturais com maior eficiência. Um impacto significativo desses microorganismos é regular a taxa de degradabilidade do amido, reduzindo sua taxa de fermentação, conseqüentemente reduzindo a intensidade de queda no pH, ao qual são mais susceptíveis (Fonty et al., 1984).

Tabela 1 – Principais microorganismos bacterianos presentes no rúmen

Espécie	Fonte de N	Observação
Fermentadoras de Carboidratos Estruturais		
<i>Ruminococcus albus</i>		não utilizam
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	amônia	peptídeos e
<i>Fibrobacter succinogenes</i>		aminoácidos (AA)
Fermentadoras de Carboidratos Não Estruturais		
<i>Streptococcus bovis</i>		
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	66% peptídeos e	
<i>Lactobacilos sp.</i>	AA; 34% amônia	
Proteolíticas		
<i>Bacteroides amylophilus</i>		
<i>Bacteroides rumenicola</i>		
<i>Selenomonas sp.</i>	peptídios e AA	
<i>Clostridium sp.</i>		
Ureolíticas		
<i>Streptococcus faecium</i>		
<i>Succiniovibrio dextrinosolvans</i>		
<i>Ruminococcus bromii</i>	uréia	
<i>Selenomonas sp.</i>		

Fonte: Adaptado de Russel et al. (1992)

Os protozoários, além de realizarem a predação bacteriana, utilizam estes AA para a síntese de suas próprias proteínas, podendo alterar o fluxo de N. A defaunação, teoricamente, resulta em maior eficiência na síntese e no fluxo de

proteína microbiana, devido à alteração na degradação protéica e na taxa de passagem (Jouany et al., 1999).

Os fungos, em menor parte, são parte integrante da microbiota ruminal, sendo encontrados com maior participação (até 8% da massa microbiana) em dietas ricas em fibras, participando de sua degradação (Kamra, 2005). Seu papel no metabolismo protéico é considerado ínfimo em função da sua pequena população, porém, devido ao efeito de estabilização da fermentação ruminal, proporcionando efeito tampão, poderia ocorrer menores variações na amônia ruminal (Harrison et al., 1988).

2.3 METABOLISMO DO NITROGÊNIO

A proteína bruta dietética é constituída das frações que são degradáveis no rúmen (PDR) e das não degradáveis no rúmen (PNDR). A degradação ruminal ocorre através de enzimas secretadas pelos microorganismos que utilizam AA, peptídeos e amônia para a síntese de proteína microbiana. A uréia (endógena e exógena) é rapidamente hidrolisada pela urease, resultando na produção de amônia e dióxido de carbono (CO₂).

O nitrogênio amoniacal (N-NH₃) ruminal é o parâmetro mais utilizado para a mensuração do suprimento e metabolismo protéico no rúmen. Na maioria das dietas, o pico de N-NH₃ ruminal ocorre de 1 a 2 horas após a ingestão de alimentos, e segundo Satter e Slyter (1974), o valor necessário de N para que não ocorra inibição da fermentação microbiana é de 5 mg/dL de líquido ruminal. Leng (1990) relata concentrações superiores a 10 mg/dL para maximização da degradação da MS e superiores a 20 mg/dL para maximizar o consumo.

Schwab et al. (2005) sugeriram que as bactérias requerem de 5 a 11 mmol de N amoniacal/L para um ótimo crescimento microbiano, dependendo das condições de fermentação, embora alguma perda de N ocorra quando a concentração aumenta acima de 5 mmol/L. Schwab et al. (2005) também relataram que o nível mínimo poderia ser determinado baseado na degradação ótima da matéria orgânica (MO) no rúmen, resultando em

recomendações elevadas. Entretanto, fornecendo-se elevada concentração de N amoniacal para otimizar a degradação da MO, tem-se um inevitável aumento da perda de N para a absorção ruminal.

A concentração de amônia no rúmen é reflexo do equilíbrio entre as taxas de sua produção, utilização, absorção e passagem. O metabolismo do N no rúmen depende do teor de PB na dieta, da taxa de degradação protéica, da ingestão de MS e do sincronismo da degradação entre a proteína e o carboidrato da dieta (Tamminga, 2006). Segundo Van Soest (1994), com relação à utilização de N ruminal, os carboidratos constituem o fator de maior influência.

O excesso de amônia pode ser absorvido pelo epitélio ruminal (a forma ionizada NH_4^+ é lentamente absorvida na parede ruminal) e transformada em uréia no fígado. A uréia pode ser eliminada na urina ou pode retornar via saliva ou sangue.

2.4 FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA NA UTILIZAÇÃO DO NITROGÊNIO (EUN) NO RÚMEN

O rúmen tem sido identificado como o principal responsável pela baixa EUN, porém, existe a necessidade crítica de reavaliar alguns aspectos fundamentais sobre o entendimento da otimização da síntese de proteína microbiana e da degradação protéica, do ponto de vista de eficiência de N.

2.4.1 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Aumentando-se a síntese de proteína microbiana, aumenta-se o suprimento de proteína com um equilibrado perfil de AA para o intestino delgado, diminuindo-se a concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen. O fluxo total de N microbiano depende principalmente da disponibilidade de energia no rúmen (mensurado como energia fermentável) e da eficiência na síntese de proteína microbiana (ESPM, mensurada como g de N bacteriano/kg de energia fermentável), desde que o fornecimento de N não seja limitante (Calsamiglia et al., 2010). Estes critérios têm sido utilizados para estabelecer recomendações na alimentação bovina. Porém, o desafio é: 1) o uso da ESPM

como parâmetro de eficiência da fermentação microbiana ruminal; 2) o uso da concentração de N amoniacal no rúmen como base para avaliar a disponibilidade de N para os microorganismos do rúmen e; 3) o uso do fluxo de N microbiano para o intestino delgado como base para mensurar a disponibilidade de proteína microbiana para o animal.

A ESPM aumenta linearmente com o aumento de PDR para uma concentração de até 14% (%MS) (Hoover e Stokes, 1991), refletindo a importância do suprimento de PDR para a maximização da ESPM. Estas observações direcionam recomendações para alto nível de PDR nas dietas. Porém, enquanto ESPM é um bom indicador de eficiência, assim como a disponibilidade de energia no rúmen é usada para síntese de proteína microbiana e crescimento, ela não fornece uma indicação da eficiência da utilização do N no rúmen.

Bach et al. (2005) propuseram usar a eficiência de utilização de N no rúmen (EUN-R), avaliada como a taxa entre gramas de N bacteriano sintetizado por grama de N disponível no rúmen. O N disponível significa a PDR e a proteína endógena disponível (incluindo N reciclado). Utilizando-se EUN-R como conceito fundamental, pode-se contribuir para redução da excreção de N pelos ruminantes. O cálculo desse número *in vivo* é dificultado, devido à dificuldade de se mensurar o N endógeno. Os estudos para calcular este último, utilizando dados *in vitro*, resultaram em diferentes recomendações para alimentação, tanto para atender às necessidades do animal quanto para o rúmen. Em contraste, para ESPM, EUN-R é negativamente correlacionado com PDR e concentração de N amoniacal no rúmen, sugerindo que dietas com baixa PDR (%MS) deveriam ser utilizadas para alimentar ruminantes (Bach et al., 2005).

As recomendações disponíveis na literatura são contraditórias, e, considerando-se que ambas as mensurações são importantes para uma ótima função ruminal, um ponto ótimo para ESPM e EUN deve ser determinado. Bach et al. (2005), utilizando condições *in vitro*, em cultura contínua para fluxo duplo (onde não foi estimado o N endógeno requerido), para relatar a relação quadrática entre ESPM (g de N bacteriano/kg de MO fermentada) e EUN-R (g de N bacteriano/100 g de N disponível), observaram uma eficiência ótima de

crescimento com 29 g de N microbiano/kg de MO fermentada, e uma EUN-R de 69 g de N microbiano/100 g de N disponível no rúmen.

Griswold et al. (1996), baseando-se nos efeitos de digestibilidade da fibra, concluíram que peptídeos e AA são requeridos para adequada função ruminal, incluindo-se a elevação da degradação da fibra. Entretanto, os autores não obtiveram efeito na ESPM (32,9 a 35,4 g de N bacteriano/kg de MO fermentada). A EUN-R foi maior para a proteína verdadeira (92%), intermediária para peptídeos (83%) e menor (71%) quando suplementada com uréia ou AA na dieta. É interessante observar que a dieta com peptídeos forneceu grande quantidade de N não amoniacal, comparada com os outros tratamentos. Isso deixa claro que apenas a concentração de N amoniacal para definição do nível ótimo de suplementação não é suficiente para avaliar a disponibilidade de N para as bactérias do rúmen, e que mensurações das concentrações de AA e peptídeos também são necessárias.

Calsamiglia et al. (2008) relataram que o efeito do pH na EUN-R foi pequeno em dietas para gado de corte, mas a relação foi quadrática para gado de leite ($EUN-R = -151,03 + 69,34pH - 5,66pH^2$; $r^2 = 0,50$), com máxima EUN-R em pH 6,1 (EUN-R = 61,2%).

A contribuição do fluxo de N proveniente de protozoários para o fluxo total microbiano, pode ser quantitativamente importante e pode afetar a estimativa correta de EUN. No rúmen, a reciclagem de N bacteriano pela predação protozoária tem um importante custo energético, mas o impacto, tanto na reciclagem quanto na EUN-R é incerto. A maior parte dos nucleotídeos será reutilizada pelos microorganismos ruminais ou retornar para o *pool* de N amoniacal. Entretanto, algumas evidências sugerem que uma proporção de purinas seja degradada a xantinas e a outros derivados de purina que não serão utilizados, representando uma perda irreversível de N (McAllan, 1982). A importância quantitativa desse processo, na prática adequada de alimentação necessita ser elucidada. A defaunação geralmente resulta em aumento na ESPM, devido à baixa reciclagem interna de N. Karnati et al. (2009), em estudos *in vitro*, relataram que a defaunação resultou em um aumento da

eficiência da utilização do N pelas bactérias de 74,5% para 95,6%, mas quando a EUN-R foi calculada, considerando-se a síntese de proteína microbiana (protozoários e bactérias), as diferenças foram muito menores (90,8% para 95,7%).

O uso do fluxo de N microbiano como indicador de eficiência de utilização protéica no rúmen também precisa ser elucidado. A maior parte do N microbiano é composta de N aminoacídico (N-AA) e N-ácido nucléico, e a maior parte dos sistemas de alimentação usa um valor constante de 80% para N-AA e 20% para N-ácido nucléico (NRC, 2001). Entretanto, estes valores são afetados principalmente pelo tipo de dieta e pela taxa de crescimento bacteriano, entre outros fatores. Altas taxas de crescimento bacteriano também resultam em enriquecimento de ácidos nucléicos nas células bacterianas. Conseqüentemente, fatores que aumentam a taxa de crescimento bacteriano (tal como altas taxas de diluição para aumentar o consumo, ou o aumento da oferta de carboidratos não fibrosos – CNF – na dieta) tendem a superestimar a oferta de proteína metabolizável no *pool* microbiano. Isso é relevante porque bases de purinas e principalmente bases pirimídicas são perdidas na urina e representam uma irreversível perda de N. Logo, seria necessário descrever ESPM e EUN-R em relação ao N-AA, ao invés de simplesmente na base de N-bacteriano.

2.4.2 CONTROLANDO A DEGRADAÇÃO PROTÉICA NO RÚMEN PARA FORNECER NUTRIENTES NECESSÁRIOS PARA UMA ÓTIMA UTILIZAÇÃO DO NITROGÊNIO PELA BACTÉRIA

O excesso de amônia ruminal tem sido contornado pelo uso de fontes de proteína de baixa degradação, reduzindo a concentração de N amoniacal no rúmen, mas também reduzindo a síntese de proteína microbiana, principalmente devido à baixa disponibilidade de N para crescimento microbiano. Uma possível alternativa para reduzir o N amoniacal sem diminuir a disponibilidade de N para crescimento microbiano é o controle da degradação protéica em diferentes etapas do processo. A prática consiste em reduzir a

degradação peptídica e deaminação dos AA, reduzindo a produção de amônia sem limitar o suprimento de AA e peptídeos para as bactérias do rúmen. Desta forma é possível, não somente manter a taxa de síntese de proteína microbiana, mas aumentar sua eficiência (Cotta e Russel, 1982).

Broderick et al. (1991) demonstraram que a proteína degradada rapidamente pode resultar no acúmulo de peptídeos e AA nas duas primeiras horas após a alimentação, sugerindo que as taxas de lise peptídica e deaminação tem um importante papel no controle da degradação protéica. Estas últimas podem modificar as proporções das diferentes frações de N. A redução da quebra oligopeptídica tem a vantagem de serem poucas as bactérias envolvidas nesse processo (*Streptococcus bovis*, *Ruminococcus amylophilus* e *Prevotella* spp), sendo mais apropriado o seu controle (Walker et al., 2005).

Há evidências de que a modificação na população de *Prevotella* spp, ou na inibição direta da enzima dipeptidil peptidase, envolvida na degradação oligopeptídica, poderia ajudar na redução da taxa de degradação de oligopeptídeos. Entretanto, os vestígios da redução da degradação e acúmulo de oligopeptídeos no fluido ruminal terão um efeito positivo ou negativo sobre o crescimento microbiano e na EUN-R. A inibição da degradação de di e tripeptídeos, tanto quanto a inibição da deaminação, podem ser mais benéficas porque os precursores dessas reações (pequenos peptídeos e AA) são utilizados eficientemente pelas bactérias (Cotta e Russel, 1982). Infelizmente, um grande grupo de bactérias e protozoários está envolvido nesse processo, tornando o controle mais complicado (Walker et al., 2005).

A deaminação ocorre por meio de dois caminhos distintos: por intermédio de um grande número de bactérias com baixa atividade de deaminação (*Prevotella* spp) ou por um pequeno número de bactérias com uma elevada atividade de deaminação (com hiper produção de amônia – HPA). Bactérias HPA são gram-positivas, logo, possivelmente sensíveis à monensina (Chen e Russel, 1989). Ferme et al. (2004), através de estudos *in vitro*, relataram que a inibição das principais bactérias produtoras de amônia (*Prevotella ruminantium* e *Prevotella bryantii*) resultou na redução da concentração de N

amoniaco e concomitante acúmulo de AA e pequenos peptídeos. Óleos essenciais também possuem efeitos na inibição da deaminação. O uso de anticorpo policlonal contra algumas dessas bactérias tem sido sugerido como uma alternativa para o controle específico de diferentes etapas da degradação protéica (Walker et al., 2005). Entretanto, a extensa modificação da concentração de diferentes frações nitrogenadas e seus efeitos sobre o crescimento microbiano e na EUN-U precisam ser determinados.

2.4.3 IMPACTO DA RECICLAGEM DE NITROGÊNIO NA EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DESTES PELOS RUMINANTES

A extensiva degradação protéica nos pré-estômagos dos ruminantes constitui uma perda de AA, mas ao mesmo tempo, a habilidade dos microorganismos de sintetizarem proteína a partir de fontes nitrogenadas não protéicas, e a capacidade de reciclagem de nutrientes, poderiam compensar esta perda potencial, devido à proteína microbiana sintetizada, digerida e absorvida. A transferência de N do sangue para o trato digestivo (via saliva, descamação epitelial, secreção glandular e pelo sistema porta) é definida como reciclagem (Calsamiglia et al., 2010).

Um nível mínimo de N amoniacal no rúmen é requerido para adequado crescimento bacteriano (Satter e Slyter, 1974). Dada a relativa absorção de amônia para manter uma concentração mínima no rúmen, é dispendioso para o ruminante, em termos energéticos, a re-síntese de uréia no fígado, representando um desafio avaliar o ponto ótimo de reciclagem do nitrogênio com relação à sua eficiência de utilização.

No sentido de aproveitar a reciclagem de N, seria necessário reduzir o consumo de N ao mesmo tempo em que o fluxo de uréia para o rúmen fosse aumentado, no mínimo, na mesma proporção. O restante permaneceria inalterado. Sendo assim, o fluxo de N e o desempenho produtivo seriam mantidos enquanto o consumo de N e a excreção urinária de uréia seriam reduzidos e a EUN seria maior. Entretanto, Calsamiglia et al. (2010) não

obtiveram resultado com o aumento da reciclagem de uréia com consumo decrescente de N dietético.

Esses mesmos autores, avaliando 14 trabalhos sobre reciclagem do N, observaram grande variação na absorção de uréia-N através do sistema portal visceral (SPV), sendo verificados valores entre 6% e 41% do N dietético consumido. Concluiu-se que a absorção portal de uréia-N não está adaptada como indica a teoria da reciclagem, isto é, baixa concentração de uréia-N arterial não é seguida pelo aumento da absorção portal de uréia-N. Nos mesmos estudos, houve uma positiva correlação entre consumo de N e transferência de uréia-N para o intestino, relação contrária à hipótese de que vacas leiteiras aumentam a transferência de uréia-N para o intestino para compensar o menor consumo de N na dieta.

Desta maneira, pode ser questionada a aparente habilidade de vacas leiteiras em compensar a diminuição do consumo de N pelo aumento da reciclagem de uréia-N no sangue. A existência de proteínas epiteliais de transporte, facilitando o transporte de uréia-N do sangue para o intestino, fornece alguma esperança de que seria possível a manipulação da transferência de uréia-N do sangue para o intestino pelo fornecimento da dieta ou, em um futuro próximo, pela manipulação genética.

A digestibilidade de proteínas no intestino delgado é também um processo que pode ter impacto na eficiência de utilização dos AA. A digestibilidade protéica varia em detrimento de um grande número de fatores, incluindo a fonte protéica (composição e estrutura), o processamento (calor) ou fatores anti-nutricionais como os inibidores da tripsina (Stern et al., 1997).

2.5 INTERRELAÇÃO ENTRE OS FATORES E ASPECTOS PRÁTICOS QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DO NITROGÊNIO PELO GADO DE LEITE

Jonker et al. (2002) avaliaram o impacto de diferentes estratégias de manejo da alimentação na eficiência de utilização do nitrogênio em fazendas de produção de leite. O trabalho foi realizado em 372 propriedades, visando

avaliar nos rebanhos o consumo de nitrogênio, a excreção urinária e fecal de nitrogênio e a sua eficiência de utilização com base nas recomendações do NRC (1989). Interpretando os dados na tabela 2, nota-se que os produtores alimentaram seus rebanhos com média de 6,6% de nitrogênio acima dos requisitos recomendados, resultando em 16% de aumento na excreção urinária de N e de 2,7% na excreção de N fecal.

Tabela 2 – Médias e desvio padrão (DP) dos valores de eliminação e eficiência de utilização do nitrogênio (N) de vacas em lactação em diferentes propriedades

Item	Observada		(NRC 1989)	
	Média	DP	Média	DP
NUL (mg/dL)	12,7	3,4	11	0,7
CN (g/animal/dia)	532	72	499	40
N Fecal (g/animal/dia)	187	12	182	7
N urina (g/animal/dia)	195	52	168	12
EUN (g/100g)	28,4	3,9	29,8	2,2

Fonte: Adaptado de Jonker et al. (2002). NUL = nitrogênio uréico no leite; CN = consumo de nitrogênio; EUN = eficiência de utilização do nitrogênio

Jonker et al. (2002) ainda avaliaram, através de estudos de correlação, o efeito da produção de leite (corrigido para 4% de gordura) e a EUN, mostrando efeito de aumento da EUN com o aumento da produção de leite ($r^2 = 0,25$). Não houve relação do nível de proteína consumida e a produção de leite. Da mesma forma, os autores observaram que a utilização de BST (hormônio somatotropina bovina), três ordenhas e aumento do fotoperíodo diminuíram a excreção de N (urinária e fecal) por unidade de leite produzido, em 8,0; 7,0 e 5,0%, respectivamente. Quando as três tecnologias foram utilizadas concomitantemente, a diminuição foi de 16%. Avaliando o efeito do N alimentar consumido e requerido, houve diminuição da EUN quando o N na dieta ultrapassou o requerimento ($r^2 = 0,71$). Os autores concluíram que quando a proteína da dieta atende os requisitos a produção por animal aumenta e contribui para promover uma maior EUN.

Lisina (Lys) e metionina (Met), respectivamente, são sugeridas como primeiro e segundo AA limitante para a produção de leite em dietas baseadas em

silagem de milho (Schwab et al., 1992). Estes AA estão presentes no tecido corporal, nos microorganismos do rúmen e no leite, em uma relação aproximada de 3:1 (NRC, 2001). Schwab (1996) sugeriu que a suplementação com Lys e Met em 15 e 5% dos AAE digestíveis no duodeno ou numa taxa de 3:1 poderia otimizar a produção de leite.

Davidson et al. (2003), trabalhando com 65 vacas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de silagem de milho, avaliaram cinco diferentes tratamentos com concentrações de PB e PNDR variáveis e com valores fixos de Lys e Met (3:1), tendo como enfoque a EUN (Tabela 3).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos com relação aos consumos (C) de MS e FDA. Houve maior CPB e CPNDR para o tratamento 1, resultando em elevadas concentrações de N no leite, de N na urina e de amônia no rúmen. A concentração elevada de $\text{NH}_3\text{-R}$ no tratamento 1 indicou que, neste tratamento, a amônia foi menos utilizada no rúmen, principalmente quando comparada ao tratamento 4. Os dados também sugeriram que não houve deficiência de PDR. A produção de leite e as concentrações de gordura e proteína no leite não foram diferentes. Os autores concluíram que estes parâmetros foram mais afetados por tamanho corporal do que por medidas de utilização de N.

Não houve diferença para a excreção fecal de N pelas vacas nos diferentes tratamentos. O N fecal consiste em proteína microbiana indigestível no trato gastrointestinal (TGI), bem como proteína endógena, células de descamação do TGI, e proteína alimentar indigestível (Mason, 1969). Como a proteína indigestível do alimento é um componente menor do N fecal total, a diferença de excreção de N nas fezes entre tratamentos não foi observada. O tratamento 4 teve menor eliminação de N no leite e na urina, sem limitar a produção. Quando comparado ao tratamento 1, ocorreu uma diminuição de 33,7% na eliminação de N na urina. A concentração no plasma de Lys e Met, similar à proporção 3:1, sugeriu que a dieta foi adequadamente formulada para estes AA e que a diferença da utilização de N resultou de diferentes quantidades de

NNP, PDR e PNDR das dietas. Concluiu-se que dietas devem ser formuladas de forma que otimizem a produção de leite e minimizem a excreção de N.

Tabela 3 – Composição das dietas, valores de consumo dos nutrientes, produção e composição do leite e valores de nitrogênio em tratamentos com diferentes concentrações protéicas em vacas leiteiras da raça Holandês

Item	Tratamentos				
	1	2	3	4	5
Dieta					
MS (%)	55,3	54,9	56,6	54,3	55,0
PB (%MS)	19,4	16,5	16,8	16,8	17,2
PNDR (%PB)	40	34	40	46	43
Lys:Met	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1
EL _L (Mcal/dia)	38,1	36,8	36,7	37,1	38,2
FDA (%MS)	23,4	24,3	25,9	22,9	23,8
Consumo					
MS (kg/dia)	23,8	22,9	23,1	23,4	24,1
PB (kg/dia)	4,53 ^a	3,78 ^b	3,89 ^b	3,92 ^b	4,13 ^b
PNDR (kg/dia)	1,81 ^a	1,36 ^c	1,55 ^b	1,80 ^a	1,78 ^a
FDA (kg/dia)	5,46	5,57	5,99	5,36	5,72
Leite					
Produção (kg/dia)	35,3	33,0	33,5	33,3	35,2
PB (%)	3,11	3,01	3,02	3,04	3,06
Gordura (%)	3,35	3,36	3,42	3,57	3,05
NUL (mg/dL)	21,9 ^a	16,0 ^c	17,6 ^b	14,3 ^d	17,0 ^{bc}
Rúmen					
NH ₃ (mg/dL)	12,1 ^a	8,4 ^{bc}	9,3 ^b	7,4 ^c	9,2 ^b
Excreção N					
Urina (g/dia)	312 ^a	230 ^{bc}	249 ^b	207 ^c	248 ^b
Fezes (g/dia)	283	308	296	277	290

Fonte: Adaptado de Davidson et al. (2003). Tratamento 1 = 19,4% de PB + 40% de PNDR (em % da PB); Tratamento 2 = 16,5% de PB + 34% de PNDR (em % da PB); Tratamento 3 = 16,8% de PB + 40% de PNDR (em % da PB); Tratamento 4 = 16,8% de PB + 46% de PNDR (em % da PB); Tratamento 5 = 17,2% de PB + 43% de PNDR (em % da PB); MS = matéria seca; PB = proteína bruta; PNDR = proteína não degradada no rúmen; EL_L = energia líquida de lactação; FDA = fibra em detergente ácido; NUL = nitrogênio uréico no leite; NH₃ = amônia. Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05)

Voelker et al. (2009), trabalhando com oito vacas lactantes fistuladas no rúmen e duodeno, avaliaram o efeito de dietas à base de silagem de leguminosa e silagem de gramínea. A composição dos volumosos e dos

tratamentos encontra-se na tabela 4. O consumo de N e os parâmetros ruminais de N são observados na tabela 5.

Tabela 4 – Composição nutricional da silagem de leguminosa (SL), da silagem de gramínea (SG) e de dois diferentes tratamentos

Item	Silagem Alfafa (SL)	Silagem Gramínea (SG)	T1 (SL)	T2 (SG)
MS	30,6	35,3	43,6	50,6
MO	88,7	89,2	91,5	91,5
FDN	42,6	48,0	26,7	27,5
FDNi	25,2	13,1	14,8	7,9
FDNpd	17,4	34,9	11,9	19,7
Amido	4,0	2,3	30,2	32,1
PB	20,5	20,4	18,3	18,8
PNDR	-	-	5,6	6,3

Fonte: Adaptado de Voelker et al. (2009). T1 (SL) = 53% de silagem de leguminosa na dieta (%MS); T2 (SG) = 47% de silagem de gramínea na dieta (%MS); MS = matéria seca; MO = matéria orgânica, FDN = fibra em detergente neutro; FDNi = fibra em detergente neutro indigestível; FDNpd = fibra em detergente neutro potencialmente digestível; PB = proteína bruta; PNDR = proteína não degradada no rumen

Tabela 5 – Consumo de nitrogênio (CN g/dia), teores de nitrogênio no rúmen e nitrogênio microbiano (NM) de vacas leiteiras Holandesas alimentadas sob diferentes tratamentos, à base de silagem de leguminosa ou gramínea

Item	T1 (SL)	T2 (SG)	Valor de P
CN (g/d)	621	623	0,90
Pool de N no rúmen (g)	269 ^b	37 ^a	0,04
Turnover do N no rúmen (h)	10,7 ^b	14,4 ^a	0,01
[NH ₃] rúmen (mg/dL)	29,3 ^a	18,0 ^b	<0,01
pH rúmen	6,27 ^a	6,0 ^b	<0,01
CN digerido no rumen (g)	195 ^a	109 ^b	0,02
CN digerido no rumen (%)	30,4 ^a	17,7 ^b	0,02
CN digerido no TGI (g)	425	424	0,98
CN digerido no TGI (%)	68,6	68,1	0,41
NM para o duodeno (g/d)	271	293	0,48
NM (g/g MO digerida no rumen)	23,2	26,6	0,24

Fonte: Adaptado de Voelker et al. (2009). T1 (SL) = 53% de silagem de leguminosa na dieta (%MS); T2 (SG) = 47% de silagem de gramínea na dieta (%MS); [NH₃] = concentração de amônia; TGI = trato gastrintestinal; MO = matéria orgânica. Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05)

Devido à equivalência entre os tratamentos, quanto às concentrações de PB e PNDR, bem como aos CMS semelhantes, o consumo de N não foi afetado pelo

tratamento ($P = 0,90$; Tabela 5). O *pool* e o *turnover* ruminal de N foram maiores para T2 do que para T1 (Tabela 5). Isso ocorreu provavelmente como resultado de uma taxa mais lenta de passagem da digesta pelo rúmen para T2 e, possivelmente, devido a uma maior proteólise para T1. As duas silagens continham concentrações semelhantes de N, mas a proteína da alfafa geralmente é degradada mais rapidamente e extensivamente no rúmen do que a proteína de gramíneas (Kohn e Allen, 1995), por isso, ocorre maior concentração de NH_3 no rúmen.

O pH mais baixo (T2) faz com que o ritmo de absorção seja mais lento, pois o NH_3 é convertido em NH_4^+ , que é absorvido muito mais lentamente do que o NH_3 . Também, a diminuição do pH pode diminuir a motilidade do rúmen, reduzindo a mistura no rúmen e a taxa de absorção de NH_3 . Para T2, havia menos N disponível como NH_3 e possivelmente uma taxa mais lenta de absorção de NH_3 , observado no maior *pool* e *turnover* de N no rumen.

Os efeitos de tratamento não foram detectados para o fluxo de N microbiano para o duodeno ou para a eficiência de síntese de proteína microbiana (g/g de MO degradada no rumen; Tabela 5). É possível que, para a síntese microbiana, os efeitos positivos da maior taxa de passagem para T1 foram compensados pelos efeitos positivos da maior digestibilidade da MO para T2. Embora mais N tenha sido absorvido no rúmen para T1, a digestão pós-ruminal compensatória de N ocorreu para T2 ($P = 0,05$), de modo que em todo o trato digestivo, a digestibilidade do N e a quantidade de N absorvido foram semelhantes em ambos os tratamentos.

A forma com que o N dietético foi absorvido pode ter afetado sua proporção no leite e a eficiência com que ele foi capturado em proteínas. A média da produção e da concentração de proteína verdadeira no leite não diferiu entre os tratamentos (Tabela 6). Porém, mais N uréico foi excretado no T1 em relação ao T2. Estes resultados são condizentes com o maior desaparecimento de N no rúmen para T1 em comparação com T2, provavelmente como NH_3 , utilizada para sintetizar uréia no fígado. O N- NH_3 e a concentração de NUL foram altamente correlacionados ($P < 0,01$; $r^2 = 0,84$). O N que não foi usado

para produzir proteína do leite foi, provavelmente, secretado também na urina (N urinário não foi avaliado no presente experimento).

Tabela 6 – Produção e composição do leite de vacas da raça Holandês alimentadas sob dois diferentes tratamentos à base de silagem de leguminosa ou gramínea

Item	T1 (SL)	T2 (SG)	Valor de P
Produção Leite (kg/dia)	27,7	27,9	0,77
Leite 3,5% (LCG)	29,9	32,2	0,27
Proteína Verdadeira no Leite (%)	3,09	3,10	0,67
NUL (mg/dL)	23,5 ^a	15,3 ^b	<0,01

Fonte: Adaptado de Voelker et al. (2009). T1 (SL) = 53% de silagem de leguminosa na dieta (%MS); T2 (SG) = 47% de silagem de gramínea na dieta (%MS); NUL = nitrogênio uréico no leite; LCG = leite corrigido para gordura. Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,01)

A aparente eficiência do N dietético em produzir proteínas do leite também pode ser aumentada através da mobilização da proteína do tecido corporal para atender a demanda para produção de leite. Isso não foi confirmado significativamente pela interação tratamento versus mudanças no PV ou condição corporal (CC), mas essas mudanças são difíceis de detectar em curto período experimental.

Além da possível resposta de mobilização no tecido, o consumo de N e as respostas de digestibilidade de N provavelmente foram fatores primordiais na diminuição da eficiência de utilização de N para a produção de proteínas do leite no T1 em comparação ao T2. A disponibilidade de energia foi provavelmente mais limitante do que a de proteína para produção de leite. As dietas foram formuladas para garantir que a disponibilidade de N e AA não fossem limitantes para a fermentação ruminal e produção de leite. O consumo de PB foi elevado (cerca de 18,5% da MS) para as duas dietas. Mesmo com o excesso de PB e de PDR em ambas as dietas, o efeito da dieta no TGI, na digestibilidade do N e na eficiência de utilização de N para proteína do leite dependeram do CMS. Com isso, quando práticas são implementadas para permitir um maior CMS, a concentração de N na dieta deve ser reduzida para evitar a digestão e utilização de N menos eficientes.

Além disso, os efeitos do CMS na digestão e utilização reforçam a necessidade de que os animais sejam alimentados de acordo com o índice de demanda de nutrientes. Isso permitiria que as dietas fossem formuladas de forma mais precisa para atender às demandas de cada animal e, assim, levar à utilização mais eficiente do N em todos os grupos de animais na fazenda. Maior digestão e utilização do N e formulação de dietas mais precisas vão reduzir a proporção e a quantidade de N excretadas na urina ou fezes. Assim, adequando-se as práticas de alimentação para os efeitos do aumento do CMS sobre a eficiência de utilização de N, pode-se contribuir para a redução dos resíduos de nitrogênio.

Satter e Roffler (1975) relatam que o NNP é aproximadamente igual à proteína verdadeira como fonte de nitrogênio em rações típicas contendo não mais do de 12 a 13% de proteína bruta (na MS da ração), mas que o NNP suplementar não deveria ser utilizado em rações típicas contendo mais de 13% de PB. Eles concluíram que o único benefício do aumento da proteína bruta acima de 13% seria atingido através da adição de "proteína natural", algumas das quais escapariam da degradação ruminal e, portanto, estariam disponíveis para digestão pós-ruminal. Utilizando 13% de PB degradada no rúmen ou NNP, seria fornecida mais amônia para os microorganismos ruminais que estes poderiam utilizar, e o excesso de nitrogênio não seria utilizado pelo animal. Porém, outros fatores além da proteína da dieta são importantes na utilização de NNP, como conteúdo energético da dieta.

Aitchison et al. (1976) realizaram três experimentos envolvendo vacas de segunda lactação e no pico de produção. As dietas basearam-se em 55% de silagem de milho e 45% de uma mistura de grãos (%MS). As dietas completas utilizadas nos ensaios 1, 2 e 3 continham 12, 13 e 15% de PB, respectivamente, fornecidas quatro vezes ao dia. A energia líquida das dietas foi de 1,92 Mcal/kg. Em cada ensaio (concentração de PB), o teor de uréia entre os tratamentos foi variável, com zero, 8, 16 e 24% do nitrogênio total da dieta.

Os coeficientes de utilização do nitrogênio solúvel nos mesmos ensaios foram 0,293, 0,305, e 0,567%, respectivamente. Estes resultados demonstram que havia grandes diferenças entre a utilização do nitrogênio solúvel e insolúvel. Os coeficientes de utilização de nitrogênio solúvel foram semelhantes para os coeficientes de utilização de uréia. Ou seja, o nitrogênio solúvel foi utilizado com a mesma eficiência do N da uréia. A utilização da porção de nitrogênio solúvel da dieta foi consideravelmente maior para as vacas no ensaio 3. Esta poderia ser uma indicação de que as vacas do ensaio 3 foram mais eficientes no uso global do nitrogênio, na medida em que elas eram o grupo com maior produtividade. A utilização do nitrogênio total da dieta diminuiu com o aumento do teor de nitrogênio solúvel. Embora a utilização do nitrogênio solúvel tenha sido constante, a utilização aparente dessas frações de nitrogênio diminuiu quando a sua concentração nas dietas aumentou, por causa da mudança resultante da solubilidade do nitrogênio na dieta total. A utilização do nitrogênio solúvel parece ser mais dependente da ingestão de matéria seca e menos dependente do teor de PB da dieta ou da produção das vacas, contradizendo a conclusão anterior dos autores.

Nas dietas dos ruminantes, a proteína dietética é fornecida sob a forma de PDR e PNDR. Quantidade suficiente de PDR é essencial para suportar o crescimento de microorganismos no rúmen, o que pode constituir 60 a 75% do fluxo de AA para o intestino delgado. Baixos níveis de PDR podem comprometer o crescimento microbiano, digestibilidade e disponibilidade de proteína para o hospedeiro. Excesso de PDR também pode ter conseqüências negativas para a reprodução, reduzindo a qualidade de embriões em ovinos, possivelmente relacionada com as concentrações de esteróides ovarianos que afetam o desenvolvimento do embrião e de transporte (Fahey et al., 2001).

A PNDR contribui com AA para alcançar o intestino delgado, aumentando o fluxo de AA em conjunto com AA microbianos. Em vacas leiteiras, a contribuição da PNDR na forma de farelo de soja aumentou o fluxo de N não microbiano-amoniaco para a produção de leite no intestino delgado, aumentando a produção de leite em 7% (Cunningham et al., 1996). Portanto,

o balanceamento de dietas para ruminantes em PDR e PNDR pode alterar a utilização de N e a produção de leite. No entanto, por causa da interação da PDR e PNDR, a avaliação dos seus efeitos sobre a produção de leite deve considerar esses nutrientes de forma independente.

No caso dos ovinos, há recomendações dietéticas para níveis de PDR, mas não para PNDR. As recentes diretrizes (NRC, 2007) indicam que uma ovelha leiteira de 100 kg de PV, com produções entre 2,37 a 3,97 kg de leite/dia exige 8,6% PDR (% MS) para maximizar a produção de proteína microbiana no rúmen. Com o aumento da PNDR, os requisitos de PB diminuem, indicando maior eficiência de utilização de N com o aumento do PNDR.

Mikolayunas-Sandroch et al. (2009), trabalhando com ovelhas leiteiras, avaliaram o efeito da degradabilidade protéica e utilização da proteína na produção de leite sob dois níveis produtivos (Baixa: 1,58 ± 0,62 kg/d; Alta: 2,49 ± 0,60 kg/dia). As dietas eram isoenergéticas e possuíam diferentes concentrações de PDR e PNDR (%MS): 12-6 (12% de PDR e 6% de PNDR); 14-4 (14% de PDR e 4% de PNDR) e 12-4 (12% de PDR e 4% de PNDR). A composição dos tratamentos e a avaliação do consumo estão apresentadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 – Composição nutricional das dietas 12-6 (12% de PDR e 6% de PNDR); 14-4 (14% de PDR e 4% de PNDR) e 12-4 (12% de PDR e 4% de PNDR) em % MS

Dieta	FDN	FDA	CNF	MM	EE	PB	PDR	PNDR	Fração Protéica				
									A	B1	B2	B3	C
12-6	22,9	13,5	46,2	4,5	3	26,3	10,6	9,7	2,1	1,5	19,9	2,3	0,5
14-4	22,8	15,2	42,4	4,9	2,3	29,1	12,3	7,6	1,9	4,7	21	0,8	0,5
12-4	22,7	15,3	49,5	4,9	1,9	22,3	10,6	6,6	2,3	1,5	17,1	0,8	0,5

Fonte: Adaptado de Mikolayunas-Sandroch et al. (2009). FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; CNF = carboidratos não fibrosos; MM = matéria mineral; EE = extrato etéreo; PB = proteína bruta; PDR = proteína degradável no rumen; PNDR = proteína não degradada no rúmen; A = nitrogênio não protéico; B1 = proteína verdadeira de alta solubilidade; B2 = proteína verdadeira de média solubilidade; B3 = proteína verdadeira de baixa solubilidade; C = proteína insolúvel

Tabela 8 – Consumo dos nutrientes (kg/dia) e de energia líquida para lactação (EL_L (Mcal/dia)) de ovelhas com baixo e alto níveis de produção de leite em dietas com diferentes concentrações de proteína na MS: 12-6 (12% de PDR e 6% de PNDR); 14-4 (14% de PDR e 4% de PNDR) e 12-4 (12% de PDR e 4% de PNDR)

Consumo (kg/dia)	Nível de Produção		Tratamentos		
	Baixo	Alto	12 - 6	14 - 4	12 - 4
MS	8,67 ^B	10,78 ^A	9,86	9,66	9,67
FDN	3,07 ^B	3,87 ^A	3,33	3,54	3,53
CNF	3,24 ^B	4,02 ^A	3,82 ^a	3,40 ^b	3,71 ^a
PB	1,71 ^B	2,11 ^A	2,03 ^a	1,98 ^a	1,72 ^b
EL _L (Mcal/kg)	1,60	1,59	1,62	1,57	1,60
Fração Protéica					
A	0,23	0,28	0,25	0,25	0,27
B1	0,16	0,19	0,14 ^b	0,25 ^a	0,13 ^b
B2	1,12 ^B	1,35 ^A	1,36 ^a	1,28 ^{ab}	1,06 ^b
B3	0,15 ^B	0,20 ^A	0,22	0,14 ^b	0,16 ^b
C	0,07	0,11	0,07	0,07	0,12

Fonte: Adaptado de Mikolayunas-Sandroch et al. (2009). MS = matéria seca; FDN = fibra em detergente neutro; CNF = carboidratos não fibrosos; PB = proteína bruta; PDR = proteína degradável no rumen; PNDR = proteína não degradada no rúmen; A = nitrogênio não protéico; B1 = proteína verdadeira de alta solubilidade; B2 = proteína verdadeira de média solubilidade; B3 = proteína verdadeira de baixa solubilidade; C = proteína insolúvel. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05) para diferentes níveis de produção; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05) para os diferentes tratamentos

Avaliando-se os dados da tabela 8, as ovelhas de alta produção consumiram mais (P<0,05) nutrientes do que as ovelhas de baixa produção, sugerindo que o consumo (C) foi regulado pela demanda energética para produção de leite. Não foram observadas diferenças no CMS, CFDN, CFDA, CEE, CMM, CEL, CfA (consumo da fração A), CfB3 (consumo da fração B3) e CfC (consumo da fração C) entre os tratamentos protéicos. A ingestão de CNF foi menor (P<0,05) no tratamento 14-4 quando comparada aos demais tratamentos. No entanto, a concentração de NE_L (Mcal/kg) na dieta consumida foi semelhante em todos os níveis de produção de leite e tratamentos. As ovelhas de maior produção consumiram uma maior (P<0,05) quantidade das frações B2 e B3 e houve tendência (P = 0,0503) de maior consumo de fração A em relação às ovelhas de baixa produção.

Entre os tratamentos, não houve diferenças significativas na ingestão de proteína altamente solúvel (fração A). Ovelhas do tratamento 14-4 consumiram mais ($P < 0,05$) da fração de alta PDR (B1) do que os animais dos demais tratamentos. A ingestão de fração B2 foi menor ($P < 0,05$) no tratamento 12-4. As ovelhas alimentadas com a dieta do tratamento 12-6 consumiram mais ($P < 0,05$) da fração protéica B3, que resulta em uma contribuição maior para o PNDR, do que ovelhas alimentadas com as outras dietas experimentais. Não houve diferença na ingestão de proteínas da fração C. A dieta 12-6 forneceu mais PNDR do que as 14-4 e 12-4, e a dieta 14-4 forneceu mais PDR do que 12-4 e 12-6.

De acordo com os dados da tabela 9, a dieta com maior concentração de PNDR (12-6) aumentou ($P < 0,05$) a produção de leite em 14% em comparação com as demais dietas experimentais. O provável benefício da suplementação com PNDR foi o aumento do fluxo de AA para o intestino delgado. Não houve efeito de PDR adicional (14-4 versus 12-4) na produção de leite. Todas as dietas continham concentrações de PDR acima da exigência (8,6%), pois o crescimento microbiano não poderia ser limitado, a PDR adicional fornecida pela dieta 14-4 provavelmente foi excretada nas fezes e na urina.

Foi verificada maior produção de gordura e proteína (g/dia) no leite para os animais de maior produção, provavelmente devido à maior produção de leite destes animais. Não houve efeito significativo do nível de produção de leite ou de algum dos tratamentos dietéticos sobre a porcentagem de proteína do leite. As ovelhas de maior produção leiteira produziram maior quantidade de ($P < 0,05$) proteína no leite do que as de baixa produção. Comparado com os tratamentos 12-4 e 14-4, o tratamento 12-6 produziu 14 e 13% mais ($P < 0,01$) proteína no leite, respectivamente. Isso ocorreu provavelmente devido à suplementação de PNDR, pois não houve variação no consumo de energia.

As ovelhas de alta produção foram 25% mais eficientes do que as ovelhas de baixa produção na conversão de consumo de proteína a proteína do leite. As ovelhas foram semelhantes na manutenção do peso corporal. Portanto, em níveis similares de consumo de N, os animais de maior produção apresentaram

maior eficácia parcial para a produção de leite. Entre os tratamentos, as ovelhas que consumiram a dieta 14-4 tiveram 11 e 15% menor ($P < 0,05$) EUN do que as ovelhas consumindo os tratamentos 12-6 e 12-4, respectivamente. A dieta 12-6 favoreceu a produção de mais leite, gordura e proteína do leite, dando suporte à suplementação de PNDR.

Tabela 9 – Produção e composição do leite, eficiência de utilização do nitrogênio e variação de peso corporal de ovelhas de baixa e alta produção de leite em dietas com diferentes níveis de proteína na MS: 12-6 (12% de PDR e 6% de PNDR); 14-4 (14% de PDR e 4% de PNDR) e 12-4 (12% de PDR e 4% de PNDR)

Item	Nível de Produção		Tratamentos		
	Baixa	Alta	12 - 6	14 - 4	12 - 4
Leite (kg/dia)	1,53 ^B	2,23 ^A	2,05 ^a	1,80 ^b	1,79 ^b
Gordura (%)	6,17	6,29	6,13	6,37	6,18
Gordura (g/dia)	91,2 ^B	137,8 ^A	124,5 ^a	111,1 ^{ab}	108,0 ^b
Proteína (%)	4,71	4,89	4,74	4,95	4,80
Proteína (g/dia)	69,9 ^B	108,6 ^A	96,7 ^a	85,9 ^b	85,1 ^b
NUL (mg/dL)	24,87	26,57	26,33 ^{ab}	27,39 ^a	23,43 ^b
EUN (%)	12,09 ^B	15,08 ^A	13,86 ^a	12,54 ^b	14,36 ^a
Mudança PV (kg)	- 0,37	- 0,31	- 0,93	- 0,08	0,0

Fonte: Adaptado de Mikolayunas-Sandroch et al. (2009). PDR = proteína degradável no rumen; PNDR = proteína não degradável no rumen; NUL = nitrogênio uréico no leite; EUN = eficiência de utilização do nitrogênio. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) para diferentes níveis de produção; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) para os diferentes tratamentos

Em vacas leiteiras, a eficiência bruta de utilização de N varia de 26,2 a 33,8% (Wattiaux e Karg, 2004). Uma das razões para a eficiência de N menor em ovelhas é que a eficiência de conversão da proteína microbiana à proteína do leite é menor em ovinos que em bovinos de leite, com valores de 0,58 versus 0,67 (NRC, 2007). A intensa seleção genética do gado leiteiro para produção de leite pode ter aumentado a eficiência de uso do N acima do potencial genético de ovelhas leiteiras. De qualquer forma, as melhorias na eficiência da utilização do N em rebanhos de leite podem ser obtidas pelo balanceamento nas dietas de PDR e PNDR, aumentando a produção de leite.

As concentrações de nitrogênio uréico no leite têm sido utilizadas como um indicador de utilização da proteína em vacas leiteiras (Jonker et al., 2002). No caso dos ovinos, há uma forte relação entre nitrogênio uréico no sangue (NUS), nitrogênio uréico no leite (NUL) e nitrogênio uréico na urina (NUU) (Kohn et al., 2005), sugerindo que o NUL também pode ser utilizado em ovinos para estimar a quantidade de N em excesso que é excretado. Não houve diferença do NUL atribuível ao nível da produção de leite. Não houve diferença entre os níveis de NUL nas dietas de alta PB (12-6 e 14-4). No entanto, o NUL do tratamento 12-4 foi menor ($P < 0,05$) do que o tratamento 12-6 e houve tendência ($P = 0,053$) a ser menor do que o tratamento 14-4. Esses resultados sugerem que os níveis de uréia no leite foram mais estreitamente relacionados com o consumo de PB do que com a degradabilidade da proteína. Apesar da dieta 12-6 resultar em maior captura de proteína ingerida em proteína do leite, em comparação com a dieta de 14-4, os dados sugerem que NUL em ambos os tratamentos apresentaram excesso de proteína total da dieta. Do ponto de vista do laticínio, estas informações são relevantes principalmente para o leite de pequenos ruminantes, pois a maioria desse leite é transformada em queijo, e proteína e gordura são importantes na determinação do rendimento do produto.

Martinez et al. (2009), trabalhando com vacas leiteiras da raça Holandês, avaliaram o efeito da alimentação volumosa (50 e 60% da MS da dieta), com ou sem administração de monensina. No experimento 1, a silagem de alfafa (SA) e a silagem de milho (SM) compunham 55 e 45% da suplementação volumosa, e no experimento 2, a SM e o feno de alfafa (FA) compunham 70 e 30% do volumoso total, respectivamente. Os objetivos deste estudo foram examinar os efeitos da alimentação de vacas de alta produção sob duas concentrações de volumosos na dieta com ou sem suplementação de monensina, sobre o CMS, produção e composição do leite, digestibilidade, excreção fecal dos nutrientes e eficiência de utilização do N (tabela 10).

Tabela 10 – Consumo de matéria seca (CMS kg/dia) e do nitrogênio (g/dia), produção e composição do leite, valores de nitrogênio e digestibilidade dos nutrientes em vacas Holandesas consumindo diferentes porções de volumoso, com presença (+) ou não (-) do aditivo monensina

Item	Experimento 1 (55SA:45SM)				Experimento 2 (70SM:30FA)			
	50%		60%		50%		60%	
	Volumoso		Volumoso		Volumoso		Volumoso	
	-	+	-	+	-	+	-	+
CMS (kg/d)	29,3 ^a	30,0 ^a	27,5 ^b	27,1 ^b	29,8	29,5	28,2	28,2
Leite (kg/dia)	46,9	47,1	45,3	46,3	40,6	40,9	41,1	41,1
Gordura (%)	3,33 ^b	3,46 ^{ab}	3,61 ^a	3,42 ^{ab}	3,72	3,64	3,70	3,76
Gordura (kg/dia)	1,56	1,65	1,66	1,62	1,52	1,45	1,58	1,49
Proteína (%)	3,13 ^a	3,11 ^{ab}	3,10 ^{ab}	3,03 ^b	3,15	3,18	3,15	3,14
Proteína (kg/dia)	1,47	1,48	1,42	1,44	1,31	1,28	1,35	1,26
Lactose (%)	4,83	4,83	4,79	4,77	4,64	4,69	4,67	4,60
NUL (mg/dL)	9,11	9,61	9,93	9,49	7,72	8,01	8,07	8,17
N fecal (g/d)	349	360	336	312	330	326	311	287
DAMS (%)	62,4	61,4	61,6	63,0	58,6	58,7	60,8	62,0
DAPB (%)	53,5	53,7	50,5	53,5	50,5	49,4	50,7	53,6
DFDN (%)	44,1 ^c	42,0 ^d	47,8 ^b	50,4 ^a	37,7	38,8	34,2	36,7
CN (g/d)	760 ^a	778 ^a	681 ^b	671 ^b	663	655	640	619
EUN (%)	32,5	32,1	35,4	36,3	33,1	33,5	35,7	34,2
NUS (mmol/L)	3,9	3,8	3,6	3,7	4,8	4,9	4,9	5,0

Fonte: Adaptado de Martinez et al. (2009). (55SA45SM) = 55% de silagem de alfafa + 45% de silagem de milho; (70SM30FA) = 70% de silagem de milho + 30% de feno de alfafa; NUL = nitrogênio uréico no leite; DMS = digestibilidade aparente da matéria seca; DPB = digestibilidade aparente da proteína bruta; DFDN = digestibilidade da fibra em detergente neutro, CN = consumo de nitrogênio; EUN = eficiência de utilização do nitrogênio; NUS = nitrogênio uréico no sangue. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e para o mesmo experimento diferem entre si (P<0,01)

Para o experimento 1, a utilização de 60% de volumoso reduziu o CMS (P<0,01). Mesmo com uma menor ingestão, a produção de leite não foi diferente entre os tratamentos. Portanto, a eficiência da conversão alimentar para o leite foi melhor para vacas alimentadas com 60% em comparação com 50% de forragem. A suplementação de monensina não teve efeito sobre o CMS ou produção de leite.

A suplementação de monensina teve efeito mínimo sobre o desempenho animal, com exceção de uma diminuição na porcentagem de gordura e proteína do leite de vacas alimentadas com a dieta rica em forragem (60%

MS). A redução ruminal na produção de acetato e butirato é frequentemente atribuída como o principal fator da redução de percentual de gordura do leite quando as vacas são alimentadas com dietas suplementadas com monensina. A razão pela qual a porcentagem de proteína do leite foi menor quando se utilizou monensina com 60% e não com 50% de volumoso poderia ser a ingestão dietética inferior de MS e de N observada para vacas alimentadas com a dieta 60% de volumoso com monensina, resultando em menor aporte de nutrientes para o intestino delgado, o que potencialmente podem limitar os aminoácidos disponíveis para absorção intestinal e reduzindo a concentração de AA potenciais para a produção de proteínas do leite.

Os resultados desses dois experimentos sugerem que, quando comparadas com dietas contendo 50% (da MS) de volumosos, vacas alimentadas com uma dieta de 60% de volumoso constituída de silagem de alfafa ou silagem de milho como volumoso principal, foram capazes de manter a produção de leite, melhorando ou mantendo a eficiência da conversão alimentar para leite e a eficiência da utilização de N.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento dos processos que envolvem a utilização do nitrogênio pelo ruminante é importante, de modo a possibilitar o desenvolvimento de estratégias que possam manipular ou regular o suprimento de AA para os microorganismos, para o animal e para a glândula mamária, garantindo uma maior eficiência produtiva e econômica, conciliada a uma menor excreção nitrogenada, favorecendo uma maior eficiência de utilização do nitrogênio.

Os conhecimentos sobre a composição do alimento, fracionamento dos nutrientes, ambiente ruminal, microbiota ruminal, fisiologia digestiva, entre outros, devem ser conectados de modo a prover um melhor entendimento de todo o processo de utilização eficiente do nitrogênio.

Novas pesquisas sobre a reciclagem de nutrientes (via saliva e sangue), proteínas transportadoras, suprimento e absorção de aminoácidos no intestino

PANCOTI, C.G. et al. Eficiência na utilização de nitrogênio por bovinos de leite. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 5, Ed. 192, Art. 1291, 2012.

delgado, manipulação ruminal e exigências de proteína são necessárias, de modo a elucidar o uso eficiente dos nutrientes, especificamente do nitrogênio.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITCHISON, T. E.; MERTENS, D. R.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L. Effect of Nitrogen Solubility on Nitrogen Utilization in Lactating Dairy Cattle. **J. Dairy Sci.** v.59, N.12, p.2056-2062, 1976.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. O. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **J. Dairy Sci.** v.88, p.E9-E21, 2005.

BRODERICK, G. A.; WALLACE, R. J.; ORSKOV, E. R. Control of rate and extent of protein degradation. **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants.** Academic Press, NY, p.541-594, 1991.

COTTA, M. A.; RUSSELL, J. B. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. **J. Dairy Sci.** v.65, p.226-234, 1982.

CALSAMIGLIA, S.; CARDOSO, P. W.; FERRET, A.; BACH, A. Changes on rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. **J. Anim. Sci.** v.86, p.702-711, 2008.

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN, N. B.; VAN VUUREN, A. M. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal.** v.4, n.7, p.1184-1196, 2010.

CHEN, G.; RUSSELL, J. B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** v.55, p.1052-1057, 1989.

CNCPS. **The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrition excretion.** Ithaca: Cornell University, 2004.

CUNNINGHAM, K. D.; CECAVA, M. J.; JOHNSON, T. R.; LUDDEN, P. A. Influence of source and amount of dietary protein on milk yield by cows in early lactation. **J. Dairy Sci.** v.79, p.620-630, 1996.

DAVIDSON, S.; HOPKINS, B. A.; DIAZ, D. E.; BOLT, S. M.; BROWNIE, C.; FELLNER, V.; WHITLOW, L. W. Effects of Amounts and Degradability of Dietary Protein on Lactation, Nitrogen Utilization, and Excretion in Early Lactation Holstein Cows. **J. Dairy Sci.** v.86, p.1681-1689, 2003.

FAHEY, J.; BOLAND, M. P.; O'CALLAGHAN, D. The effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and on early embryo survival and development in recipient ewes. **J. Anim. Sci.** v.72, p.395-400, 2001.

FERME, D.; BANJAC, M.; CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; KAMEL, C.; AVGUSTIN, G. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous culture system as revealed by molecular profiling. **Folia Microbiologica.** v.49, p.151-155, 2004.

FONTY, G.; JOUANY, J.P.; SENAUD, J. The evolution of microflora, microfauna and digestion in the rumen of lambs from birth to 4 months. **Canadian Journal of Animal Sciences,** 64(S):165, 1984.

GRISWOLD, K. E.; HOOVER, W. H.; MILLER, T. K.; THAYNE, W. V. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. **J. Anim. Sci.** v.74, p.483-491, 1996.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. **J. Dairy Sci.** v.74, p.3630-3644, 1991.

HUHTANEN, P.; HRISTOV, A. N. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein and milk N efficiency in dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.92, p.3222-3232, 2009.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; HIGH, J. Dairy Herd Management Practices that Impact Nitrogen Utilization Efficiency. **J. Dairy Sci.** v.85, p.1218-1226, 2002.

JOUANY, J.P.; USHIDA, K. The role of protozoa in feed digestion. **Asian – Aust. J. Anim. Sci.** v.12, p.113-128, 1999.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, n.1, p.124-134, 2005.

KARNATI, S. K. R.; SYLVESTER, J. T.; RIBEIRO, C. V. D. M.; GILLIGAN, L. E.; FIRKINS, J. L. Investigating unsaturated fat, monensin or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. I. Fermentation, biohydrogenation, and microbial protein synthesis. **J. Dairy Sci.** v.92, p.3849-3860, 2009.

KOHN, R. A.; ALLEN, M. S. In vitro protein degradation of feeds using concentrated enzymes extracted from rumen contents. **Anim. Feed Sci. Technol.** v.52, p.15-28, 1995.

LENG, R. A. Factors affecting the utilization of 'poor quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.277-303, 1990.

MACALLAN, A. B. The fate of nucleic acids in ruminants. **Proceedings of the nutrition society**, v.41, p.309-316, 1982.

MARTINEZ, C. M., CHUNG, Y. H.; ISHLER, V. A.; BAILEY, K. W.; VARGA, G. A. Effects of dietary forage level and monensin on lactation performance, digestibility and fecal excretion of nutrients, and efficiency of feed nitrogen utilization of Holstein dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.92, p.3211-3221, 2009.

MASON, V. C. Some observations on the distribution and origin of nitrogen in sheep faeces. **J. Agric. Sci.** v.73, p.99-111, 1969.

MIKOLAYUNAS-SANDROCK, C.; ARMENTANO, L. E.; THOMAS, D. L.; BERGER, Y. M. Effect of protein degradability on milk production of dairy ewes. **J. Dairy Sci.** v.92, p.4507-4513, 2009.

National Research Council (NRC). **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 6th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, 1989.

National Research Council (NRC). **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, 2001.

National Research Council (NRC). **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. Natl. Acad. Press, Washington, 2007.

RUSSEL, J. B. HESPELL, R. B. Microbial rumen fermentation. **J. Dairy Sci.** v.64, p.1153-1169, 1981.

RUSSEL, J. B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.C.; et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal Fermentation. **J. Anim. Sci.** v.70, p.3553-3561, 1992.

SANTOS, F. A. P.; HUBER, J. T.; THEURER, C. B.; SWINGLE, R. S.; SIMAS, J. M.; CHEN, K. H. Milk yield and composition of lactating cows fed steam-flaked sorghum and graded concentrations of ruminally degradable protein. **J. Dairy Sci.** v.81, p.215-20, 1998.

SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** v.58, p.1219, 1975.

SATTER, L. D., SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **Br. J. Nutr.** v.32, n.2, p.199-208, 1974.

SCHWAB, C. G.; BOZAK, C. K.; WHITEHOUSE, N. L.; MESBAH, M. M. A. Amino acid limitation and flow to duodenum at 4 stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation. **J. Dairy Sci.** v.75, p.3486–3502, 1992.

SCHWAB, C. G.; HUHTANEN, P.; HUNT, C. W.; HVELPLUND, T. Nitrogen requirements of cattle. **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle.** CABI Publishing, Wallingford, UK. 2005.

SCHWAB, C. G. Rumen-protected amino acids for dairy cattle: Progress towards determining lysine and methionine requirements. **Anim. Feed Sci. Tech.** v.59, p.87–101, 1996.

STERN, M. D.; BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. **J. Anim. Sci.** v.75, p.2256-2276, 1997.

TAMMINGA, S. The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negative energy balance and fertility in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.227-239, 2006.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant.** Cornell University Press, Ithaca, NY. 1994.

VOELKER, J. A.; ALLEN, M. S. Nutrient demand interacts with forage family to affect nitrogen digestion and utilization responses in dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.92, p.1594-1602, 2009.

WALKER, N. D.; NEWBOLD, C. J.; WALLECE, R. J. Nitrogen metabolism in the rumen. **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle.** CABI Publishing, Wallingford, UK. 2005.

WATTIAUX, M. A.; KARG, K. L. Protein level for alfalfa and corn silage-based diets: I. Lactational response and milk urea nitrogen. **J. Dairy Sci.** v.87, p.3480–3491, 2004.