ANA RITA JORDÃO BENTES CABRITA

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO AZOTADA DE SILAGENS DE MILHO NAS FUNÇÕES RUMINAL E LACTOGÉNICA DE VACAS LEITEIRAS



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO
PORTO, 2003

ANA RITA JORDÃO BENTES CABRITA

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO AZOTADA DE SILAGENS DE MILHO NAS FUNÇÕES RUMINAL E LACTOGÉNICA DE VACAS LEITEIRAS

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

Orientador: Professor Doutor António José Mira da Fonseca

Co-orientadores: Professor Doutor José Manuel Fernandes de Abreu

Professor Doutor Emídio Ferreira dos Santos Gomes

Este trabalho foi realizado com o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, tendo a autora auferido, a tempo integral, no período de 01/02/00 a 30/09/00, uma Bolsa de Doutoramento (PRAXIS XXI/BD/21331/99) no âmbito do Programa PRAXIS XXI.

Agradecimentos

Ao apresentarmos este trabalho gostaríamos de manifestar o nosso profundo agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua realização:

Ao INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO (UP), a nossa instituição de acolhimento, à FACULDADE DE CIÊNCIAS da UP, à qual pertencemos, e ao CENTRO DE ESTUDOS DE CIÊNCIA ANIMAL do INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGRÁRIAS E AGRO-ALIMENTARES da UP, pelas facilidades concedidas à realização deste trabalho;

Ao PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO MIRA DA FONSECA, nosso orientador científico, pelo seu constante e inesgotável empenho no reunir das condições necessárias à realização desta tese, bem como pela sugestão do tema, pelo acompanhamento do trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pela revisão cuidada do texto, não esquecendo a amizade e o companheirismo com que sempre nos distinguiu;

Ao PROFESSOR DOUTOR JOSÉ MANUEL ABREU, nosso co-orientador, pela revisão minuciosa e crítica do texto e pela disponibilidade, incentivo e apoio sempre demonstrados ao longo de todo este trabalho;

Ao PROFESSOR DOUTOR EMÍDIO GOMES, nosso co-orientador, pelo forte incentivo e apoio desde o início da nossa actividade profissional, assim como pela participação ao longo deste trabalho;

À COMISSÃO DE ACOMPANHAMENTO, nas pessoas do PROFESSOR DOUTOR ARTUR ÁGUAS, PROFESSOR DOUTOR ARNALDO DIAS DA SILVA, PROFESSOR DOUTOR JOSÉ MANUEL ABREU, PROFESSOR DOUTOR EMÍDIO GOMES e PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO MIRA DA FONSECA pela aprovação do plano deste trabalho e pelas sugestões de melhoria;

À DIRECÇÃO REGIONAL DE AGRICULTURA DE ENTRE-DOURO E MINHO, ESTAÇÃO EXPERIMENTAL – DIVISÃO DE LEITE E LACTICÍNIOS, em particular ao ENG. CARLOS SAMPAIO, por ter disponibilizado todos os meios necessários à condução das experiências com vacas leiteiras em lactação, não esquecendo uma palavra especial de apreço para o ENG. FILIPE MIRANDA e a ENGA. ANUNCIAÇÃO MONTEIRO, pela ajuda durante as experiências; e para todos os funcionários da vacaria da Estação Experimental, em particular para a SRA. MARIA DE DEUS, pela ajuda na condução das experiências e por ter

tornado mais agradável a rotina diária em Paços de Ferreira;

À MESTRE ZULMIRA LOPES, pela análise da composição química das amostras de leite;

Ao INSTITUTE OF GRASSLAND AND ENVIRONMENTAL RESEARCH (IGER), por nos ter recebido para um estágio de curta duração e pela ajuda na análise das concentrações de alantoína e de creatinina nas amostras de urina;

Ao DOUTOR RICHARD DEWHURST (IGER), pela valiosa colaboração e pelas frutuosas discussões que nos proporcionou;

À MESTRE LUÍSA CARVALHO, pela ajuda na recolha de amostras de urina na experiência 1, às alunas estagiárias INÊS MIRANDA e GUADALUPE SOUSA, pela ajuda na condução das experiências 2 e 3 e à DANIELA MELO e à CARINA PEREIRA, pela colaboração na recolha de amostras no decurso destas experiências;

Ao LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DA AGROS/UP, nas pessoas das ENGAS. ANA PINHO e SÍLVIA DIAS e SRA. LURDES SANTOS, pela ajuda nas análises laboratoriais e pelo bom ambiente de trabalho que sempre proporcionaram;

Ao DR. NUNO CANADA, pela inserção de cânulas ruminais nas vacas utilizadas no ensaio de incubação;

Aos SRS. LUÍS PINTO, ALBINO e MIGUEL, funcionários da vacaria do Campus Agrário de Vairão, pelo cuidado posto na manutenção diária das vacas fistuladas;

Ao PROFESSOR DOUTOR JÚLIO CARVALHEIRA, pela prontidão e disponibilidade com que sempre aceitou discutir connosco metodologias de análise estatística;

À SOCIEDADE DESCASCADORA OVARENSE, LDA. (SODOL), na pessoa do SR. FERNANDO ROCHA, pela produção dos alimentos concentrados utilizados nas experiências;

Aos colegas e amigos, em particular à SÍLVIA DIAS, à ELIANE PIMENTA e ao MIGUEL MARQUES, pelo incansável apoio, compreensão e amizade que sempre nos dispensaram;

À minha MÃE, TIA, IRMÃOS e CUNHADO, por todo o carinho e incentivo transmitidos e pelo facto de sempre terem acreditado em nós;

À INÊS, ao JOÃO e à SOFIA, por tornarem todos os momentos únicos.

A TODOS, MUITO OBRIGADO...

Resumo

Este trabalho encontra-se organizado em 7 capítulos que correspondem essencialmente a duas partes – a primeira, de revisão bibliográfica e a segunda, de apresentação do trabalho experimental. Assim, na PARTE I foi realizada uma revisão bibliográfica sobre nutrientes azotados e energéticos passíveis de influenciar a função ruminal (CAPÍTULO 2) e sobre os efeitos do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen na função ruminal e na produtividade de vacas leiteiras (CAPÍTULO 3). Reconhece-se que a consideração dos efeitos da natureza dos substratos (azotados e energéticos), bem como que a quantificação da reciclagem de N e das necessidades de manutenção da população microbiana, permitirá maximizar a fermentação no rúmen. Mas, reconhece-se também, que a sincronização de libertação de energia e de N no rúmen não deve ser descurada, em particular quando o crescimento microbiano é limitado pelas disponibilidades de hidratos de carbono fermentáveis e/ou de amoníaco.

Na PARTE II apresenta-se o trabalho experimental. No CAPÍTULO 4 apresentam-se e discutem-se os resultados dos ensaios conduzidos com o objectivo de estudar os efeitos de diferentes estratégias de suplementação azotada de silagens de milho na ingestão voluntária e na produção e composição do leite de vacas leiteiras. Estes efeitos foram avaliados em três experiências delineadas de acordo com três quadrados latinos 3x3. Em cada experiência, nove vacas *Holstein* foram alimentadas com dietas completas à base de silagem de milho. Na Experiência 1, foram utilizadas vacas no meio da lactação para estudar os efeitos de dietas com diferente relação entre a proteína efectivamente degradável no rúmen (ERDP) e a energia metabolizável potencialmente fermentável (FME), que proporcionaram, respectivamente, uma grande (RL) e uma ligeira deficiência (RM) e um ligeiro excesso (RH) em relação ao nível objectivo de 11 g ERDP MJ^{-1} FME para vacas em lactação. As dietas foram formuladas para serem isoenergéticas e de modo a satisfazerem as necessidades dos animais em proteína metabolizável. Na Experiência 2, foram utilizadas vacas no início da lactação para avaliar os efeitos de diferentes relações entre proteína rápida e lentamente degradável no rúmen. As diferentes relações foram alcançadas substituindo, no alimento concentrado, parte de bagaço de soja por ureia (0, 5 e 10 g ureia kg^{-1}, respectivamente, para os alimentos U0, U5 e U10). Na Experiência 3 foram estudados os efeitos da sincronização das disponibilidades de FME e de ERDP no rúmen. Assim, vacas no meio da lactação foram alimentadas com uma dieta constituída por silagem de milho, feno de azevém, alimento concentrado energético e alimento concentrado proteico. O alimento concentrado proteico foi fornecido uma (D1) ou duas (D2) vezes ao dia, antes da distribuição da dieta base, ou como alimento completo (DU), juntamente com a dieta base.

A dieta RL promoveu ($P<0,05$) menor ingestão de matéria seca e menor produção de leite, mas maior ($P<0,01$) eficiência de utilização da proteína da dieta para a síntese de proteína do leite, não existindo diferenças entre as dietas RM e RH. Na Experiência 2, os tratamentos não afectaram significativamente ($P>0,05$) a ingestão de matéria seca, a produção e a composição do leite. Os resultados da Experiência 3 mostraram pequenos benefícios do sincronismo entre as disponibilidades de FME e de ERDP no rúmen, uma vez que, apenas, o tratamento D1 promoveu menor ($P<0,05$) produção de leite, não se

observando diferenças entre os tratamento D2 e DU. Os resultados da relação alantoína/creatinina em amostras de urina sugerem que o volume de urina produzido aumenta, quer com a ingestão de N, quer com o aumento do assincronismo da disponibilização de energia e de N no rúmen. Esta técnica não permitiu identificar diferenças antecipadas no fluxo de proteína microbiana para o duodeno, tendo, também, sido observada variação diurna na excreção urinária de creatinina, o que sugere a necessidade da recolha da totalidade da urina excretada para se estimar o fluxo de proteína microbiana para o duodeno, em vacas leiteiras, através da excreção urinária dos derivados das purinas.

No CAPÍTULO 5 estudou-se o perfil em ácidos gordos do leite de vaca como método não invasivo de diagnóstico da função ruminal. O perfil em ácidos gordos do leite foi significativamente afectado pelo fornecimento, na dieta, quer de N, quer de hidratos de carbono. A análise de factores (*principal component factor analysis*) discriminou claramente os ácidos gordos que são sintetizados na glândula mamária (ácidos gordos de cadeia curta e média), que dependem da actividade da Δ^9 -desaturase (ácidos gordos monoenóicos), que são sobretudo absorvidos directamente da corrente sanguínea (ácidos gordos de cadeia longa) e aqueles que dependem das populações microbianas do rúmen (ácidos gordos de cadeia ímpar). A análise discriminativa canónica mostrou um maior poder discriminatório, entre dietas, dos ácidos gordos de cadeia ímpar no leite. Os níveis de ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$) aumentaram com o fornecimento de açúcares na dieta, os ácidos 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) associaram-se com os teores em NDF e em PB, parecendo ser o ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) um marcador da deficiência em proteína. Os resultados sugerem que o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite tem potencial como método não invasivo de diagnóstico da função ruminal, em termos de populações microbianas, substratos e interacções, embora esta hipótese tenha, ainda, de ser validada.

Admite-se, uma vez mais, a necessidade dos sistemas correntes de formulação de regimes alimentares – factoriais e estáticos – se basearem nos mecanismos do rúmen e do próprio animal, bem como na dinâmica dos nutrientes individuais, sendo, ainda, desejável que estes permitam prever a variação da composição dos produtos de origem animal.

Abstract

CABRITA, A.R.J.B., 2003. Influence of Nitrogen Supplementation of Maize Silages on Rumen and Lactogenic Functions of Dairy Cows. *Doctoral Thesis*. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, University of Porto, Porto, Portugal, XXIV, 270 pp.

This work is organised in 7 chapters that essentially correspond to two parts – the first, a literature review and the second, a presentation of the experimental work. Therefore, PART I presents a review of the literature on nitrogenous and energetic nutrients that could affect rumen function (CHAPTER 2) and on the effects of synchronising N and energy supply on rumen function and on productivity of dairy cows (CHAPTER 3). It is recognised that taking into account the effects of substrates nature (nitrogenous and energetic) and the quantification of N recycling as well as the maintenance needs of rumen microbes, will allow the maximization of rumen fermentation. It is also recognised that synchronising N and energy supply to the rumen should not be ignored, particularly in conditions where microbial growth is limited by fermentable carbohydrates and/or ammonia.

PART II presents the experimental work. CHAPTER 4 presents and discusses the results of experiments conducted to study the effects of different N supplementation strategies of maize silages on voluntary intake, production and milk composition of dairy cows. These effects were evaluated in three 3×3 Latin square-design experiments. In each experiment, nine Holstein cows received total mixed rations (TMR), based on maize silage. In Experiment 1, mid-lactation cows were used to study effects of diets with different ratios of effective rumen-degradable protein (ERDP; g) to fermentable metabolizable energy (FME; MJ), providing, respectively, a large deficiency (RL), a slight deficiency (RM), and a slight excess (RH) in relation to the target level of 11 g ERDP MJ^{-1} FME for lactating cows. Diets were formulated to be isoenergetic, and to satisfy the metabolizable protein requirements. In Experiment 2, early-lactation cows were used to evaluate effects of different proportions of quickly and slowly rumen-degradable protein achieved by replacing soybean meal with urea in the concentrates (0, 5 and 10 g urea kg^{-1} for U0, U5 and U10, respectively). Experiment 3 investigated the effects of synchronizing the availability of FME and ERDP in the rumen. Mid-lactation cows received a diet containing maize silage, ryegrass hay, energy-rich concentrate and protein-rich concentrate. The protein-rich concentrate was either fed once (D1) or twice (D2) a day before the meal, or included in the TMR (DU).

Treatment RL led ($P<0.05$) to lower dry matter intake, and milk yield, but higher ($P<0.01$) efficiency of utilization of dietary protein in the synthesis of milk protein; there were no significant differences between treatments RM and RH. There were no significant ($P>0.05$) treatment effects on dry matter intake, milk yield or milk composition in Experiment 2. Results from Experiment 3 showed only small benefits in altering the diurnal pattern of supply of RDP and FME, since only with treatment D1 cows produced significantly less ($P<0.05$) than D2 and DU cows, which were similar. Analysis of the allantoin/creatinine ratio in spot urine samples suggests that urine volume increased in

response to increased or unbalanced protein supply. This technique was not useful in identifying the predicted differences in microbial protein yield from the rumen. This fact along with the observed diurnal variation on urinary excretion of creatinine, suggests the need of collection of all urine voided to estimate the microbial protein supply to the duodenum by the purine derivatives excretion in urine.

The use of milk fatty acid profiles of dairy cows as a non-invasive technique to diagnose rumen function was studied in CHAPTER 5. Dietary N and carbohydrate supply significantly affected milk fatty acid profiles. Principal component factor analysis provided a reasonable description of the data, clearly discriminating between fatty acids that are synthesized by different metabolic pathways. Several sources/pathways were distinguished: *de novo* synthesis in the mammary gland (short- and medium-chain fatty acids), Δ^9-desaturase activity (monoenoic fatty acids), direct absorption from the blood stream (long-chain fatty acids), and *de novo* synthesis by the rumen microbial populations (odd-chain fatty acids). Discriminant canonical analysis showed that milk odd-chain fatty acids had a higher ability to discriminate between diets than even-chain fatty acids. 12-methyl-tetradecanoic acid (*anteiso* $C_{15:0}$) increased in line with increasing sugar supply, 15-methyl-hexadecanoic acid (*iso* $C_{17:0}$) and 14-methyl-hexadecanoic acid (*anteiso* $C_{17:0}$) were associated with the NDF and CP contents of diets, and heptadecanoic acid ($C_{17:0}$) appears to be a marker of protein deficiency. The results suggests that milk odd-chain fatty acids have potential to be used as a non-invasive technique to assess rumen function in terms of microbial populations, substrates and interactions, though this hypothesis should be further validated.

It is considered, once more, that current feed evaluation systems – factorial and static – should be based on the mechanisms within the rumen and the animal, as well on the dynamics of individual nutrients, being, also, desirable that they would be capable of predicting changes in composition of the animal products.

Résumé

CABRITA, A.R.J.B., 2003. Influence de la Supplémentation Azotée d'Ensilages de Maïs dans la Fonction Ruminalle et Lactogenique de Vaches Laitières. *Thèse Doctoral*. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Université du Porto, Porto, Portugal, XXIV, 270 pp.

Ce travail a été organisé en 7 chapitres correspondant a deux parties complémentaires – la première, de révision bibliographique, et la deuxième, de présentation du travail expérimental. Ainsi, dans la PARTIE I a été réalisée une révision bibliographique sur nutriments azotés et énergétiques passibles d'influencer la fonction ruminalle (CHAPITRE 2) et sur les effets du synchronisme entre les disponibilités d'azote et d'énergie dans le rumen sur la fonction ruminalle et la productivité de vaches laitières (CHAPITRE 3). On reconnaît que la considération des effets de la nature des substrats (azotés et énergétiques), ainsi que la quantification de l'azote recyclé et des nécessités de maintien de la population microbienne, permettra d'optimiser la fermentation dans le rumen. Mais, on reconnaît aussi, que la synchronisation entre la libération d'énergie et d'azote dans le rumen ne doit pas être négligé, en particulier quand la croissance microbienne est limitée par les disponibilités d'hydrates de carbone fermentable et/ou d'ammoniaque.

Dans la PARTIE II on présente le travail expérimental. Au CHAPITRE 4 sont présentées et discutées les résultats des essais conduits avec l'objectif d'étudier les effets de différentes stratégies de supplémentation azotée d'ensilages de maïs dans l'ingestibilité des régimes et dans la production et la composition du lait de vaches laitières. Ces effets ont été évalués dans trois expériences selon un schème de trois carrés latins 3x3. Dans chaque expérience, neuf vaches Holstein ont été nourries avec des rations complètes à base d'ensilage de maïs. Dans l'Expérience 1, ont été utilisées des vaches en phase moyenne de lactation pour étudier les effets des rations avec différente relation entre la protéine effectivement dégradable dans le rumen (ERDP) et l'énergie métabolisable potentiellement fermentable (FME), lesquels ont proportionné, respectivement, un grand (RL) et un légère défaut (RM) et un léger excès (RH), relativement a un niveau objectif de 11 g ERDP MJ^{-1} FME pour vaches dans lactation. Les régimes ont été formulés pour être isoenergétiques et capables de satisfaire les nécessités des animaux en protéine métabolisable. Dans l'Expérience 2, ont été utilisées des vaches au début de lactation pour évaluer les effets de différentes relations entre protéine rapide et lentement dégradable dans le rumen. Les différentes relations ont été atteintes en substituant, dans l'aliment concentré, partie de tourteau de soja par urée (0,5 et 10 g urée kg^{-1}, respectivement, pour les aliments U0, U5 et U10). Dans l'Expérience 3 ont été étudiés les effets des synchronisations entre les disponibilités de FME et de ERDP dans le rumen. Ainsi, des vaches au moyen de lactation ont été nourries avec une ration constituée par ensilage de maïs, foin de ray-grass, aliment concentré énergétique et aliment concentré protéique. L'aliment concentré protéique a été fourni une (D1) ou deux (D2) fois par jour, avant la distribution de la ration de base ou mélangé avec elle (en aliment complète; DU).

La diète RL a promu ($P<0,05$) moindre ingestion de matière sèche et production de lait, mais plus grande ($P<0,01$) efficacité d'utilisation de la protéine de le régime pour la synthèse de protéine du lait, n'existant pas de différences entre les diètes RM et RH. Dans l'Expérience 2, les traitements n'ont pas affecté significativement ($P>0,05$) ni l'ingestion de matière sèche, ni la production et la composition du lait. Les résultats de l'Expérience 3 ont montré de petits bénéfices du synchronisme entre les disponibilités de FME et de ERDP dans le rumen, une fois que, seulement le traitement D1, a promu moindre ($P<0,05$) production de lait, et on n'observe pas des différences entre le traitement D2 et DU. Les résultats de la relation allantoine/creatinine dans des échantillons d'urine suggèrent que le volume d'urine produit augmente, soit avec l'ingestion de N, soit avec l'augmentation de l'assynchronisme de disponibilisation d'énergie et de N dans le rumen. Cette technique n'a pas permis d'identifier des différences prévues dans le flux de protéine microbienne pour le duodénum, ayant, aussi, été observé variation diurne dans l'excrétion urinaire de creatinine, ce qui suggère la nécessité de la récolte de la totalité de l'urine excrétée pour l'estimation du flux de protéine microbienne pour le duodénum, dans les vaches laitières, à travers l'excrétion urinaire des dérivés des purines.

Au CHAPITRE 5 nous avons étudié le profil des acides gras du lait de vache comme méthode non invasive de diagnostic de la fonction ruminalle. Le profil des acides gras du lait a été significativement affecté par l'approvisionnement, soit de N, soit d'hydrates de carbone, du régime. L'analyse des facteurs (*principal component factor analysis*) a discriminé clairement les acides gras (i) qui sont synthétisés dans la glande mammaire (acides grasses de chaîne courte et moyenne), (ii) que dépendent de l'activité de la Δ^9 - desaturase (acides gras monoènoïques), (iii) que sont surtout absorbés directement de la chaîne sanguine (acides gras de chaîne longue) et (iv) ceux qui dépendent des populations microbiennes du rumen (acides gras de chaîne impaire). L'analyse discriminative canonique a montré le plus grand pouvoir discriminatoire, entre les régimes, des acides gras de chaîne impaire, du lait. Les niveaux d'acide 12-metil - tetradecanoïque (*anteiso* $C_{15:0}$) ont augmenté avec l'approvisionnement des sucres dans la ration, les acides 15-metil-hexadecanoïque (*iso* $C_{17:0}$) et 14-metil-hexadecanoïque (*anteiso* $C_{17:0}$) se sont associées avec les teneurs de NDF et de protéine brute, semblant être l'acide heptadecanoïque ($C_{17:0}$) un marqueur de déficit en protéine. Les résultats suggèrent que le profil des acides gras de chaîne impaire du lait ait potentiel comme méthode non invasive de diagnostic de la fonction ruminalle, en ce qui touche la population microbienne, les substrats et les interactions, bien que cette hypothèse doive être, encore, validée.

On admit, encore, que les systèmes courant de formulation des régimes alimentaires – factorielles et statiques – doivent se baser dans les mécanismes du rumen et du animal, ainsi que dans la dynamique des nutriments individuels, étant, encore, désirable que ces systèmes permettre de prévoir les variations de la composition des produits d'origine animale.

Índice

Págs.

Lista de figuras ..... *xiv*

Lista de quadros ..... *xvi*

Lista de abreviaturas ..... *xxiii*

CAPÍTULO 1

Introdução geral *1*

1.1. Objectivos *1*

1.2. Organização *2*

1.3. Divulgação dos resultados *4*

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 2

Nutrientes azotados, energéticos e a função ruminal *9*

2.1. Introdução *9*

2.2. Fornecimento de azoto e de energia aos microrganismos do rúmen *12*

2.3. Natureza do substrato azotado *15*

2.3.1. Degradação dos compostos azotados no rúmen *15*

2.3.2. Utilização dos compostos azotados no rúmen *18*

2.3.3. Necessidades dos microrganismos em azoto *22*

2.4. Reciclagem de azoto *32*

2.4.1. Para o rúmen *33*

2.4.2. Intra-ruminal *37*

2.4.2.1 Autólise bacteriana *37*

2.4.2.2. Lise por bacteriofagos *38*

2.4.2.3. Lise por défice ou excesso de nutrientes *39*

2.4.2.4. Lise por protozoários *42*

2.4.2.5. Outros factores *43*

2.5. Natureza do substrato energético *44*

2.5.1. Efeito "pH" 47
2.5.2. Efeito "hidrato de carbono" 55
2.6. Efeito das necessidades de manutenção dos microrganismos na síntese de proteína microbiana 56
2.7. Conclusão 60

CAPÍTULO 3
Sincronismo entre as disponibilidades de azoto e de energia no rúmen 63
3.1. Introdução 63
3.2. Alteração dos ingredientes 64
3.2.1. Fontes de amido de diferente degradabilidade 64
3.2.2. Azoto proteico e azoto não proteico 72
3.2.3. Fontes energéticas e azotadas de taxas de degradação semelhantes 74
3.2.4. Índices de sincronização 82
3.3. Alteração do padrão de alimentação 85
3.3.1. Estudos *in vitro* e infusão de nutrientes no rúmen 86
3.3.2. Alteração do padrão de alimentação do suplemento proteico 94
3.4. Frequência de alimentação 97
3.5. Será, afinal, necessário, formular dietas sincronizadas? 102

PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 4
Efeitos da suplementação azotada de silagens de milho na ingestão voluntária e na função lactogénica de vacas leiteiras 107
4.1. Introdução 107
4.2. Breve referência a métodos de estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno 108
4.3. Material e métodos 112
4.3.1. Experiência 1 113
4.3.2. Experiência 2 115
4.3.3. Experiência 3 116
4.3.4. Degradabilidade *in sacco* dos alimentos experimentais 117
4.3.5. Análises químicas 118
4.3.6. Análise estatística 119
4.4. Resultados 120

4.4.1. Alimentos experimentais 120
4.4.2. Dietas 123
4.4.3. Ingestão voluntária, produção e composição do leite 124
4.4.4. Excreção urinária de alantoína e de creatinina 127
4.4.5. Parâmetros sanguíneos 129
4.5. Discussão 129
4.5.1. Avaliação das dietas 131
4.5.2. Ingestão voluntária 133
4.5.3. Excreção urinária de alantoína e de creatinina 143
4.5.4. Produção e composição do leite 146
4.6. Conclusão 154

CAPÍTULO 5

A utilização do perfil em ácidos gordos do leite como técnica não invasiva de diagnóstico da função ruminal 157
5.1. Introdução 157
5.2. Situação dos conhecimentos 159
5.3. Material e métodos 167
5.4. Resultados e discussão 168
5.4.1. Alimentos experimentais 168
5.4.2. Perfil em ácidos gordos do leite 169
5.5. Conclusão 185

CAPÍTULO 6

Conclusões finais 187

CAPÍTULO 7

Referências bibliográficas 191

ANEXO I 237
ANEXO II 257

Lista de Figuras

Págs.

CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1 – Representação esquemática da cinética da degradação da fracção azotada dos alimentos no rúmen (*a*, *b* e *c* parâmetros do modelo de ØRSKOV e MCDONALD (1979); $p = a + b(1 - e^{-ct})$) 14

FIGURA 2.2 – Representação esquemática da degradação e do metabolismo dos compostos azotados no rúmen 16

FIGURA 2.3 – Vias predominantes de assimilação de amónia pelas bactérias do rúmen 21

FIGURA 2.4 – Possíveis factores envolvidos no aumento da permeabilidade das paredes do rúmen à ureia pelo aumento da fermentação dos hidratos de carbono..... 34

FIGURA 2.5 – Efeito da glicose no número de células viáveis (0), relação polissacáridos/proteína celulares (▲) e produção de metilglioxal (•) da *Prevotella ruminicola* B_14 em um meio com baixa concentração de amoníaco (3 mM) 40

FIGURA 2.6 – Catabolismo da glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas e pela via do metilglioxal . 41

FIGURA 2.7 – Relação entre a quantidade de proteína microbiana produzida por unidade de substrato fermentado e a taxa de fermentação no rúmen 44

FIGURA 2.8 – Representação esquemática de um desacoplador (XCOOH) e a sua capacidade de translocação de protões através da membrana celular da bactéria 54

FIGURA 2.9 – Efeito do gradiente de pH através da membrana celular (ΔpH) na acumulação intracelular de aniões de ácidos gordos voláteis ($XCOO^-$) 54

FIGURA 2.10 – Representação esquemática dos efeitos metabólicos potenciais que levam à redução da síntese de proteína bacteriana no rúmen em condições de pH baixo 59

CAPÍTULO 4

FIGURA 4.1 – Variação diária do pH do fluído ruminal recolhido nas duas vacas fistuladas utilizadas no estudo de incubação (valores indicados são médias ± erros padrão) 122

FIGURA 4.2 – Representação esquemática dos mecanismos de acção das proteínas na regulação da ingestão 139

CAPÍTULO 5

FIGURA 5.1 – Representação esquemática da síntese e da secreção da gordura do leite em animais ruminantes 159

FIGURA 5.2 – Representação esquemática da lipólise e da biohidrogenação da gordura da dieta pelos microrganismos do rúmen 163

FIGURA 5.3 – Planos (*plots*) do factor 1 *versus* o factor 2 da análise de factores (*principal component factor analysis*) baseada no perfil em ácidos gordos do leite (a) sem rotação e (b) com rotação ortogonal 180

FIGURA 5.4 – Planos (*plots*) do factor 1 *versus* o factor 3 da análise de factores (*principal component factor analysis*) baseada no perfil em ácidos gordos do leite (a) sem rotação e (b) com rotação ortogonal 181

FIGURA 5.5 – Plano (*plot*) dos ácidos gordos de cadeia par das médias das classes de dietas nas variáveis canónicas. Tratamentos denominados de acordo: com a relação ERDP/FME, RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso; com o seu teor em ureia, respectivamente, 0, 5,0 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10; e com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1 ..... *183*

FIGURA 5.6 – Planos (*plot*) dos ácidos gordos de cadeia ímpar das médias das classes de dietas nas variáveis canónicas (a) CAN 1 *versus* CAN 2 e (b) CAN 1 *versus* CAN 3. Tratamentos denominados de acordo: com a relação ERDP/FME, RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso; com o seu teor em ureia, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10; e com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1 ..... *184*

Lista de Quadros

Págs.

CAPÍTULO 2

QUADRO 2.1 – Composição em aminoácidos das bactérias do rúmen (g 100 g^{-1} aminoácido) *11*

QUADRO 2.2 – Composição em aminoácidos (g 100 g^{-1} aminoácidos com a cisteína e o triptofano excluídos) do leite de vaca, de bactérias ruminais associadas à fase líquida, de forragens e de alimentos concentrados *12*

QUADRO 2.3 – Desaminação *in vitro* de várias fontes proteicas por bactérias e por protozoários ruminais *17*

QUADRO 2.4 – Microrganismos predominantes no rúmen, seus substratos secundários, produtos da sua fermentação em culturas mistas e suas necessidades em nutrientes..... *24*

QUADRO 2.5 – Efeitos da adição e da remoção de aminoácidos individuais na taxa de crescimento e na eficiência de crescimento de bactérias ruminais em cultura mista..... *27*

QUADRO 2.6 – Combinação óptima de aminoácidos (AA) para melhorar a taxa de crescimento e a eficiência de crescimento de bactérias ruminais em cultura mista..... *28*

QUADRO 2.7 – Efeito da concentração de péptidos na dieta na digestibilidade da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO), da fibra de detergente neutro (NDF) e da fibra de detergente ácido (ADF), na produção de ácidos gordos voláteis (AGV), no crescimento e na eficiência microbiana e na utilização do N dos péptidos e dos aminoácidos (AA) *30*

QUADRO 2.8 – Efeito do nível de amido na dieta de ovelhas adultas nos parâmetros de fermentação ruminais (média de quatro determinações diárias) e no fluxo de proteína bruta microbiana (MCP) para o duodeno a adições iso-azotadas de ureia e de caseína *31*

QUADRO 2.9 – Valores publicados e calculados, para ovinos, das concentrações plasmática de ureia e de amoníaco no rúmen, da quantidade de matéria orgânica (MO) aparentemente digerida no rúmen e das taxas de desaparecimento e de transferência da ureia plasmática para o rúmen *35*

QUADRO 2.10 – Efeitos do pH e da sua flutuação na digestibilidade da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO) e da fibra de detergente neutro (NDF) e ácido (ADF), no metabolismo azotado dos microrganismos do rúmen e no fluxo total de aminoácidos (AA) *49*

QUADRO 2.11 – Influência das necessidades energéticas com o transporte e do meio de crescimento na produção de matéria seca de células microbianas por mole de ATP consumido (Y_{ATP}) *57*

CAPÍTULO 3

QUADRO 3.1 – Efeito da alteração da fonte de amido do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na digestão ruminal (R), pós-ruminal (PR) e total do amido da dieta, no N ingerido (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno e na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM) *66*

QUADRO 3.2 – Efeito do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen alcançado por alteração das fontes de hidratos de carbono (HC) e de N do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na ingestão de N (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno, na eficiência de síntese de proteína microbiana (EMPS[1]), na ingestão de matéria seca (IMS; kg dia^{-1}) e na produção de leite (PL; kg dia^{-1}) *75*

QUADRO 3.3 – Efeito da sincronização entre as disponibilidades de N e de energia ao rúmen, manipulada por infusão de nutrientes no rúmen, ou em estudos *in vitro*, na síntese de proteína microbiana e na eficiência de síntese de proteína microbiana *87*

QUADRO 3.4 – Efeito da fonte proteica (bagaço de soja = BS; farinha de sangue = FS; glúten de milho = GM) e frequência de alimentação do concentrado proteico (duas, 2x, ou cinco, 5x, vezes por dia) nos parâmetros ruminais, na ingestão de matéria seca (IMS) e na produção e composição do leite *98*

CAPÍTULO 4

QUADRO 4.1 – Composição ponderal dos alimentos concentrados experimentais (g kg^{-1}) *116*

QUADRO 4.2 – Composição química (g kg^{-1} MS) dos alimentos utilizados no estudo de incubação ... *117*

QUADRO 4.3 – Composição química (g kg^{-1} MS), teor em energia metabolizável (EM; MJ kg^{-1} MS) e degradabilidade *in sacco* da MS (deg MS; %) e do N (Deg N; %) às 0 e às 12 horas dos alimentos utilizados nas experiências 1, 2 e 3 ..... *121*

QUADRO 4.4 – Teores calculados em energia metabolizável (EM; MJ kg^{-1} MS), em energia metabolizável potencialmente fermentável (FME; MJ kg^{-1} MS), em proteína efectivamente degradável no rúmen (ERDP; g kg^{-1} MS) e em proteína não degradável no rúmen (UDP; g kg^{-1} MS) e relação ERDP/FME (g MJ^{-1}) das dietas utilizadas nas experiências 1, 2 e 3 ..... *123*

QUADRO 4.5 – Composição química média das dietas ingeridas, após correcção para os refugos, (g kg^{-1} MS) das experiências 1, 2 e 3 (Desvio padrão entre parêntesis) *124*

QUADRO 4.6 – Digestibilidade da matéria seca (DMS; kg kg^{-1}), da matéria orgânica (DMO; kg kg^{-1}) e da fracção fibra de detergente neutro (DNDF; kg kg^{-1}) das dietas das experiências 1, 2 e 3 ..... *125*

QUADRO 4.7 – Ingestão de matéria seca (IMS), produção e composição do leite e peso vivo das experiências 1, 2 e 3 ..... *126*

QUADRO 4.8 – Efeito do tratamento e da hora de recolha nas concentrações de alantoína e de creatinina e na relação alantoína/creatinina (A/c) nas amostras de urina e estimativa do fluxo de proteína bruta microbiana para o duodeno (MCP) *128*

QUADRO 4.9 – Concentrações plasmáticas de glucose, de ureia, de albumina e de proteínas totais nas experiências 1, 2 e 3 e efeito da hora de recolha das amostras de sangue na Experiência 3 ..... *130*

QUADRO 4.10 – Efeito do teor em proteína bruta (PB, g kg^{-1} MS) da dieta na ingestão de matéria seca (IMS, kg dia^{-1}), na produção de leite (PLeite, kg dia^{-1}), na produção de leite corrigida para o teor em gordura (FCM, kg dia^{-1}), no teor (T, %) e na produção (PR, kg dia^{-1}) de gordura (G) e de proteína (P) do leite *134*

CAPÍTULO 5

QUADRO 5.1 – Teores em ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada de algumas bactérias do rúmen *166*

QUADRO 5.2. – Perfil em ácidos gordos dos alimentos utilizados nas experiências 1, 2 e 3 ..... *170*

QUADRO 5.3 – Perfil em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) das amostras de leite recolhidas na Experiência 1 ..... *171*

QUADRO 5.4 – Perfil em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) das amostras de leite recolhidas na Experiência 2 ..... *172*

QUADRO 5.5 – Perfil em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) das amostras de leite recolhidas na Experiência 3 ..... *173*

QUADRO 5.6 – Matriz de correlações entre o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite (% do total de ácidos gordos), composição da dieta (g kg^{-1} MS) e fluxo estimado de proteína microbiana para o duodeno (MCP; g dia^{-1}) *176*

QUADRO 5.7 – Coeficientes canónicos (*raw canonical coefficients*) para as variáveis canónicas significativas para os ácidos gordos de cadeia par (PAR) e cadeia ímpar (ÍMPAR) do leite *185*

ANEXO I

QUADRO 1.1.A – Constituição dos quadrados segundo o número de lactação, dias em lactação e produção de leite (kg dia^{-1}; média ± desvio padrão) *238*

QUADRO 1.2.A – Composição química (g kg^{-1} MS) das amostras de silagem de milho e de feno de azevém recolhidas antes do início das experiências *238*

QUADRO 1.3.A – Composição química dos refugos das experiências 1, 2 e 3 (g kg^{-1} MS). Desvio padrão entre parêntesis *238*

QUADRO 1.4.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria seca da dieta da Experiência 1 ... *239*

QUADRO 1.5.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria orgânica da dieta da Experiência 1 ..... *239*

QUADRO 1.6.A – Análise de variância da digestibilidade da fibra de detergente neutro da dieta da Experiência 1 ..... *239*

QUADRO 1.7.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria seca da dieta da Experiência 2 . *239*

QUADRO 1.8.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria orgânica da dieta da Experiência 2 ..... *239*

QUADRO 1.9.A – Análise de variância da digestibilidade da fibra de detergente neutro da dieta da Experiência 2 ..... *240*

QUADRO 1.10.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria seca da dieta da Experiência 3 . *240*

QUADRO 1.11.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria orgânica da dieta da Experiência 3 ..... *240*

QUADRO 1.12.A – Análise de variância da digestibilidade da fibra de detergente neutro da dieta da Experiência 3..... *240*

QUADRO 1.13.A – Análise de variância da ingestão de matéria seca da Experiência 1 ..... *240*

QUADRO 1.14.A – Análise de variância da produção de leite da Experiência 1 ..... *241*

QUADRO 1.15.A – Análise de variância da produção de leite corrigida para 4% de gordura da Experiência 1 ..... *241*

QUADRO 1.16.A – Análise de variância do teor em gordura do leite da Experiência 1 ..... *241*

QUADRO 1.17.A – Análise de variância do teor em proteína do leite da Experiência 1 ..... *241*

QUADRO 1.18.A – Análise de variância do teor em lactose do leite da Experiência 1 ..... *241*

QUADRO 1.19.A – Análise de variância da produção diária de gordura do leite da Experiência 1 ..... *242*

QUADRO 1.20.A – Análise de variância da produção diária de proteína do leite da Experiência 1 ..... *242*

QUADRO 1.21.A – Análise de variância da produção diária de lactose do leite da Experiência 1 ..... *242*

QUADRO 1.22.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite e a ingestão de matéria seca, da Experiência 1 ..... *242*

QUADRO 1.23.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a ingestão de matéria seca, da Experiência 1 ..... *242*

QUADRO 1.24.A – Análise de variância da eficiência de utilização da proteína da dieta na síntese de proteína do leite, medida como a relação entre a produção de proteína do leite e a ingestão de proteína bruta, da Experiência 1 ..... *243*

QUADRO 1.25.A – Análise de variância do peso vivo da Experiência 1 ..... *243*

QUADRO 1.26.A – Análise de variância da ingestão de matéria seca da Experiência 2 ..... *243*

QUADRO 1.27.A – Análise de variância da produção de leite da Experiência 2 ..... *243*

QUADRO 1.28.A – Análise de variância da produção de leite corrigida para 4% de gordura da Experiência 2 ..... *243*

QUADRO 1.29.A – Análise de variância do teor em gordura do leite da Experiência 2 ..... *244*

QUADRO 1.30.A – Análise de variância do teor em proteína do leite da Experiência 2 ..... *244*

QUADRO 1.31.A – Análise de variância do teor em lactose do leite da Experiência 2 ..... *244*

QUADRO 1.32.A – Análise de variância da produção diária de gordura do leite da Experiência 2 ..... *244*

QUADRO 1.33.A – Análise de variância da produção diária de proteína do leite da Experiência 2 ..... *244*

QUADRO 1.34.A – Análise de variância da produção diária de lactose do leite da Experiência 2 ..... *245*

QUADRO 1.35.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite e a ingestão de matéria seca, da Experiência 2 ..... *245*

QUADRO 1.36.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a ingestão de matéria seca, da Experiência 2 ..... *245*

QUADRO 1.37.A – Análise de variância da eficiência de utilização da proteína da dieta na síntese de proteína do leite, medida como a relação entre a produção de proteína do leite e a ingestão de proteína bruta, da Experiência 2..... *245*

QUADRO 1.38.A – Análise de variância do peso vivo da Experiência 2 ..... *245*

QUADRO 1.39.A – Análise de variância da ingestão de matéria seca da Experiência 3 ..... *246*

QUADRO 1.40.A – Análise de variância da produção de leite da Experiência 3 ..... *246*

QUADRO 1.41.A – Análise de variância da produção de leite corrigida para 4% de gordura da Experiência 3 ..... *246*

QUADRO 1.42.A – Análise de variância do teor em gordura do leite da Experiência 3 ..... *246*

QUADRO 1.43.A – Análise de variância do teor em proteína do leite da Experiência 3 ..... *246*

QUADRO 1.44.A – Análise de variância do teor em lactose do leite da Experiência 3 ..... *247*

QUADRO 1.45.A – Análise de variância da produção diária de gordura do leite da Experiência 3 ..... *247*

QUADRO 1.46.A – Análise de variância da produção diária de proteína do leite da Experiência 3 ..... *247*

QUADRO 1.47.A – Análise de variância da produção diária de lactose do leite da Experiência 3 ..... *247*

QUADRO 1.48.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite e a ingestão de matéria seca, da Experiência 3 ..... *247*

QUADRO 1.49.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a ingestão de matéria seca, da Experiência 3 ..... *248*

QUADRO 1.50.A – Análise de variância da eficiência de utilização da proteína da dieta na síntese de proteína do leite, medida como a relação entre a produção de proteína do leite e a ingestão de proteína bruta, da Experiência 3 ..... *248*

QUADRO 1.51.A – Análise de variância do peso vivo da Experiência 3 ..... *248*

QUADRO 1.52.A – Análise de variância da concentração de alantoína nas amostras de urina da Experiência 1 ..... *248*

QUADRO 1.53.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol l^{-1}) nas amostras de urina da Experiência 1 ..... *248*

QUADRO 1.54.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 1 ..... *249*

QUADRO 1.55.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$) nas amostras de urina da Experiência 1 ..... *249*

QUADRO 1.56.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 1 ..... *249*

QUADRO 1.57.A – Análise de variância da estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno da Experiência 1 ..... *249*

QUADRO 1.58.A – Análise de variância da concentração de alantoína nas amostras de urina da Experiência 2 ..... *250*

QUADRO 1.59.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol l^{-1}) nas amostras de urina da Experiência 2 ..... *250*

QUADRO 1.60.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 2 ..... *250*

QUADRO 1.61.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$) nas amostras de urina da Experiência 2 ..... *250*

QUADRO 1.62.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 2 ..... *251*

QUADRO 1.63.A – Análise de variância da estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno da Experiência 2 ..... *251*

QUADRO 1.64.A – Análise de variância da concentração de alantoína nas amostras de urina da Experiência 3 ..... *251*

QUADRO 1.65.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol l^{-1}) nas amostras de urina da Experiência 3 ..... *251*

QUADRO 1.66.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 3 ..... *252*

QUADRO 1.67.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$) nas amostras de urina da Experiência 3 ..... *252*

QUADRO 1.68.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 3 ..... *252*

QUADRO 1.69.A – Análise de variância da estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno da Experiência 3 ..... *252*

QUADRO 1.70.A – Análise de variância da concentração plasmática de glucose da Experiência 1 ..... *253*

QUADRO 1.71.A – Análise de variância da concentração plasmática de ureia da Experiência 1 ..... *253*

QUADRO 1.72.A – Análise de variância da concentração plasmática de albumina da Experiência 1 .... *253*

QUADRO 1.73.A – Análise de variância da concentração plasmática de proteínas totais da Experiência 1 ..... *253*

QUADRO 1.74.A – Análise de variância da concentração plasmática de glucose da Experiência 2 ..... *253*

QUADRO 1.75.A – Análise de variância da concentração plasmática de ureia da Experiência 2 ..... *254*

QUADRO 1.76.A – Análise de variância da concentração plasmática de albumina da Experiência 2 ... *254*

QUADRO 1.77.A – Análise de variância da concentração plasmática de proteínas totais da Experiência 2 ..... *254*

QUADRO 1.78.A – Análise de variância da concentração plasmática de glucose da Experiência 3 ..... *254*

QUADRO 1.79.A – Análise de variância da concentração plasmática de ureia da Experiência 3 ..... *254*

QUADRO 1.80.A – Análise de variância da concentração plasmática de albumina da Experiência 3 ... *255*

QUADRO 1.81.A – Análise de variância da concentração plasmática de proteínas totais da Experiência 3 ..... *255*

ANEXO II

QUADRO 2.1.A – Análise de variância do teor em $C_{4:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *258*

QUADRO 2.2.A – Análise de variância do teor em $C_{6:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *258*

QUADRO 2.3.A – Análise de variância do teor em $C_{8:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *258*

QUADRO 2.4.A – Análise de variância do teor em $C_{10:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *258*

QUADRO 2.5.A – Análise de variância do teor em $C_{11:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *258*

QUADRO 2.6.A – Análise de variância do teor em $C_{12:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *259*

QUADRO 2.7.A – Análise de variância do teor em $C_{14:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *259*

QUADRO 2.8.A – Análise de variância do teor em $C_{14:1}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *259*

QUADRO 2.9.A – Análise de variância do teor em $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *259*

QUADRO 2.10.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *259*

QUADRO 2.11.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ... *260*

QUADRO 2.12.A – Análise de variância do teor em $C_{16:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *260*

QUADRO 2.13.A – Análise de variância do teor em $C_{16:1}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *260*

QUADRO 2.14.A – Análise de variância do teor em $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *260*

QUADRO 2.15.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *260*

QUADRO 2.16.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ... *261*

QUADRO 2.17.A – Análise de variância do teor em $C_{17:1}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *261*

QUADRO 2.18.A – Análise de variância do teor em $C_{18:0}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *261*

QUADRO 2.19.A – Análise de variância do teor em $C_{18:1}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *261*

QUADRO 2.20.A – Análise de variância do teor em $C_{18:2}$ das amostras de leite da Experiência 1 ..... *261*

QUADRO 2.21.A – Análise de variância do teor em $C_{4:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *262*

QUADRO 2.22.A – Análise de variância do teor em $C_{6:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *262*

QUADRO 2.23.A – Análise de variância do teor em $C_{8:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *262*

QUADRO 2.24.A – Análise de variância do teor em $C_{10:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *262*

QUADRO 2.25.A – Análise de variância do teor em $C_{11:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *262*

QUADRO 2.26.A – Análise de variância do teor em $C_{12:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *263*

QUADRO 2.27.A – Análise de variância do teor em $C_{14:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *263*

QUADRO 2.28.A – Análise de variância do teor em $C_{14:1}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *263*

QUADRO 2.29.A – Análise de variância do teor em $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *263*

QUADRO 2.30.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *263*

QUADRO 2.31.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ... *264*

QUADRO 2.32.A – Análise de variância do teor em $C_{16:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *264*

QUADRO 2.33.A – Análise de variância do teor em $C_{16:1}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *264*

QUADRO 2.34.A – Análise de variância do teor em $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *264*

QUADRO 2.35.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *264*

QUADRO 2.36.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ... *265*

QUADRO 2.37.A – Análise de variância do teor em $C_{17:1}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *265*

QUADRO 2.38.A – Análise de variância do teor em $C_{18:0}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *265*

QUADRO 2.39.A – Análise de variância do teor em $C_{18:1}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *265*

QUADRO 2.40.A – Análise de variância do teor em $C_{18:2}$ das amostras de leite da Experiência 2 ..... *265*

QUADRO 2.41.A – Análise de variância do teor em $C_{4:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *266*

QUADRO 2.42.A – Análise de variância do teor em $C_{6:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *266*

QUADRO 2.43.A – Análise de variância do teor em $C_{8:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *266*

QUADRO 2.44.A – Análise de variância do teor em $C_{10:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *266*

QUADRO 2.45.A – Análise de variância do teor em $C_{11:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *266*

QUADRO 2.46.A – Análise de variância do teor em $C_{12:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *267*

QUADRO 2.47.A – Análise de variância do teor em $C_{14:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *267*

QUADRO 2.48.A – Análise de variância do teor em $C_{14:1}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *267*

QUADRO 2.49.A – Análise de variância do teor em $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *267*

QUADRO 2.50.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *267*

QUADRO 2.51.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ... *268*

QUADRO 2.52.A – Análise de variância do teor em $C_{16:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *268*

QUADRO 2.53.A – Análise de variância do teor em $C_{16:1}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *268*

QUADRO 2.54.A – Análise de variância do teor em $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *268*

QUADRO 2.55.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *268*

QUADRO 2.56.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ... *269*

QUADRO 2.57.A – Análise de variância do teor em $C_{17:1}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *269*

QUADRO 2.58.A – Análise de variância do teor em $C_{18:0}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *269*

QUADRO 2.59.A – Análise de variância do teor em $C_{18:1}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *269*

QUADRO 2.60.A – Análise de variância do teor em $C_{18:2}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *269*

QUADRO 2.61.A – Análise de variância do teor em $C_{18:3}$ das amostras de leite da Experiência 3 ..... *270*

Lista de Abreviaturas†

A/c = alantoína/creatinina

ACC = acetil-CoA carboxilase

ADF = fibra de detergente ácido

ADL = lenhina de detergente ácido

AGV = ácidos gordos voláteis

CEn = alimento concentrado energético

CLA = ácido linoleico conjugado

CPr = alimento concentrado proteico

D1 = alimento concentrado proteico distribuído uma vez ao dia imediatamente antes da refeição da manhã

D2 = alimento concentrado proteico distribuído em duas refeições antes da dieta base

DP = derivados das purinas

DU = alimento concentrado proteico distribuído como alimento completo com a dieta base

GB = gordura bruta

GDH = glutamato desidrogenase

GS = glutamina sintetase

GOGAT = glutamato sintase

DUP = proteína não degradável no rúmen mas digestível no intestino delgado

EM = energia metabolizável

ERDP = proteína efectivamente degradável no rúmen

FAS = ácido gordo sintase

FCM = produção de leite corrigida para o teor em gordura

FME = energia metabolizável potencialmente fermentável

IDSI = ingestão de amido que é digerido no intestino

LPL = lipoproteína lipase

MADF = fibra de detergente ácido modificada

MO = matéria orgânica

MP = proteína metabolizável

MS = matéria seca

NDF = fibra de detergente neutro

NE_L = energia *net* para a lactação

NSC = hidratos de carbono não estruturais

PB = proteína bruta

PDIM = proteína digestível no intestino de origem microbiana

PDIME = proteína digestível no intestino de origem microbiana permitida pela energia

PDIMN = proteína digestível no intestino de origem microbiana permitida pelo azoto

PUFA = ácidos gordos poli-insaturados

QDP = proteína rapidamente degradável no rúmen

RDP = azoto degradável no rúmen

RDS = amido degradável no rúmen

RH = dieta com ligeiro excesso de ERDP em relação à FME

RL = dieta com grande deficiência de ERDP em relação à FME

RM = dieta com ligeira deficiência de ERDP em relação à FME

SDP = proteína lentamente degradável no rúmen

TDN = total de nutrientes digestíveis

U0 = alimento concentrado com 0 g kg^{-1} de ureia

U5 = alimento concentrado com 5 g kg^{-1} de ureia

U10 = alimento concentrado com 10 g kg^{-1} de ureia

UDP = proteína não degradável no rúmen

UFL = unidade forrageira "leite"

Y_{ATP} = g MS células microbianas formadas $mole^{-1}$ ATP gasto

†Esta lista não inclui abreviaturas utilizadas em quadros e cujo significado se explicita sempre que a elas se recorre.

"Understanding the dairy cow is a matter of heart and mind."
(WEBSTER, 1993).

CAPÍTULO 1
Introdução Geral

1.1. OBJECTIVOS

Na concepção deste trabalho tivémos como objectivos principais o estudo dos efeitos de diferentes estratégias de suplementação azotada de silagens de milho na produção de vacas leiteiras e a avaliação do potencial de utilização do perfil em ácidos gordos do leite de vaca como metodologia não invasiva de diagnóstico da função ruminal, em termos de populações microbianas, substratos e interacções.

Pensamos que o primeiro objectivo também se enquadra na crescente preocupação com o impacto ambiental das explorações animais, bem patente na política agrícola da União Europeia e pelo facto de, em sistemas de produção de leite baseados na cultura do milho-forragem, a suplementação azotada ser crucial à eficiente utilização dos alimentos ingeridos e, consequentemente, à obtenção de produções e rentabilidades elevadas. Estas razões tornam imperiosa, entre outras, a eficiente utilização da fracção azotada da dieta. Neste contexto, a eficiente conversão do azoto (N) degradável no rúmen (RDP) em proteína microbiana permite, por um lado, fornecer ao animal ruminante aminoácidos essenciais e não essenciais menos dependente do fornecimento de proteína não degradável no rúmen (UDP) e, por outro, reduzir a carga poluente das explorações leiteiras, pelo menos, em termos de N.

A necessidade de diagnóstico da função ruminal ao nível da exploração, aliada às preocupações com o bem-estar animal e ao facto dos resultados obtidos, em condições experimentais, não serem sempre directamente transponíveis para as situações práticas, justificam o segundo objectivo, isto é, o desenvolvimento de metodologias não invasivas

de diagnóstico da função ruminal passíveis de serem aplicadas em animais não modificados cirurgicamente, que possam, de facto, servir de base ao desenvolvimento de testes rápidos de diagnóstico do maneio alimentar ao nível da exploração.

1.2. ORGANIZAÇÃO

Neste trabalho estudámos a resposta produtiva de vacas leiteiras a diferentes estratégias de suplementação azotada, considerando em particular os efeitos observados a nível do rúmen. Assim sendo, e admitindo que o primeiro objectivo de formulação de regimes alimentares para animais ruminantes passa pela maximização da síntese de proteína microbiana no rúmen considerámos, como ponto de partida, o estudo de factores relacionados com a variação da disponibilidade de nutrientes azotados e energéticos que influenciam a função ruminal e que ou não são considerados, ou são-no de forma incompleta, pelos sistemas de formulação actuais. Assunto que é revisto no CAPÍTULO 2.

Mas, apesar de ser bem conhecido que os microrganismos do rúmen necessitam para o seu crescimento, entre outros, de nutrientes azotados e energéticos, ainda não é clara a influência dos padrões diários dos fornecimentos de RDP e de energia metabolizável potencialmente fermentável (FME) à população microbiana do rúmen (conceito de sincronização) como meio de potenciar a utilização pelos microrganismos de energia e de N no rúmen. A sincronização permitirá, aparentemente, maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes da dieta, o fluxo de proteína microbiana para o duodeno e diminuir as necessidades de fornecimento de proteína não degradável no rúmen, mas digestível no intestino delgado (DUP). Parece-nos, deste modo, importante que os sistemas de alimentação da vaca leiteira equilibrem os fornecimentos de RDP em função das disponibilidades de FME, considerando as diferentes estratégias passíveis de aumentar o sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen. Os efeitos deste (alcançado pela alteração dos ingredientes da dieta ou pela alteração dos padrões de alimentação) na função ruminal e na resposta produtiva de vacas leiteiras são, por isso, revistos no CAPÍTULO 3.

O trabalho experimental realizado enquadra-se na temática revista. Assim, no CAPÍTULO 4 apresentam-se e discutem-se os resultados de três experiências realizadas com vacas *Holstein* em lactação, delineadas segundo três quadrados latinos 3x3.

Na Experiência 1 avaliou-se a resposta produtiva ao equilíbrio entre os

fornecimentos de N degradável e de FME ao rúmen. As três dietas ensaiadas, à base de silagem de milho, foram formuladas de modo a serem isoenergéticas, a satisfazerem as necessidades dos animais em proteína metabolizável (MP) e a terem diferentes relações g proteína efectivamente degradável no rúmen (ERDP) MJ^{-1} FME, de modo a proporcionarem uma deficiência grande (RL), ou ligeira (RM) e um ligeiro excesso (RH) de ERDP em relação ao nível objectivo (11 g ERDP MJ^{-1} FME) sugerido pelo sistema britânico (AFRC, 1993) para vacas em lactação.

O efeito do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, alcançado por alteração dos ingredientes da dieta, na ingestão voluntária, na produção e na composição do leite foi avaliado na Experiência 2. Assim, foram formuladas três dietas à base de silagem de milho, isoenergéticas, de igual relação g ERDP MJ^{-1} FME, mas com diferente relação entre os fornecimentos de proteína rápida (QDP) e lentamente degradável (SDP) no rúmen. A relação QDP/SDP foi manipulada utilizando, nos alimentos concentrados, ureia como fonte de QDP, em detrimento de bagaço de soja (0, 5 e 10 g ureia kg^{-1} alimento, para os tratamentos U0, U5 e U10, respectivamente).

Dado que a manipulação do sincronismo por alteração dos ingredientes da dieta pode dificultar a interpretação dos resultados, devido aos efeitos perturbadores dos próprios ingredientes da dieta e aos índices de sincronização, na Experiência 3 modificámos as disponibilidades de N e de energia no rúmen por alteração do padrão de fornecimento do componente proteico da dieta, ao longo do dia. Deste modo, foi, apenas, formulada uma dieta, constituída pelas seguintes matérias primas: silagem de milho, feno de azevém, concentrado energético e concentrado proteico. A sincronização das disponibilidades de ERDP e de FME no rúmen foi apenas modificada pelo modo de administração do suplemento proteico, tendo este sido distribuído uma vez ao dia, imediatamente antes da distribuição da dieta de base na refeição da manhã (D1), duas vezes ao dia, em duas refeições iguais, antes da distribuição da dieta de base (D2), ou como alimento completo, juntamente com a dieta de base (DU).

Para estudar os efeitos das diferentes estratégias de suplementação azotada no fluxo de proteína microbiana para o duodeno, recorremos à determinação da relação alantoína/creatinina (A/c), em amostras de urina obtidas a intervalos regulares. Fizemo-lo, apesar das suas limitações, por dificuldade da recolha da totalidade de urina excretada.

O CAPÍTULO 5 é dedicado ao segundo objectivo desta tese: o estudo do perfil em

ácidos gordos do leite de vaca como método não invasivo de diagnóstico da função ruminal. Para tal, utilizámos amostras de leite recolhidas nas três experiências descritas no CAPÍTULO 4. Conquanto o nosso enfoque inicial tenha sido o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite, ácidos que se crêem de origem microbiana e, deste modo, passíveis de reflectir os efeitos das diferentes dietas na fermentação ruminal, não deixámos de considerar, na avaliação que fizémos, o perfil em ácidos gordos de cadeia par.

As conclusões finais são apresentadas no CAPÍTULO 6. Pensamos que os resultados obtidos poderão ser um contributo para uma melhor utilização da fracção azotada da dieta da vaca leiteira e que o perfil em ácidos gordos do leite terá potencial como técnica não invasiva de diagnóstico da função ruminal, conquanto esta metodologia tenha, ainda, de ser validada em estudos futuros.

1.3. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Ao longo da realização desta tese fomos divulgando os resultados obtidos através de vários suportes:

Artigos em revistas internacionais indexadas:

- CABRITA, A.R.J., FONSECA, A.J.M., DEWHURST, R.J., SAMPAIO, C.V.P., MIRANDA, M.F.S., SOUSA, G.N.S., MIRANDA, I.M.F. e GOMES, E., 2003. Nitrogen supplementation of corn silages. 1. Effects on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science* (*in press*).
- CABRITA, A.R.J., FONSECA, A.J.M., DEWHURST, R.J. e GOMES, E., 2003. Nitrogen supplementation of corn silages. 2. Assessing rumen function using fatty acid profiles of bovine milk. *Journal of Dairy Science* (*in press*).

Comunicações/posters em congressos internacionais:

- CABRITA, A.R.J., FONSECA, A.J.M., DEWHURST, R.J. e GOMES, E., 2002. Nitrogen supplementation of maize silage-based diets offered to dairy cows: effects on odd-chain fatty acid profiles in milk. *Book of Summaries, Occasional Meeting, British Society of Animal Science, American Society of Animal Science and Mexican Society of Animal Science*, Mérida, Mexico, pp. 161-163.
- CABRITA, A.R.J., FONSECA, A.J.M., SAMPAIO, C., GOMES, E. e DEWHURST, R.J., 2001. Effects of the ratio of effective rumen degradable protein to fermentable metabolizable

energy on voluntary intake and milk yields of dairy cows. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, York, UK, p. 184.

- CABRITA, A.R.J., MIRANDA, I.M., FONSECA, A.J.M., SAMPAIO, C., GOMES, E. e DEWHURST, R.J., 2001. Production of dairy cows given diets with different ratios on quickly and slowly rumen degradable nitrogen. *Book of Abstracts Nº. 7, EAAP- 52nd Annual Meeting*, Budapest, Hungary, p. 117.

- SOUSA, G., CABRITA, A.R.J., FONSECA, A.J.M., MIRANDA, F., GOMES, E. e DEWHURST, R.J., 2001. Effects of synchronising the availability of fermentable energy and degradable nitrogen in the rumen on voluntary intake and milk yields of dairy cows. *Book of Abstracts Nº. 7, EAAP- 52nd Annual Meeting*, Budapest, Hungary, p. 117.

Comunicações e trabalhos de divulgação técnica:

- FONSECA, A.J.M. e CABRITA, A.R.J., 2001. Relação proteína degradável:energia fermentável em dietas de vacas leiteiras. *Livro de Comunicações e Resumos, Jornadas de Bovinicultura*, UTAD, Vila Real, pp. 16-28.

- FONSECA, A.J.M. e CABRITA, A.R.J., 2001. Suplementação azotada: princípios teóricos. *Acção de demonstração: Suplementação azotada de silagens de milho na alimentação da vaca leiteira*, Divisão de Leite e Lacticínios, Paços de Ferreira, 13 de Setembro de 2001.

- CABRITA, A.R.J., FONSECA, A.J.M., SAMPAIO, C., GOMES, E. e DEWHURST, R., 2001. Efeito da relação entre o azoto degradável e a energia fermentável no rúmen no desempenho produtivo de vacas leiteiras. *Acção de demonstração: Suplementação azotada de silagens de milho na alimentação da vaca leiteira*, Divisão de Leite e Lacticínios, Paços de Ferreira, 13 de Setembro de 2001.

- CABRITA, A.R.J., MIRANDA, I., FONSECA, A.J.M., SAMPAIO, C., GOMES, E. e DEWHURST, R., 2001. Produção de vacas leiteiras alimentadas com dietas com diferentes relações entre o azoto rápida e lentamente degradável no rúmen. *Acção de demonstração: Suplementação azotada de silagens de milho na alimentação da vaca leiteira*, Divisão de Leite e Lacticínios, Paços de Ferreira, 13 de Setembro de 2001.

- SOUSA, G., CABRITA, A.R.J., FONSECA, A.J.M., MIRANDA, M., GOMES, E. e DEWHURST, R., 2001. Efeito do sincronismo entre o fornecimento de energia fermentável e de azoto degradável no rúmen na produtividade de vacas leiteiras. *Acção*

de demonstração: Suplementação azotada de silagens de milho na alimentação da vaca leiteira, Divisão de Leite e Lacticínios, Paços de Ferreira, 13 de Setembro de 2001.

- FONSECA, A.J.M. e CABRITA, A.R.J., 2001. Suplementação azotada: que implicações práticas? *Acção de demonstração: Suplementação azotada de silagens de milho na alimentação da vaca leiteira*, Divisão de Leite e Lacticínios, Paços de Ferreira, 13 de Setembro de 2001.

PARTE I

Revisão Bibliográfica

"The intrinsic complexity of rumen metabolism, however, typified by the fluctuations in the numbers, types and activities of microorganisms that occur in response to nutrient supply, makes it extraordinarily difficult to construct effective models of this system" (ANNISON e BRYDEN, 1998).

CAPÍTULO 2

Nutrientes Azotados, Energéticos e Função Ruminal

2.1. INTRODUÇÃO

A maximização da produção de leite, em simultâneo com a eficiente utilização dos alimentos ingeridos, representa um dos objectivos principais da exploração da vaca leiteira em sistemas intensivos. Mas, para que isto aconteça, importa reconhecer que as vacas utilizam quantidades importantes de forragens, em geral conservadas, outros alimentos fibrosos, em geral com estrutura física, e alimentos concentrados.

Assim sendo, antes de mais, é necessário conhecer os valores nutritivo e produtivo das forragens que constituem a base da alimentação da vaca leiteira em cada sistema de exploração. Ou seja, para se formular um regime alimentar para uma dada situação de produção, é necessário conhecer-se, com o máximo rigor possível, pelo menos, o valor energético, o valor proteico e a ingestão voluntária das forragens de base com que se trabalha. Neste ponto, pode, numa primeira aproximação, nas regiões do Entre-Douro e Minho e da Beira Litoral, fazer-se a distinção entre sistemas de alimentação baseados em silagens de erva, dos baseados em silagens de milho, uma vez que estas forragens diferem, quer em termos de ingestão voluntária, quer de perfil de nutrientes e, consequentemente, condicionam as características nutricionais dos outros ingredientes a utilizar na dieta. Mas, é fundamental, depois, reconhecer que o valor nutritivo de forragens da mesma espécie e variedade varia muito, inclusivamente de exploração para exploração e entre anos de produção (CABRITA, 2000).

No que respeita a sistemas de produção de leite que fazem maioritariamente uso da

silagem de milho é bem conhecido que, sendo esta forragem rica em FME e deficitária em RDP, é à fracção azotada da dieta que, em geral, estão associadas as respostas mais positivas em termos de ingestão voluntária e de produção de leite. Todavia, as fontes proteicas constituem, actualmente, ingredientes caros da dieta e a ingestão em excesso de proteína está relacionada com a desnecessária poluição azotada do meio (TAMMINGA, 1992; FORSHELL, 1993; DOU *et al.*, 1996; TAMMINGA, 1996; WANG *et al.*, 1999; DEWHURST *et al.*, 2001; HAO *et al.*, 2002; KEBREAB *et al.*, 2002) e com problemas de fertilidade (JORDAN *et al.*, 1983; ROPSTAD e REFSDAL, 1987; CANFIELD *et al.*, 1990; ELROD *et al.*, 1993; LARSON *et al.*, 1997; BUTLER, 1998; MCCORMICK *et al.*, 1999; BUTLER, 2000; RAJALA-SCHULTZ *et al.*, 2001).

A preocupação com o impacto da produção animal na poluição azotada está bem patente nas directivas da União Europeia relativas, quer à protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola (91/676/CEE), quer à qualidade da água destinada ao consumo humano (98/83/CE), bem como nos documentos da comissão, no que concerne à redução das emissões de N_2O, com vista à implementação do protocolo de Quioto (COM(1998)353; COM(1999)230). Em Portugal estão delimitadas três regiões vulneráveis em termos de poluição com nitratos, estando duas delas situadas em duas importantes regiões leiteiras do país: o aquífero livre entre Esposende e Vila do Conde (área delimitada pelo rio Cávado, IC 1, o rio Ave e a orla costeira; PORTARIA 1037/97) e o aquífero quaternário de Aveiro (área delimitada pela EN 109, caminho de ferro Aveiro-Pampilhosa, IP 1 e caminho de ferro Sernada do Vouga-Aveiro até a EN 109; PORTARIA 1037/97). Daqui decorre que a formulação de regimes alimentares para a vaca leiteira tem de, cada vez mais, permitir a utilização eficiente do N ingerido, por forma a reduzir custos, a aumentar a produtividade e a minimizar o potencial poluente das explorações.

Os sistemas correntes de formulação de regimes alimentares para ruminantes (*e.g.*, INRA, 1988; AFRC, 1993; NRC, 2001) reconhecem a necessidade de, numa primeira fase, satisfazer as necessidades em N degradável dos microrganismos do rúmen e, posteriormente, satisfazer as necessidades em MP do ruminante, através da proteína microbiana que chega ao intestino delgado e do fornecimento de DUP na dieta. A maximização da utilização da fracção RDP e da sua conversão em proteína microbiana constitui um objectivo-chave da formulação de regimes alimentares e das estratégias de alimentação em animais ruminantes, uma vez que permite aumentar a eficiência de utilização dos ingredientes da dieta e, ao mesmo tempo, fornecer ao animal hospedeiro

aminoácidos essenciais e não essenciais (QUADRO 2.1) a um custo provavelmente inferior ao de quantidades equivalentes de DUP na dieta. Com efeito, a proteína microbiana tem elevada digestibilidade (TAS *et al.*, 1981; STORM e ØRSKOV, 1983; LARSEN *et al.*, 2001) e possui, quando comparada com as principais fontes proteicas de origem vegetal, superior valor biológico (QUADRO 2.2; SCHWAB, 1996; HVELPLUND *et al.*, 2001); porquanto o fornecimento, na dieta, de fontes de DUP deve ser, apenas, equacionado, enquanto opção complementar, como forma de colmatar o défice em aminoácidos da proteína microbiana e de aumentar o total de aminoácidos absorvidos no intestino delgado, nas situações de produção em que os aminoácidos de origem microbiana não satisfaçam as necessidades do animal.

Os sistemas supramencionados, apesar dos méritos e deméritos que lhes são inerentes, apresentam melhorias consideráveis em relação às propostas anteriores. Todavia, várias são as lacunas passíveis de serem identificadas e que, por não serem tidas em consideração, podem tornar a resposta animal observada bastante diferente da prevista. Obviamente, muitos dos processos que se desenrolam no rúmen e no organismo do animal não são, ainda conhecidos, mas outros há que, sendo-o, não se encontram, ainda,

QUADRO 2.1 – Composição em aminoácidos das bactérias do rúmen (g 100 g^{-1} aminoácido).

Aminoácido	Média	Mínimo	Máximo	dp†	CV‡
Arginina	5,1	3,8	6,8	0,7	13,2
Histidina	2,0	1,2	3,6	0,4	21,3
Isoleucina	5,7	4,6	6,7	0,4	7,4
Leucina	8,1	5,3	9,7	0,8	10,3
Lisina	7,9	4,9	9,5	0,9	11,9
Metionina	2,6	1,1	4,9	0,7	25,6
Fenilalanina	5,1	4,4	6,3	0,3	6,4
Treonina	5,8	5,0	7,8	0,5	8,9
Valina	6,2	4,7	7,6	0,6	10,1
Alanina	7,5	5,0	8,6	0,6	7,3
Ácido aspártico	12,2	10,9	13,5	0,6	4,8
Ácido glutâmico	13,1	11,6	14,4	0,7	5,3
Glicina	5,8	5,0	7,6	0,5	8,2
Prolina	3,7	2,4	5,3	0,5	13,2
Serina	4,6	3,4	5,4	0,4	8,9
Tirosina	4,9	3,9	7,7	0,6	13,2

†Desvio padrão; ‡Coeficiente de variação.
ADAPTADO DE CLARK *et al.* (1992).

QUADRO 2.2 – Composição em aminoácidos (g 100 g^{-1} aminoácidos com a cisteína e o triptofano excluídos) do leite de vaca, de bactérias ruminais associadas à fase líquida, de forragens e de alimentos concentrados.

	Observações	Histidina	Leucina	Lisina	Metionina	Fenilalanina
Leite	6	2,8	9,8	7,8	2,5	4,6
LAB	150	2,0	7,6	7,7	2,2	5,1
ERV	16	2,7	9,2	6,1	2,0	6,1
ST	9	2,4	9,5	5,3	2,1	5,7
SE	25	2,3	9,3	5,1	2,0	5,8
SM	9	2,1	10,6	3,8	2,1	5,6
Milho	100	3,1	12,8	3,1	2,2	5,0
Trigo	130	2,5	7,2	3,0	1,7	4,8
Cevada	110	2,4	7,5	3,9	1,8	5,4
BS	741	2,7	8,0	6,4	1,5	5,2
BG	465	2,7	7,0	3,9	2,5	5,0
BC	156	3,2	8,0	6,2	2,3	4,5
MD	6	3,2	11,7	2,8	2,3	4,9

LAB = Bactérias associadas à fase líquida, isoladas do rúmen de vacas leiteiras; ERV = erva verde; ST = silagem de trevo; SE = silagem de erva; SM = silagem de milho; BS = bagaço de soja; BG = bagaço de girassol; BC = bagaço de colza; MD = milho destilado.
ADAPTADO DE HVELPLUND *et al.* (2001).

incorporados nos sistemas correntes de expressão do valor nutritivo dos alimentos e das necessidades dos animais. No que respeita à função ruminal existem diversos factores que influenciam a fermentação e, consequentemente, o fluxo de proteína microbiana para o duodeno e que não são considerados de todo, ou são-no de forma incompleta, pelos sistemas de formulação em uso. Por isso, factores relacionados com a variação da disponibilidade de nutrientes azotados e energéticos serão, nas secções seguintes, discutidos individualmente, embora estejamos conscientes de que, sendo partes integrantes de um sistema, não podem, nunca, ser valorizados de forma isolada.

2.2. FORNECIMENTO DE AZOTO E DE ENERGIA AOS MICRORGANISMOS DO RÚMEN

Estabelecer a relação óptima entre a proteína/N e a energia da dieta para os animais ruminantes é difícil, porque existem dois tipos de necessidades a satisfazer: as da população microbiana e as do animal hospedeiro. Dada a importância da população microbiana na fermentação, quer de hidratos de carbono estruturais – compostos refractários às enzimas digestivas dos animais superiores –, quer de hidratos de carbono não estruturais (NSC), e na síntese de proteína a partir de fontes de N proteico e não

proteico, isto é, na cobertura em nutrientes energéticos (ácidos gordos voláteis; AGV) e em nutrientes azotados (aminoácidos) do animal ruminante, alimentar um ruminante é, antes de mais, alimentar a população microbiana do rúmen. Isto mesmo é assumido pelos sistemas de formulação cuja utilização tem mais expressão em Portugal e, provavelmente, no Mundo: INRA (1988), AFRC (1993) e NRC (2001). Estes sistemas são classificados de empíricos, pois consistem, essencialmente, na descrição de dados, ao contrário dos modelos mecanísticos que tentam fornecer uma descrição do sistema considerando as causas e os mecanismos presentes (BALDWIN *et al.*, 1987; DIJKSTRA *et al.*, 1992; DIJKSTRA, 1994; LESCOAT e SAUVANT, 1995; DIJKSTRA *et al.*, 1996) e dos modelos mistos (RUSSELL *et al.*, 1992; SNIFFEN *et al.*, 1992; O'CONNOR *et al.*, 1993; PITT *et al.*, 1996) que envolvem elementos empíricos e mecanísticos.

Embora estes sistemas (INRA, 1988; AFRC, 1993; NRC, 2001) apresentem alguns pressupostos comuns, tais como: (1) os micróbios do rúmen necessitam, para o seu crescimento, de N e de energia; (2) a fracção azotada da dieta pode dividir-se numa fracção degradável no rúmen e, por isso, disponível para os microrganismos, e noutra que, escapando à degradação, pode ser digerida no intestino delgado; e (3) a fracção da dieta que fornece energia aos microrganismos do rúmen tem origem na matéria orgânica (MO) fermentada no rúmen, não representado a energia das gorduras e dos produtos de fermentação uma fonte de energia para os micróbios; apresentam algumas diferenças entre si que vão para além da forma de expressão.

Em termos de energia disponível para os micróbios, apenas, o sistema do NRC (2001) toma em consideração a diminuição da digestibilidade dos alimentos com o nível de ingestão, incorporando um factor de desconto no cálculo do total de nutrientes digestíveis (TDN), e considera a contribuição da proteína para a energia fermentável. O INRA (1988) desconta, além da energia contida nas gorduras e nos produtos de fermentação, a proteína que escapa à fermentação no rúmen. Já no que respeita à fracção azotada dos alimentos, o AFRC (1993) divide a proteína alimentar em três fracções de diferente degradabilidade no rúmen: QDP, SDP e UDP, sendo as duas primeiras passíveis de utilização pelos micróbios e a última, após digestão e absorção, uma fonte de aminoácidos para o animal hospedeiro. Estas fracções são estimadas utilizando a técnica de incubação no rúmen de amostras de alimentos em sacos de *nylon* (ØRSKOV e MEHREZ, 1977), sendo a cinética da degradação descrita pelo modelo proposto por ØRSKOV e MCDONALD (1979): $p = a + b(1 - e^{-ct})$, onde, p = quantidade de substrato degradado no tempo t; a = fracção rapidamente solúvel; b =

fracção não solúvel, mas potencialmente degradável; e c = taxa de degradação da fracção b (FIGURA 2.1). Como o tempo de permanência do alimento no rúmen afecta a degradabilidade da fracção azotada, a degradabilidade efectiva (P) é estimada em função da taxa de passagem do digesta no rúmen (r; $P = a + (b \times c)/(c + r)$). A fracção QDP é calculada com base no parâmetro a, e a fracção SDP com base nos parâmetros b, c e r. O cálculo do teor em ERDP é feito considerando que a fracção QDP é utilizada para a síntese de proteína microbiana com uma eficiência de 80% e a fracção SDP com uma eficiência de 100%.

O sistema NRC (2001) calcula, também, a fracção RDP com base nos parâmetros da cinética da degradação das proteínas no rúmen, assumindo que as taxas de digestão e de passagem afectam unicamente a fracção b, e considera diferentes taxas de passagem no cálculo do fornecimento de proteína bruta (PB) por alimentos concentrados, por forragens frescas e por forragens desidratadas. Já o sistema proposto pelo INRA (1988), apesar de determinar a degradação da fracção azotada no rúmen pela técnica dos sacos de *nylon*, toma, apenas, em consideração a degradabilidade teórica das proteínas para uma taxa de passagem constante, de 6%; assumindo este sistema 90% como o valor máximo de eficiência de captura de amoníaco pelos micróbios do rúmen.

Todos os sistemas são unânimes no reconhecimento de que a quantidade de proteína microbiana que pode ser sintetizada no rúmen, assim como aquela que pode alcançar o intestino delgado, é determinada pelo nutriente – N ou energia – em défice na dieta. O sistema do INRA (1988) considera que a quantidade de proteína digestível no intestino de origem microbiana (PDIM) toma o valor de proteína digestível no intestino de

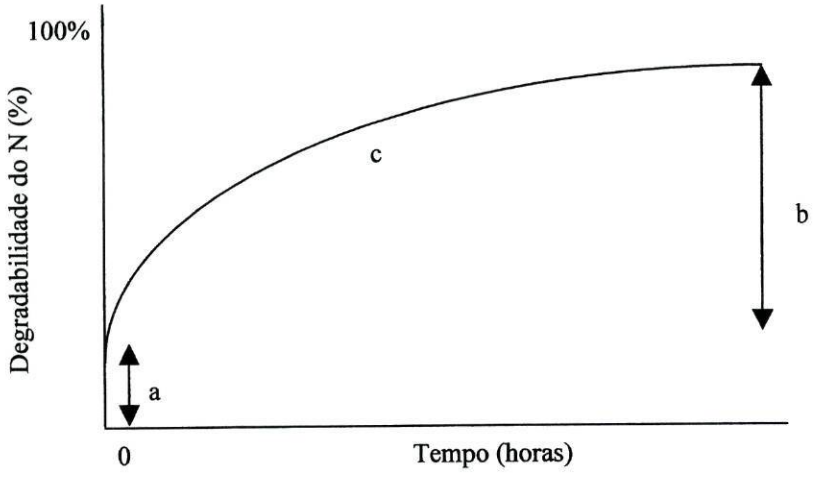


FIGURA 2.1 – Representação esquemática da cinética da degradação da fracção azotada dos alimentos no rúmen (a, b e c parâmetros do modelo de ØRSKOV e MCDONALD (1979); $p = a + b(1 - e^{-ct})$).

origem microbiana quando a quantidade de energia disponível no rúmen (MO fermentável) é limitante ao crescimento microbiano (PDIME), dispondo a população microbiana de suficiente N degradável, ou de proteína digestível no intestino de origem microbiana quando a disponibilidade de N degradável no rúmen é limitante ao crescimento microbiano (PDIMN), sendo suficiente a energia disponível. O AFRC (1993) entra, também, em linha de conta com o efeito do nível de ingestão no tempo de retenção das partículas no rúmen e, aquando do cálculo do fluxo de proteína microbiana para o duodeno, incorpora um factor de eficiência (y) que reflecte as diferentes taxas de passagem do digesta no rúmen, de acordo com o nível de ingestão dos animais. O sistema do NRC (2001) incorpora, igualmente, o efeito do nível de ingestão no cálculo da quantidade de proteína microbiana sintetizada no rúmen a partir do TDN e, aquando do cálculo da quantidade de proteína microbiana sintetizada no rúmen a partir do RDP ingerido, assume que a eficiência de síntese de proteína microbiana não excede os 85%.

Contudo, nenhum dos sistemas toma em consideração ou, pelo menos, quantifica os efeitos do fornecimento de diferentes fontes de N, de energia e as suas interacções na função ruminal, bem como os efeitos da reciclagem de N no e para o rúmen e as necessidades de manutenção dos microrganismos do rúmen, factores que podem alterar a eficiência de síntese de proteína microbiana e, consequentemente, a resposta produtiva dos animais.

2.3. NATUREZA DO SUBSTRATO AZOTADO

Os sistemas de alimentação supramencionados, apesar de considerarem a degradação das fracções azotadas no rúmen, não fazem a distinção entre fontes de N proteico e não proteico, nem têm em consideração as formas preferenciais de N dos microrganismos do rúmen. Ora, se o objectivo passa pela maximização da síntese de proteína microbiana no rúmen, temos de conhecer, antes de mais, a degradação e a utilização dos compostos azotados neste compartimento e as necessidades da população microbiana nestes nutrientes.

2.3.1. Degradação dos compostos azotados no rúmen

A degradação e o metabolismo do N no rúmen encontram-se representados de forma esquemática na FIGURA 2.2. Os compostos azotados proteicos e não proteicos de

origem alimentar e de origem endógena constituem um reservatório potencialmente fermentável pela população microbiana, estando a actividade proteolítica no rúmen associada às populações bacteriana, protozoária e fúngica (NUGENT e MANGAN, 1981; JOUANY, 1994). A incorporação directa de N na forma gasosa é, provavelmente, insignificante (HOBSON *et al.*, 1973).

A actividade proteolítica, embora óptima em condições de anaerobiose e de pH entre 6 e 7 (ERFLE *et al.*, 1982; JOUANY, 1994), depende, entre outros, do teor e da fonte de N disponível (MAHADEVAN *et al.*, 1980; HAZLEWOOD e EDWARDS, 1981; HAZLEWOOD *et al.*, 1981; GRISWOLD *et al.*, 1999; KIRK *et al.*, 2000; SALES *et al.*, 2000), aumentando, em geral, com o maior fornecimento de N solúvel ao rúmen (NUGENT e MANGAN, 1981; HAZLEWOOD *et al.*, 1983; WALLACE, 1983).

As bactérias proteolíticas representam 12 a 40% das bactérias do rúmen e pertencem aos principais géneros de bactérias sacarolíticas e amilolíticas: *Bacteroides, Prevotella, Butyrivibrio, Selenomonas, Eubacterium, Lachnospira* e *Streptococcus* (JOUANY, 1994). As bactérias desempenham um importante papel na degradação das proteínas solúveis, no entanto, a solubilidade de uma determinada proteína não é *per se* um indicador da resistência ou da susceptibilidade à hidrólise pelas proteases das bactérias do rúmen. MAHADEVAN *et al.* (1980), por exemplo, constataram que a albumina do soro e a

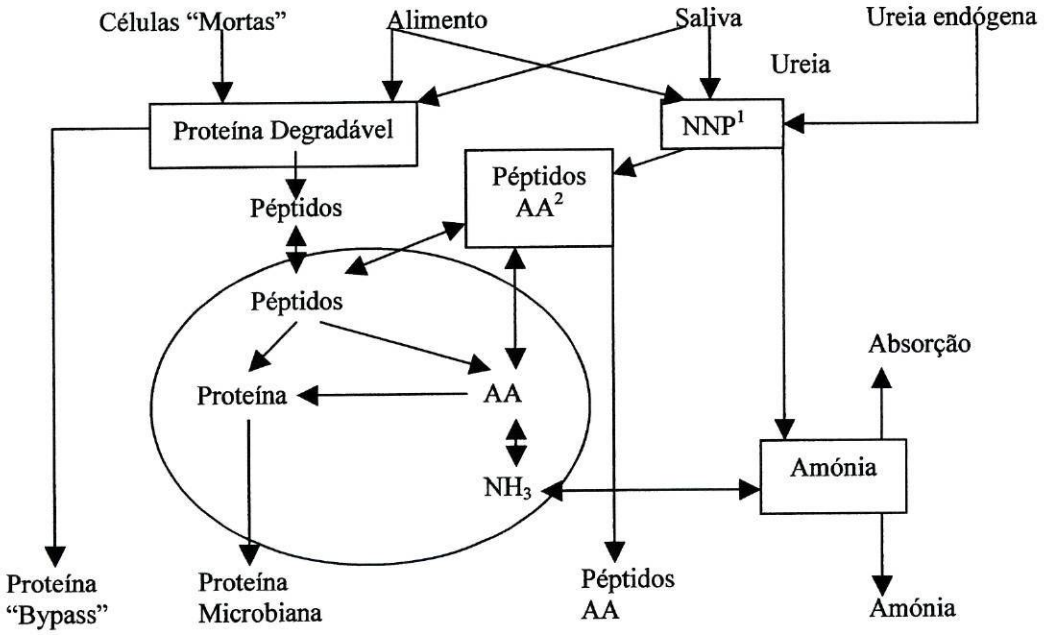


FIGURA 2.2 – Representação esquemática da degradação e do metabolismo dos compostos azotados no rúmen.
[1]Azoto não proteico; [2]Aminoácidos.
ADAPTADO DE NOLAN (1993).

ribonuclease A, embora solúveis, eram resistentes à hidrólise. HINO e RUSSELL (1987) verificaram, também, que a desaminação da caseína não foi afectada pelo tratamento térmico, apesar de este ter diminuído a sua solubilidade, e que, quer zeína tratada termicamente, quer bactérias mortas – fontes proteicas praticamente tão insolúveis como a caseína tratada com formaldeído – apresentaram elevadas taxas de desaminação (QUADRO 2.3). Resultados que suportam a opinião de que as baixas taxas de degradação das proteínas estão correlacionadas com a estrutura primária e secundária das proteínas e com a densidade das ligações disulfito, que podem ligar secções dentro de uma cadeia polipéptídica simples ou ligar duas cadeias diferentes (MAHADEVAN *et al.*, 1980).

A actividade proteolítica dos protozoários é maioritariamente do tipo leucina-aminopeptidase (PRINS *et al.*, 1983; USHIDA *et al.*, 1984; BIRD *et al.*, 1990), sendo as proteinases cisteína e, em menor extensão, aspárticas as maiores responsáveis pela proteólise em autolisados de protozoários ruminais, que apresentam elevada actividade aminopeptidase e baixa actividade desaminase em aminoácidos endógenos (FORSBERG *et al.*, 1984; NOLAN, 1993). Os protozoários holótricos actuam sobre fontes proteicas solúveis e não solúveis, degradando a proteína internamente, enquanto os entodiniomorfos parecem degradar proteínas insolúveis associadas às partículas (USHIDA *et al.*, 1984; BIRD *et al.*, 1990). Este grupo de protozoários, apesar de possuir baixa actividade sobre as proteínas

QUADRO 2.3 – Desaminação *in vitro* de várias fontes proteicas por bactérias e por protozoários[1] ruminais.

		Desaminação, μg N-NH_3 mg^{-1} proteína[2]		N não amoniacal e não proteico, N mg^{-1} proteína[2]	
Fonte proteicas[3]	S, %[4]	Bactérias	Protozoários	Bactérias	Protozoários
Tripticase	100	$810,4^{a}$	$36,5^{a}$		
Caseína	90	$639,7^{b}$	$40,5^{a}$	$45,5^{a}$	$110,2^{a}$
Caseína tratada termicamente	36	$590,7^{b}$	$58,6^{b}$	$39,3^{a}$	$155,2^{b}$
Caseína tratada com formaldeído	6	$73,5^{c}$	$13,0^{c}$	$7,2^{b}$	$21,6^{c}$
Proteína de soja tratada termicamente	28	$909,9^{d}$	$73,7^{b}$	$40,8^{a}$	$203,0^{d}$
Zeína tratada termicamente	8	$110,5^{c,e}$	$16,2^{c}$	$8,7^{b}$	$27,5^{c}$
Bactérias mortas	6	$183,8^{e}$	$97,2^{d}$	$25,2^{c}$	$54,4^{c}$
EPM[†]		18,73	3,26	2,24	7,31

[1]Separados por sedimentação e centrifugação;
[2]As bactérias (439 mg proteína l^{-1}) e os protozoários (840 mg proteína l^{-1}) foram incubados durante 15 horas;
[3]Cada fonte foi fornecida a 5 g l^{-1};
[4]Solubilidade em solução de sal após agitação a 39 °C durante 15 horas;
[a, b, c, d, e]Médias na mesma coluna com diferentes notações são significativamente diferentes ($P<0,05$).
[†]Erro padrão da média.
ADAPTADO DE HINO e RUSSELL (1987).

solúveis, é, provavelmente, o principal responsável pela digestão das bactérias e dos cloroplastos (HINO e RUSSELL, 1987). A absorção de substâncias azotadas pelos protozoários pode permitir a libertação mais lenta dos produtos de fermentação e o menor catabolismo dos aminoácidos/péptidos a amoníaco e a AGV (RUSSELL e HESPELL, 1981).

Os fungos ficomicetas anaérobios constituem outra pequena biomassa com elevada actividade proteolítica (NOLAN, 1993). As proteases fúngicas estão, provavelmente, ligadas à célula durante o início do crescimento, mas tornam-se extracelulares à medida que a taxa de crescimento diminui (WALLACE e JOBLIN, 1985), localizando-se no micélio e situando-se a sua acção, provavelmente, ao nível da parede celular das partículas alimentares (JOUANY, 1994). MICHEL *et al.* (1993), ao estudarem sete estirpes representativas da população fúngica do rúmen, observaram que a actividade proteolítica é extracelular, sendo encontrada, quer no sobrenadante da cultura, quer ligada ao micélio. Estes autores não detectaram actividade carboxipeptidase em nenhuma das estirpes e todas apresentaram actividade aminopeptidase. A actividade proteolítica dos fungos parece, porém, variar entre as estirpes (YANKE *et al.*, 1993).

2.3.2. Utilização dos compostos azotados no rúmen

A degradação das proteínas pelos microrganismos proteolíticos conduz à libertação de péptidos no fluído ruminal que são, de seguida, degradados, em extensão variável, a péptidos mais pequenos, a aminoácidos, a amoníaco e a AGV (FIGURA 2.2). Mas, os micróbios do rúmen utilizam os péptidos mais rapidamente do que os aminoácidos livres e incorporam-nos nas suas proteínas de modo mais eficaz, devido, provavelmente, a um menor custo energético associado ao transporte de péptidos através da membrana celular quando comparado com o dos aminoácidos livres, cuja concentração no fluído ruminal é, geralmente, reduzida (JOUANY, 1994).

Ainda que seja conhecido que as bactérias ruminais possuem sistemas de transporte de aminoácidos (RUSSELL *et al.*, 1988; CHEN e RUSSELL, 1989a, 1989b e 1990; STROBEL e RUSSELL, 1991; VAN KESSEL e RUSSELL, 1992; MARTIN, 1994), a sua importância, em termos quantitativos, em relação à de pequenos péptidos é ainda desconhecida, estando a taxa de assimilação de aminoácidos e de péptidos dependente da estirpe bacteriana. O *Bacteroides ruminicola*, por exemplo, hidrolisa activamente proteínas, mas a maioria dos aminoácidos livres não penetram na célula, uma vez que esta bactéria absorve péptidos

libertados durante a hidrólise, degradando-os, depois, intracelularmente (CHEN *et al.*, 1987a). Já LING e ARMSTEAD (1995) verificaram que, ao contrário da *Prevotella ruminicola* B_14, o *Streptococcus bovis* JB1, o *Selenomonas ruminantium* Z108, o *Fibrobacter succinogenes* S85 e o *Anaerovibrio lipolytica* 5S assimilam mais rapidamente aminoácidos do que péptidos.

O mecanismo predominante de degradação dos péptidos é bifásico, via dipeptidil peptidases que quebram dipéptidos a partir do N terminal de péptidos mais longos, seguida pela acção de dipeptidases (DEPARDON *et al.*, 1995; WALLACE, 1996), sendo os péptidos bloqueados com glicina ou prolina no N terminal ou no penúltimo N, mais lentamente degradados (WALLACE, 1996).

Mas, dado existir evidência experimental de que os péptidos podem acumular-se no rúmen durante a hidrólise de proteínas rapidamente degradáveis (BRODERICK *et al.*, 1988; BRODERICK e CRAIG, 1989), que a assimilação de péptidos pelas bactérias é superior à sua libertação durante a hidrólise de proteínas de baixa degradabilidade e de que as bactérias têm capacidade para absorver péptidos de cadeia longa (WESTLAKE e MACKIE, 1990), parece provável que a natureza da sequência de aminoácidos no péptido seja mais importante do que o comprimento da cadeia *per se* (HINO e RUSSELL, 1987; GRISWOLD e MACKIE, 1997), sendo, neste caso, a hidrólise e a captura dos péptidos a etapa limitante da proteólise (RUSSELL *et al.*, 1983; CHEN *et al.*, 1987a e 1987b; BRODERICK e WALLACE, 1988; BRODERICK e CRAIG, 1989). Todavia, alguns estudos demonstraram que a degradação da fracção azotada diminui com o aumento da concentração de péptidos no rúmen (COTTA e HESPELL, 1986; BRODERICK e CRAIG, 1989) e que os péptidos hidrófobos são mais resistentes à degradação do que os hidrofílicos (DEPARDON *et al.*, 1996), sugerindo que a formação e o metabolismo dos péptidos extracelulares são importantes no controlo da taxa de degradação das proteínas pelos microrganismos do rúmen (BRODERICK e CRAIG, 1989).

A desaminação dos aminoácidos é levada a cabo por uma combinação de bactérias de baixa actividade, de protozoários e de um número muito mais pequeno de espécies de bactérias de maior actividade (WALLACE, 1996). A maioria das espécies de protozoários desaminam os aminoácidos e excretam amoníaco como produto final (NOLAN, 1993; JOUANY, 1994), produzindo, também, AGV e outros produtos resultantes do metabolismo de alguns aminoácidos (JOUANY, 1994).

Mas, uma vez que nem todos os aminoácidos são degradados por todas as estirpes de bactérias e que a degradação ocorre a taxas diferentes, a degradação dos aminoácidos no rúmen resulta certamente de fenómenos de interacção bacteriana. SCHEIFINGER *et al.* (1976) verificaram que as bactérias dos géneros *Megasphaera*, *Eubacterium* e *Streptococcus* 19D degradaram os aminoácidos neutros (glicina, valina, leucina, isoleucina, serina e treonina), básicos (histidina, arginina e lisina), ácidos (aspartato e glutamato), aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e sulfurados (metionina); que os membros do género *Butyrivibrio* degradaram totalmente a serina, o aspartato e o glutamato, sendo a glicina o único aminoácido não desaminado; que o *Selenomonas lactilytica* degradou todos os aminoácidos, excepto a histidina e a tirosina; e que o *Selenomonas ruminantium* não degradou a glicina, a leucina, a isoleucina, a treonina, a histidina, a arginina, a lisina, o triptofano e a tirosina. Os resultados deste estudo mostram que os aminoácidos neutros e ácidos são os mais utilizados, sendo a utilização dos primeiros, provavelmente, reflexo da desaminação para formar ácidos gordos de cadeia simples e ramificada necessários como factores de crescimento para algumas bactérias; e que os aminoácidos ácidos podem economizar substratos carbonados, normalmente utilizados para a síntese de glutamato e de aspartato ou representarem uma fonte de energia. Mais recentemente, VELLE *et al.* (1997) demonstraram que os aminoácidos lisina e metionina escapam mais à fermentação no rúmen, o que é particularmente importante, dado serem os aminoácidos limitantes primários da proteína microbiana.

Apenas uma pequena proporção dos aminoácidos é incorporada intacta na proteína microbiana, pelo que a síntese *de novo* de aminoácidos pelos microrganismos do rúmen a partir do amoníaco constitui uma actividade importante, apesar desta diminuir com o aumento das concentrações de péptidos no meio (ATASOGLU *et al.*, 1998 e 2001).

O amoníaco pode atravessar as membranas celulares das bactérias por difusão passiva, mas em condições de pH neutro ou ácido no rúmen, a maior parte do amoníaco está presente na forma ionizada (amónia) que não deve ser permeável às membranas celulares (RUSSELL *et al.*, 1990). Todavia, a amónia pode ser assimilada pelas bactérias do rúmen por dois sistemas diferentes (MACKIE e WHITE, 1990; FIGURA 2.3): o sistema da glutamato desidrogenase (GDH) e o sistema da glutamina sintetase (GS) e do glutamato sintase (GOGAT). No primeiro sistema ocorre a aminação do α-cetoglutarato em glutamato, dando-se, de seguida, a síntese de alanina e de aspartato que, provavelmente, e, em conjunto com o glutamato, se acumulam inicialmente na forma livre. Os grupos amina

são, posteriormente, transferidos para esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos que, juntamente com compostos pré-formados, são utilizados na síntese de proteínas e de ácidos nucleicos e para outros fins (SMITH, 1979). No segundo sistema, a GS utiliza ATP na reacção da amónia e do glutamato para formar a glutamina, e a GOGAT é responsável pela transaminação do grupo amida da glutamina para o α-cetoglutarato para formar duas moles de glutamato (ERFLE *et al.*, 1977).

Quando as bactérias ruminais crescem sob limitação de N e as concentrações intracelulares de amónia são inferiores a 0,5 mM, estas utilizam o sistema, de elevada afinidade, de duas etapas da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) que, apesar de ser dependente de energia, é útil no captura de amónia quando os níveis deste composto são baixos no meio, podendo, no entanto, o custo de assimilação reduzir a eficiência de crescimento microbiano (SCHAEFER *et al.*, 1980). O sistema GDH que, provavelmente, predomina nas condições normais de produção, é um sistema de inferior afinidade, mas é reversível (MACKIE e WHITE, 1990; RUSSELL *et al.*, 1990). Nas bactérias *Ruminococcus flavefaciens* e *Prevotella ruminicola* a via GDH parece ser a rota predominante de assimilação de amónia independentemente da sua concentração no meio, sendo a actividade da GDH, na *Prevotella ruminicola*, modulada por péptidos (MORRISON e MACKIE, 1996; MORRISON, 2000). Note-se, finalmente, que foi demonstrada a existência de assimilação de amónia pela via da alanina desidrogenase, dependente de NADP, e pela via da aspartato desidrogenase nalguns microrganismos anaeróbios do rúmen (WALLACE, 1979) e que nos fungos filamentosos o amoníaco pode entrar na célula na forma ionizada e

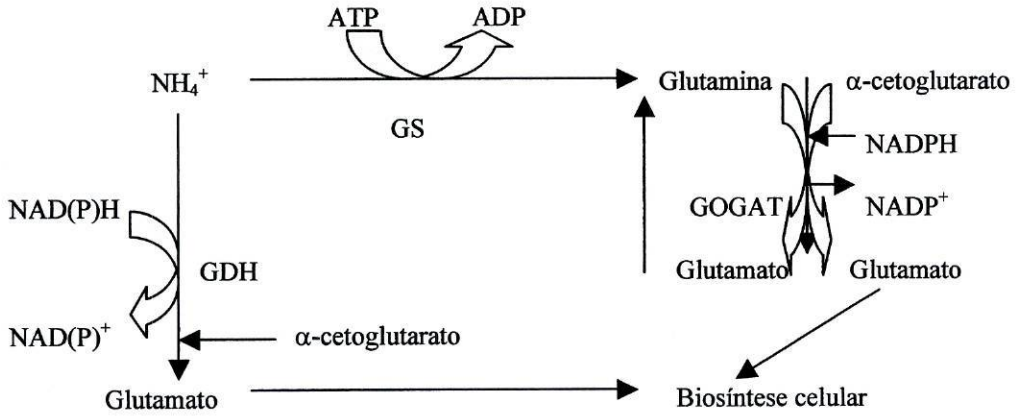


FIGURA 2.3 – Vias predominantes de assimilação de amónia pelas bactérias do rúmen.
GDH = Glutamato desidrogenase;
GS = Glutamina sintetase;
GOGAT = Glutamato sintase.
ADAPTADO DE MACKIE e WHITE (1990).

não ionizada, parecendo que o transporte de amónia está sob controlo metabólico e que aumenta grandemente com a deficiência em N (HACKETTE *et al.*, 1970).

Contudo, a mera presença nas bactérias do rúmen de enzimas de assimilação de amónia não constitui evidência suficiente de que estes dois sistemas estão operacionais. Com efeito, os factos do amoníaco, devido à sua natureza lipofílica, poder difundir-se passivamente através das membranas celulares e da maior parte do amoníaco, a pH do rúmen neutro ou ácido, estar na forma de amónia que requer transporte activo para atravessar a membrana celular torna esta questão paradoxal (MACKIE e WHITE, 1990). Por outro lado, a captura da amónia pelos microrganismos segue a cinética enzimática que pode ser representada por uma hipérbole rectangular ou pela equação de Monod (MONOD, 1942 citado por DIJSKTRA *et al.*, 1998). BALDWIN e KOONG (1980) obtiveram, por exemplo, em ovelhas alimentadas com dietas semi-purificadas contendo diferentes quantidades de ureia, respostas tipo saturação à concentração de amoníaco no rúmen (mmol l^{-1}), quer da máxima taxa de crescimento fraccional (h^{-1}), quer do máximo rendimento de crescimento (g proteína microbiana kg^{-1} MO verdadeiramente fermentada no rúmen). Mas, ao contrário deste comportamento tipo saturação, a síntese de proteína microbiana nos sistemas empíricos é, normalmente, calculada de um modo descontínuo, isto é, a quantidade de proteína microbiana que pode ser sintetizada assume o menor valor da síntese potencial em função da MO ou da energia fermentável e do N degradável no rúmen, o que pode desfasar as necessidades de N degradável na dieta do valor estimado segundo os sistemas de formulação.

Além disso, a interpretação deste aspecto é, ainda, dificultada pelo facto da população bacteriana acumular, certamente, uma reserva lábil de N para utilizar em períodos de flutuação de disponibilidade deste nutriente, existindo evidência de que, quando a concentração externa de amónia diminui, a eficiência de incorporação de amónia na reserva microbiana aumenta (SMITH, 1979).

2.3.3. Necessidades dos microrganismos em azoto

No QUADRO 2.4 apresentam-se os microrganismos predominantes no rúmen, bem como os substratos que preferencialmente utilizam, os produtos finais da fermentação e as suas necessidades em nutrientes. Ao analisar o quadro ressalta o facto do amoníaco ser um nutriente para muitas espécies de bactérias. Com efeito, BRYANT (1961; citado por

CHALUPA, 1968), ao estudar as necessidades de 44 estirpes de bactérias ruminais, verificou que 40% podem crescer com amoníaco como única fonte de N, 26% não crescem na ausência de amoníaco e 55% podem utilizar amoníaco ou N de aminoácidos, sendo o amoníaco a única fonte de N de três das espécies que, provavelmente, mais contribuem para a actividade celulolítica no rúmen: o *Ruminococcus albus*, o *Ruminococcus flavefaciens* e o *Fibrobacter succinogenes* (NOLAN, 1993).

Assim sendo, importa definir a concentração de amoníaco no rúmen necessária para permitir o máximo crescimento microbiano. SATTER e SLYTER (1974), em trabalho pioneiro, utilizando um sistema de fermentação *in vitro* (fermentador contínuo), estabeleceram que a máxima síntese de proteína microbiana é atingida com cerca de 2 mg N amoniacal 100 ml^{-1} fluído ruminal e recomendaram, já com margem de segurança, 5 mg N amoniacal 100 ml^{-1} como limite máximo; resultados que foram confirmados, *in vivo*, por ROFFLER *et al.* (1976). Todavia, MEHREZ e ØRSKOV (1976) mostraram que podem ser necessárias concentrações superiores a 5 mg N amoniacal 100 ml^{-1} fluído ruminal para que a máxima digestão da energia seja alcançada, pois em estudo efectuado com cevada, os valores de digestão por eles observados foram de 95, 85, 75 e 50% do máximo, respectivamente, para concentrações ruminais de N amoniacal de 23,8, 18,6, 14,6 e 7 mg 100 ml^{-1}. KEMPTON *et al.* (1977) referem, também, que concentrações de N amoniacal no rúmen inferiores a 8 mg 100 ml^{-1} podem ser insuficientes para maximizar o crescimento microbiano, em particular, quanto mais rápida for a velocidade de fermentação. HA e KENNELLY (1984) observaram que a síntese de proteína microbiana máxima foi obtida com uma concentração de N amoniacal de 6 mg 100 ml^{-1} fluído ruminal e EDWARDS e BARTLEY (1979), num estudo *in vitro*, obtiveram a máxima produção de proteína microbiana quando a concentração de N amoniacal foi de 76 mg 100 ml^{-1}.

Os resultados supramencionados, sendo contraditórios, mostram que não existe, provavelmente, uma concentração única de amoníaco no rúmen óptima que permita maximizar o crescimento microbiano em todas as situações de produção. SMITH (1979) propõe, como explicação para a obtenção de resposta positiva a concentrações de N amoniacal superiores a 5 mg 100 ml^{-1} fluído ruminal, que algum amoníaco, antes de ser utilizado pelos microrganismos para o seu crescimento, pode permanecer no rúmen sem ser absorvido ou desperdiçado. ØRSKOV (1982) refere que concentrações de N amoniacal na interface, apesar de poderem ser idênticas, podem ter origem em diferentes teores em N amoniacal. Não esquecer, também, que o valor de 5 mg N amoniacal 100 ml^{-1} fluído

QUADRO 2.4 – Microrganismos predominantes no rúmen, seus substratos secundários, produtos da sua fermentação em culturas mistas e suas necessidades em nutrientes.

Espécies microbianas	% dos isolados totais	Substratos secundários[a]	Prod. em culturas mistas[b]	Necessidades em nutrientes[c]
(Holo)celulolíticas				
Bacteroides succinogenes	5 a 9	ST, P	A, P_s, CO_2	AGV, V, NH_3, Biotina, PAB
Ruminococcus albus	3 a 5		A, H_2, CO_2	AGV, NH_3, Biotina, PAB
Ruminococcus flavefaciens	3 a5		A, P_s, H_2, CO_2	AGV, NH_3, Biotina, PAB
Amilo e dextrinolíticos				
Bacteroides amylophilus	1 a 10	P, SR	A, P_s, CO_2	NH_3
Streptococcus bovis	0 a 20	SS, PR	A, L, $CO_2(H_2)$	AA, Biotina
Succinimonas amylolitica	1 a 3		A, P_s, CO_2	AGV
Succinivibrio dextrinosolvens	1 a 13	P	A, P_s, L, CO_2 (H_2)	AA
Sacarolíticos				
Bacteroides ruminicola	10 a 19	ST, P, PR	A, P, $CO_2(H_2)$	AGV
Butyrivibrio fibrosolvens	8 a 12	C, ST, PR	A, B, L, $CO_2(H_2)$	AGV, NH_3, AA, Biotina, Ácido fólico, Piridoxal
Megasphaera elsdenii	0 a 1	L, PR	A, P, B, V, H_2, CO_2	AA
Selenomonas ruminantium	4 a 12	ST, L	A, P, L, H_2, CO_2	AGV, Met
Utilizadores de hidrogénio				
Methanobrevibacter ruminantium	<1		CH_4	AGV, NH_3
Vibrio succinogenes	0		P_S, NH_3	NH_3
Protozoários				
Isotricha, Epidinium, Diplodinium sp.		ST, SS	A, B, L, H_2, CO_2	
Dasytricha, Diplodinium sp.		ST, SS	A, B, L, H_2, CO_2	(Células bacterianas)
Entodinum sp.		ST	A, P, B, L, $CO_2(H_2)$	

[a]C = holocelulose; ST = amido; SS = açúcares solúveis; P = pectinas; PR = proteínas; L = lactato;

[b]A = acetato; P = propionato; B = butirato; V = valerato e ácidos gordos de cadeia longa; L = lactato; H_2, CO_2 = indica que o organismo possui hidrogenase e produz hidrogénio; $CO_2(H_2)$ = microrganismo produz formato que é convertido em CO_2 + H_2 por outro organismo; P_S = succinato que é convertido em propionato e CO_2 por outros organismos em cultura mista;

[c]AGV = ácidos gordos voláteis C_4-C_5 (cadeia ramificada); V = valerato; AA = aminoácidos; Met = metionina; PAB = para-aminobenzoato.

ADAPTADO DE BALDWIN e ALLISON (1983).

ruminal é um valor médio, o que significa que, em determinadas situações, pode ser inferior e não permitir maximizar o crescimento microbiano. Além disso, segundo GOMES (2001), admitir que as necessidades em N da população microbiana são satisfeitas quando a concentração em N amoniacal no rúmen se situa acima de um determinado valor, que permite optimizar o crescimento microbiano, é uma interpretação redutora porque não tem em consideração as alterações que podem ocorrer com concentrações em N amoniacal mais elevadas, nomeadamente na taxa de degradação, na digestibilidade e na ingestão de alimento fibroso.

Nesta matéria, ERDMAN *et al.* (1986) determinaram a degradabilidade *in sacco* de amostras de glúten de milho, de bagaço de soja, de bagaço de algodão, de *corn gluten feed* e de feno de luzerna, em três vacas *Holstein* não lactantes alimentadas com uma dieta com baixo teor em proteína de baixa solubilidade e com quatro níveis de infusão de ureia (0, 33, 67 e 100 g dia^{-1}) por forma a obter diferentes concentrações de N amoniacal no rúmen (4,3, 10,1, 17,2 e 25 mg 100 ml^{-1}, respectivamente) e verificaram que a máxima digestão da matéria seca (MS) do bagaço de algodão e do *corn gluten feed* ocorreu para a concentração de N amoniacal de 17,2 mg 100 ml^{-1} e a do glúten de milho e do bagaço de soja para a concentração de 25 mg 100 ml^{-1}. Estes autores concluíram que a concentração de N amoniacal necessária para a digestão máxima depende da taxa de fermentação da dieta ou do alimento no rúmen. Já ROFFLER e SATTER (1975), ao analisarem dados de 35 ensaios com um total de 211 vacas e 1033 recolhas de amostras de conteúdo ruminal, verificaram que a concentração de N amoniacal no rúmen estava relacionada com os teores em PB e em TDN na dieta ($N\text{-}NH_3$ (mg 100 ml^{-1}) = 3,873 – 3,04 PB (%) + 0,171 PB $(\%)^2$ – 0,49 TDN (%) + 0,0024 TDN $(\%)^2$; r^2 = 0,92), o que sugere que a concentração de N amoniacal no rúmen capaz de maximizar a síntese de proteína microbiana depende da energia fermentável disponível.

O QUADRO 2.4 mostra, também, que alguns microrganismos requerem aminoácidos como factores de crescimento e vários estudos demonstram que, apesar de alguns microrganismos do rúmen poderem crescer na ausência de proteína verdadeira, muitas bactérias preferem aminoácidos pré-formados (BRYANT e ROBINSON, 1962; HUNGATE *et al.*, 1964; JENSEN e PEDERSEN, 1990) e que a presença de aminoácidos no meio estimula o crescimento microbiano (MAENG e BALDWIN, 1976a e 1976b; ARGYLE e BALDWIN, 1989), a taxa de crescimento (VAN KESSEL e RUSSELL, 1996) e a eficiência de crescimento (MAENG *et al.*, 1976; COTTA e RUSSELL, 1982; ARGYLE e BALDWIN, 1989), bem como que

aumenta a digestão das paredes celulares, a produção total de AGV e as percentagens molares de isobutirato, de isovalerato e de valerato (GRISWOLD *et al.*, 1996). Por outro lado, foi, também, demonstrado que o crescimento dos fungos é estimulado pela presença de aminoácidos, embora estes possam crescer em meio contendo, apenas, sulfato de amónia (ONODA *et al.*, 1996).

Todavia, BRYANT (1973) refere que nenhuma das bactérias celulolíticas de maior importância, como o *Ruminococcus albus*, o *Ruminococcus flavefaciens*, o *Bacteroides succinogenes* e o *Butyrivibrio fibrisolvens* requerem aminoácidos, como fonte de N, para o seu crescimento. Já os resultados de COTTA e RUSSELL (1982) sugerem que os aminoácidos são convertidos em proteína bacteriana de forma mais eficiente quando as concentrações são inferiores a 0,031 g l^{-1} e que as concentrações de proteína na dieta, necessárias para maximizar a síntese de proteína bacteriana no rúmen, podem não estar associadas à utilização mais eficiente da proteína da dieta pelo animal. Com efeito, DEVANT *et al.* (2001) observaram, em fermentador contínuo, que a produção de AGV foi superior quando a fonte de N foi constituída por bagaço de soja do que quando foi constituída por ureia, tendo, porém, a eficiência de síntese de proteína microbiana aumentado com a substituição de parte do N de bagaço de soja por N de ureia.

A discussão realizada permite concluir que o crescimento microbiano é estimulado pela presença de aminoácidos no meio, existindo, porém, evidência experimental de que a estimulação do crescimento bacteriano é superior com misturas de aminoácidos do que com aminoácidos específicos (MAENG *et al.*, 1976; ARGYLE e BALDWIN, 1989). KAJIKAWA *et al.* (2002) realizaram um estudo com o objectivo de determinar quais dos 20 aminoácidos normalmente presentes nas proteínas (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) estimulam, inibem ou são essenciais ao crescimento microbiano (QUADRO 2.5).

A taxa e a eficiência de crescimento (g bactéria g^{-1} açúcares) aumentaram respectivamente, 46 e 15%, quando a mistura de 20 aminoácidos foi adicionada ao meio de cultura. No entanto, estes parâmetros não aumentaram quando qualquer destes aminoácidos foi adicionado individualmente, com excepção do ácido glutâmico e da glutamina que produziram pequenas melhorias significativas. O efeito estimulante da mistura de aminoácidos no crescimento microbiano diminuiu quando cada um dos aminoácidos leucina, triptofano, tirosina, ácido glutâmico, metionina, fenilalanina e valina

QUADRO 2.5 – Efeitos da adição e da remoção de aminoácidos individuais na taxa de crescimento e na eficiência de crescimento de bactérias ruminais em cultura mista.

	Adição		Remoção[1]		Adição		Remoção	
	Taxa de crescimento		Taxa de crescimento		Eficiência de crescimento[2]		Eficiência de crescimento	
Fonte de N	Actual (h^{-1})	%[3]	Actual (h^{-1})	%[3]	Actual ($g\ g^{-1}$)	%[3]	Actual ($g\ g^{-1}$)	%[3]
NH_3	0,272	100	$0,284^{B}$	100^{B}	0,222	100	$0,227^{B}$	100^{B}
20 AA	$0,393^{A}$	146^{A}	$0,406^{A}$	143^{A}	$0,255^{A}$	115^{A}	$0,261^{A}$	115^{A}
Alanina	0,265	97	$0,405^{A}$	144^{A}	0,217	98	$0,256^{A}$	113^{A}
Arginina	0,274	100	$0,409^{A}$	146^{A}	0,218	98	$0,262^{A}$	116^{A}
Asparagina	0,269	99	$0,410^{A}$	146^{A}	0,217	98	$0,257^{A}$	113^{A}
Ácido aspártico	0,262	97	$0,385^{A}$	137^{A}	0,218	98	$0,260^{A}$	114^{A}
Cisteína	$0,189^{-A}$	70^{-A}	$0,389^{A}$	139^{A}	$0,193^{-A}$	87^{-A}	$0,255^{A}$	112^{A}
Ácido glutâmico	0,306	112^{A}	$0,311^{B}$	111^{B}	0,221	100	$0,225^{B}$	99^{B}
Glutamina	0,305	112^{A}	$0,411^{A}$	146^{A}	0,219	99	$0,259^{A}$	114^{A}
Glicina	0,268	99	$0,397^{A}$	141^{A}	0,217	98	$0,259^{A}$	114^{A}
Histidina	0,260	96	$0,390^{A}$	139^{A}	0,220	99	$0,251^{A}$	111^{A}
Isoleucina	$0,147^{-A}$	55^{-A}	$0,400^{A}$	141^{A}	$0,170^{-A}$	77^{-A}	$0,250^{A}$	110^{A}
Leucina	$0,228^{-A}$	84^{-A}	$0,267^{B}$	94^{B}	$0,195^{-A}$	88^{-A}	$0,212^{B}$	93^{-aB}
Lisina	0,245	90^{-A}	$0,404^{A}$	144^{A}	$0,209^{-a}$	95^{-a}	$0,252^{A}$	111^{A}
Metionina	0,272	100	$0,342^{AB}$	121^{AB}	0,214	97	$0,240^{aB}$	106^{aB}
Fenilalanina	$0,219^{-A}$	81^{-A}	$0,343^{AB}$	121^{AB}	$0,199^{-A}$	90^{-A}	$0,245^{Ab}$	108^{Ab}
Prolina	0,284	105	$0,405^{A}$	144^{A}	0,215	97	$0,258^{A}$	114^{A}
Serina	0,286	105	$0,404^{A}$	144^{A}	0,213	96	$0,257^{A}$	113^{A}
Treonina	$0,188^{-A}$	70^{-A}	$0,385^{A}$	137^{A}	$0,187^{-A}$	84^{-A}	$0,260^{A}$	114^{A}
Triptófano	0,267	98	$0,302^{B}$	108^{B}	0,219	99	$0,211^{-aB}$	93^{-aB}
Tirosina	0,262	97	$0,293^{B}$	104^{B}	0,231	104	$0,219^{B}$	96^{B}
Valina	0,254	94^{-A}	$0,350^{AB}$	123^{AB}	0,211	95^{-a}	$0,236^{B}$	104^{B}
EPM†	0,014	2	0,010	5	0,004	2	0,006	2

[a,A]Significativamente diferentes do tratamento contendo apenas amoníaco (NH_3) ($P<0,05$ e 0,01, respectivamente). (-) efeito negativo. Para a adição todos os valores, excepto o tratamento com os 20 aminoácidos (AA), são significativamente diferentes ($P<0,01$) do tratamento com os 20 AA ($P<0,05$ e 0,01, respectivamente);
[b,B]Significativamente diferentes do tratamento com os 20 AA;
[1]Cada AA desde a alanina até à valina foi removido dos 20 AA;
[2]Bactérias produzidas/açúcares consumidos;
[3]Percentagem em relação ao tratamento com apenas NH_3;
†Erro padrão da média ajustado.
ADAPTADO DE KAJIKAWA *et al.* (2002).

foi removido do grupo inicial de 20. Mas, a adição da mistura destes sete aminoácidos produziu, apenas, um efeito estimulante de 21 e 25% do efeito da mistura de 20, respectivamente, para a taxa e para a eficiência de crescimento (QUADRO 2.6). A adição de misturas de aminoácidos da família do oxaloacetato e do piruvato (*i.e.*, alanina, asparagina, ácido aspártico e lisina) ou da família do α-cetoglutarato (*i.e.*, arginina, glutamina e prolina) aos sete aminoácidos referidos não promoveu melhorias adicionais. A adição de misturas de aminoácidos da família do 3-fosfoglicerato (*i.e.*, cisteína, glicina e serina) originou, porém, melhorias significativas na taxa e na eficiência de crescimento, tendo a glicina sido o aminoácido mais efectivo. A adição de glicina, de cisteína e de histidina à mistura dos sete aminoácidos aumentou o efeito estimulante em 76 e 72% do efeito da mistura dos 20 aminoácidos, respectivamente, para a taxa e a eficiência de crescimento. Estes parâmetros foram inibidos pela adição individual dos aminoácidos isoleucina, treonina, cisteína, fenilalanina, leucina, lisina e valina, sendo o efeito dos cinco primeiros

QUADRO 2.6 – Combinação óptima de aminoácidos (AA) para melhorar a taxa de crescimento e a eficiência de crescimento de bactérias ruminais em cultura mista.

	Taxa de crescimento		Eficiência de crescimento[1]	
Fonte de N	Actual (h^{-1})	%[2]	Actual ($g\ g^{-1}$)	%[2]
NH_3	$0,278^{d}$	0^{f}	$0,210^{e}$	0^{f}
20 AA	$0,388^{a}$	100^{a}	$0,247^{a}$	100^{a}
SAA[3]	$0,301^{cd}$	21^{e}	$0,219^{cd}$	25^{de}
SAA+OAA[4]	$0,302^{cd}$	23^{e}	$0,220^{cd}$	25^{de}
SAA+KAA[5]	$0,309^{c}$	28^{de}	$0,224^{e}$	36^{d}
SAA+PAA[6]	$0,349^{b}$	65^{c}	$0,237^{b}$	72^{bc}
SAA+cisteína	$0,312^{c}$	31^{d}	$0,221^{cd}$	28^{de}
SAA+glicina	$0,343^{b}$	60^{c}	$0,232^{b}$	58^{c}
SAA+serina	$0,303^{cd}$	23^{e}	$0,216^{d}$	16^{e}
SAA+cisteína+glicina	$0,350^{b}$	66^{c}	$0,233^{b}$	61^{bc}
SAA+cisteína+glicina+histidina	$0,631^{a}$	76^{b}	$0,237^{b}$	72^{b}
EPM†	0,011	3	0,002	5

[a, b, c, d, e, f]Valores na mesma coluna com diferentes notações são significativamente diferentes ($P<0,05$);
[1]Bactérias produzidas/açúcares consumidos;
[2]Percentagem em relação ao tratamento com os 20 AA;
[3]SAA: sete AA cuja remoção diminui os efeitos estimulantes dos 20 AA no crescimento (ácido glutâmico, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina e valina);
[4]OAA: famílias do oxaloacetato e do piruvato excepto para os SAA, treonina e isoleucina (alanina, asparagina, ácido aspártico e lisina);
[5]KAA: família do α-cetoglutarato excepto para os SAA (arginina, glutamina e prolina);
[6]PAA: família do 3-fosfoglicerato excepto para os SAA (cisteína, glicina e serina);
†Erro padrão da média ajustado.
ADAPTADO DE KAJIKAWA *et al.* (2002).

altamente significativo. A isoleucina, a treonina e a fenilalanina revelaram-se inibidores em baixas concentrações (1 mg N l^{-1}), enquanto a cisteína e a leucina mostraram o seu efeito inibidor em concentrações elevadas (>10 mg N l^{-1}). Este efeito inibidor é devido, provavelmente, à inibição por retroacção de uma enzima que actua nas etapas iniciais de síntese de um determinado aminoácido e que inibe, também, a produção de outros aminoácidos que requerem a mesma enzima para a sua síntese. Os resultados deste estudo mostram que os aminoácidos leucina, tirosina, triptofano e ácido glutâmico são essenciais para aumentar o crescimento bacteriano e que os aminoácidos metionina, fenilalanina e valina são subessenciais.

A presença de péptidos no meio é outro aspecto que importa considerar quando se pretende maximizar o fluxo de proteína microbiana para o duodeno. JONES *et al.* (1998) compararam níveis crescentes de péptidos (0, 10, 20 e 30% do N total) com a ureia como fonte de N no metabolismo microbiano e observaram que a produção de proteína microbiana e a digestão da MS e da proteína foram afectadas de forma quadrática pela adição de péptidos (QUADRO 2.7). A digestão da fibra diminuiu linearmente com a adição de péptidos, parecendo que a diminuição da digestão da fibra e da produção de proteína microbiana observadas com concentrações de péptidos superiores a 10% se relacionaram com a diminuição linear da concentração de amoníaco associada ao aumento do nível de péptidos. A captura de péptidos pelos micróbios aumentou com o nível de inclusão de péptidos, mas embora a eficiência de conversão de péptidos em proteína microbiana tenha aumentado, os autores não observaram alteração na produção de proteína microbiana por kg de MO digerida, sugerindo que, com dietas com elevado teor em NSC (46%), um excesso de péptidos pode diminuir a fermentação das proteínas e, consequentemente, a concentração de amoníaco, resultando na redução da digestão das paredes celulares e na diminuição da produção de proteína microbiana. RUSSELL *et al.* (1992) demonstraram que a produção de bactérias que fermentam NSC aumentou 18,7% quando a relação péptidos/(NSC + péptidos) no fluído ruminal aumentou de 0 para 14%, não tendo observado melhorias adicionais na produção quando a relação foi superior a 14%. FU *et al.* (2001) referem que concentrações de péptidos de 1,8 mM maximizam a eficiência microbiana quando o N amoniacal não é limitante (> 2 mg dl^{-1}).

Conquanto seja normal assumir-se que o aumento do crescimento microbiano em resposta ao maior fornecimento de aminoácidos pré-formados e de péptidos ocorre quando os NSC representam uma grande proporção da dieta e, consequentemente, as bactérias

QUADRO 2.7 – Efeito da concentração de péptidos na dieta na digestibilidade da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO), da fibra de detergente neutro (NDF) e da fibra de detergente ácido (ADF), na produção de ácidos gordos voláteis (AGV), no crescimento e na eficiência microbiana e na utilização do N dos péptidos e dos aminoácidos (AA).

	Concentração de péptidos[1]				
	0	10	20	30	EPM†
Digestibilidade, na MS					
MS[2]	68,1	73,1	70,2	64,7	1,18
MO[3]	64,3	67,9	65,3	63,3	1,02
NDF[3]	49,1	49,6	45,5	42,2	1,12
ADF[3]	39,6	39,1	36,3	32,1	1,40
AGV totais, mmol dia^{-1}	360	352	336	351	8,31
g N microbiano kg^{-1} MO digerida	25,0	26,8	26,6	25,8	1,27
N dos péptidos adicionado, g dia^{-1}	0	0,234	0,470	0,703	-
Ingestão de N digestível dos AA, g dia^{-1}[,4]	0,664	0,742	0,620	0,482	0,030
Total de N disponível dos péptidos e dos AA, g dia^{-1}[,5]	0,664	0,976	1,09	1,19	0,048
N dos péptidos e dos AA do efluente recuperado, g dia^{-1}	0,113	0,119	0,124	0,128	0,006
Desaparecimento N dos péptidos e dos AA, g dia^{-1}[,6]	0,551	0,857	0,966	1,06	0,047
N disponível dos péptidos e dos AA para o crescimento microbiano, % de fluxo de N microbiano	46,7	62,6	73,2	85,5	3,26

[1]Em percentagem do N total;
[2]Resposta quadrática, P<0,01;
[3]Resposta linear, P<0,05;
[4] Resposta quadrática, P<0,05;
[5]Desaparecimento de N dos péptidos N $microbiano^{-1}$ x 100;
[6]Resposta linear, P<0,01.
†Erro padrão da média.
ADAPTADO DE JONES *et al* (1998).

amilolíticas têm uma contribuição significativa para a fermentação ruminal, OH *et al.* (1999) verificaram que a resposta na síntese de proteína microbiana à inclusão de caseína, em oposição à de ureia, foi superior para o nível mais baixo de amido (QUADRO 2.8). Resultados que questionam a generalização de que as bactérias amilolíticas requerem péptidos e aminoácidos pré-formados para o seu crescimento e que realçam a necessidade de mais informação sobre a influência da composição da dieta na determinação dos tipos de bactérias amilolíticas que dominam a fermentação ruminal. Isto porque existe evidência de que pelo menos um microrganismo amilolítico potencialmente dominante, o *Ruminobacter amylophilus*, utiliza maioritariamente amoníaco para o seu crescimento, sendo a incorporação de N orgânico muito limitada (HESPELL, 1984).

Por outro lado, alguns microrganismos celulolíticos apresentam necessidades em

QUADRO 2.8 – Efeito do nível de amido na dieta de ovelhas adultas nos parâmetros de fermentação ruminais (média de quatro determinações diárias) e no fluxo de proteína bruta microbiana (MCP) para o duodeno a adições iso-azotadas de ureia e de caseína.

		200g amido		500g amido		EPD‡			
	Basal[1]	Ureia	Caseína	Ureia	Caseína	Basal	Fonte N	Nível amido	BxNxS[3]
pH	6,75	6,74	6,60	6,48	6,31	0,10†	0,11	0,11*	0,12
Amoníaco (mM)	18,3	18,4	15,8	13,4	10,4	2,21	2,43	2,43*	2,80
AGV totais (mM)	83	89	99	98	108	8,8	9,6	9,6	11,1
MCP[2] (g dia^{-1})	43	47	76	73	83	5,7**	6,3**	6,3*	7,3

[1]Silagem de azevém;
[2]Calculada a partir da excreção de derivados das purinas;
[3]Interacção basal x fonte de N x nível de amido;
‡Erro padrão da diferença;
†P<0,10; *P<0,05; **P<0,01.
ADAPTADO DE OH *et al.* (1999).

AGV de cadeia ramificada, podendo a resposta positiva em termos de crescimento microbiano à adição de aminoácidos e de péptidos ser o reflexo da cobertura destas necessidades a partir dos AGV resultantes da fermentação dos aminoácidos (MAENG *et al.*, 1976; WALLACE e COTTA, 1988; MACKIE e WHITE, 1990). Isto porque a maior parte das espécies de bactérias fibrolíticas não são capazes de fermentar aminoácidos para obterem esses ácidos gordos de cadeia ramificada, sendo dependentes do seu fornecimento na dieta ou da interacção com outros microrganismos (WALLACE e COTTA, 1988). Assim, para dietas ricas em fibra e com taxas de degradação da fibra relativamente lentas, o fornecimento adicional de proteína pode estimular o crescimento fibrolítico através da fermentação dos aminoácidos pelas bactérias não fibrolíticas e pelo subsequente aumento do fornecimento de ácidos gordos de cadeia ramificada (DIJKSTRA *et al.*, 1998). Neste contexto, o tipo de proteína a ser degradada torna-se importante, uma vez que pode limitar a produção de isovalerato, de 2-metilbutirato e de isobutirato a partir, respectivamente, de leucina, de isoleucina e de valina (SNIFFEN e ROBINSON, 1987; MACKIE e WHITE, 1990; VAN SOEST, 1994).

A discussão realizada permite concluir que os efeitos do tipo de nutrientes azotados na síntese de proteína microbiana dependem do tipo de substrato energético presente no rúmen. O crescimento de bactérias amilolíticas parece ser estimulado pela presença de aminoácidos, ao passo que as bactérias fibrolíticas, apesar de poderem ter necessidades em ácidos gordos de cadeia ramificada, podem não necessitar de aminoácidos para alcançarem o máximo crescimento. Note-se, contudo, que a relação destas fontes na dieta pode originar

alterações no equilíbrio entre as espécies de microrganismos.

Assim sendo, não importa, apenas, garantir na dieta uma fonte de RDP para cobrir as necessidades em N dos microrganismos – tal como fazem os sistemas mais correntes de formulação de regimes alimentares –, é fundamental ter presente que o crescimento microbiano varia com a fonte de N disponível, devendo considerar-se a forma de N preferencial da população microbiana presente, num dado momento, no rúmen, não esquecendo que esta depende do tipo de substrato energético. Daqui decorre que em situações práticas de alimentação a satisfação das necessidades em RDP não pode fazer-se, simplesmente, em função da quantidade de energia fermentável, impondo-se que a escolha, quer das fontes de N degradável, quer da relação entre essas mesmas fontes, seja realizada de acordo com a relação entre os vários substratos energéticos presentes na dieta.

2.4. RECICLAGEM DE AZOTO

Embora os sistemas empíricos correntes de formulação de regimes alimentares para ruminantes reconheçam a importância da reciclagem de N no e para o rúmen, não incorporam este informe biológico no cálculo das necessidades em N degradável da população microbiana. Todavia, a reciclagem de N para o rúmen em animais alimentados com dieta com baixo teor em N é extremamente importante no colmatar parcial do défice em N degradável (NOLAN e LENG, 1972; BUNTING *et al.*, 1987; SARRASECA *et al.*, 1998); isto, para além da ureia de origem endógena constituir a principal fonte de N para as bactérias do intestino grosso (INRA, 1988). Por outro lado, mesmo em ruminantes alimentados com dietas com um teor em N suficiente para satisfazer as necessidades dos microrganismos do rúmen e do animal hospedeiro, a reciclagem de N para o rúmen pode ser benéfica na medida em que permite aumentar a sincronização das disponibilidades de N e de energia em períodos do dia em que o N disponível para os microrganismos é limitante ao seu crescimento.

Mas, quando falamos de reciclagem de N nos animais ruminantes, devemos distinguir a reciclagem da ureia formada no fígado, em que uma parte variável é excretada na urina pelo rim e outra é reciclada para o rúmen, quer via saliva, quer por difusão através das paredes deste compartimento, da reciclagem intra-ruminal de N como resultado da lise dos microrganismos da população simbiótica.

2.4.1. Para o rúmen

Os ruminantes economizam N sobretudo através da reciclagem do N de ureia, mas, também, da reciclagem de compostos sintetizados no epitélio do rúmen, como a glutamina e o ácido glutâmico, de mucoproteínas da saliva e de células queratinizadas da parede do rúmen (HOUPT, 1970; HAVASSY *et al.*, 1974; SIDDONS *et al.*, 1985).

Segundo VAN SOEST (1994), baixos níveis de ingestão de N conduzem a que grande parte do N metabolizado no animal seja reciclado para o rúmen, sendo uma pequena quantidade excretada na urina. O aumento da ingestão de N está associado com uma maior produção de ureia pelo fígado, estando o nível de ureia no plasma sanguíneo associado com uma maior taxa de excreção de ureia na urina. Ou seja, o fluxo de N não proteico altera-se do rúmen para a urina com o aumento de fornecimento de N na dieta, apesar da quantidade de ureia que é reciclada ser relativamente independente do teor em N da dieta, uma vez que a reserva de ureia no organismo está sob controlo fisiológico homeostático, permanecendo, aproximadamente, constante (VAN SOEST, 1994).

A ureia formada no fígado e libertada na corrente sanguínea pode retornar ao rúmen através da saliva ou por absorção pelas paredes deste órgão. A quantidade de ureia que entra via saliva é afectada pela concentração plasmática de ureia e pela produção de saliva (SOMERS, 1961; HUNTINGTON e ARCHIBEQUE, 1999). Em vacas a secreção de saliva atinge os 100-190 l dia^{-1} (BAILEY e BALCH, 1961), o que pode representar um transporte de N de ureia de 1,2-34,2 g N dia^{-1} se a concentração plasmática de ureia variar entre 20 e 300 mg N l^{-1}. Como a produção de saliva se relaciona com a quantidade de alimento consumido e com a relação forragem/concentrado da dieta, a reciclagem de N para o rúmen via saliva pode tomar particular importância em animais alimentados com dietas fibrosas com baixo teor em N.

A transferência da ureia através da parede do rúmen é, provavelmente, feita por difusão passiva, limitada pela camada epitelial queratinizada (OBARA *et al.*, 1991). Os microrganismos aderentes ao epitélio produzem urease que hidrolisa a ureia durante a sua passagem pelas paredes do rúmen a amoníaco e a dióxido de carbono. Estes microrganismos digerem, também, tecido epitelial, tornando disponíveis as células de descamação, queratinizadas e resistentes à hidrólise enzimática, após digestão, proteólise e, provavelmente, desaminação (DINSDALE *et al.*, 1980).

A taxa de transferência da ureia endógena do sangue para o rúmen, através da

absorção pelas paredes deste compartimento, é afectada por factores como a permeabilidade do epitélio do rúmen, a concentração de amoníaco no rúmen, a concentração plasmática de ureia, o pH do rúmen e a digestibilidade da MO (FIGURA 2.4; QUADRO 2.9). Vários estudos (WESTON e HOGAN, 1967; VERCOE, 1969; THORNTON, 1970a e 1970b; MCINTYRE, 1971) mostraram a existência duma relação curvilínea entre a concentração plasmática de ureia e a concentração ruminal de amoníaco na taxa de transferência da ureia do plasma para o rúmen. No entanto, é difícil distinguir entre os efeitos do aumento das concentrações plasmática de ureia e de amoníaco no rúmen quando ambas estão altamente correlacionadas, mas o limite de transferência de ureia está, provavelmente, mais associado com o aumento da concentração de amoníaco no rúmen e a consequente regulação na transferência de ureia do que com o efeito directo da concentração de ureia *per se* (KENNEDY e MILLIGAN, 1980).

Em ruminantes alimentados com dietas ricas em energia aumenta, em geral, a quantidade e/ou a proporção de ureia reciclada para o rúmen (KENNEDY, 1980; OBARA e SHIMBAYASHI, 1980; NORTON *et al.*, 1982), devido ao aumento na permeabilidade da parede ruminal, que é independente, quer da concentração plasmática de ureia, quer do fornecimento de ureia via saliva (NORTON *et al.*, 1982). O conceito de que a concentração

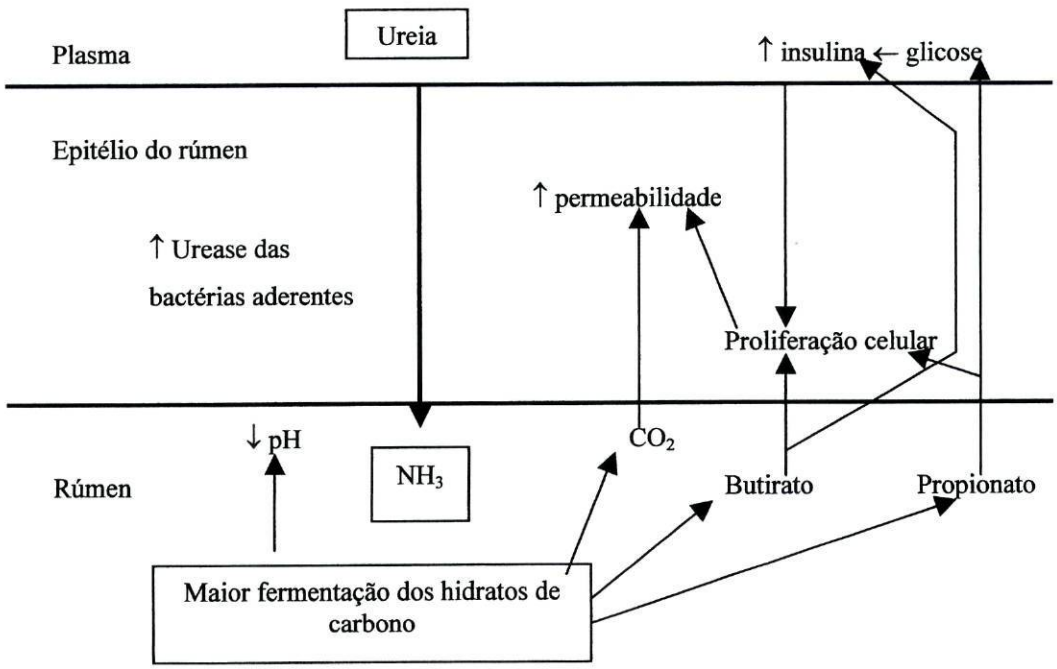


FIGURA 2.4 – Possíveis factores envolvidos no aumento da permeabilidade das paredes do rúmen à ureia pelo aumento da fermentação dos hidratos de carbono.
ADAPTADO DE OBARA *et al.* (1991).

QUADRO 2.9 – Valores publicados e calculados, para ovinos, das concentrações plasmática de ureia e de amoníaco no rúmen, da quantidade de matéria orgânica (MO) aparentemente digerida no rúmen e das taxas de desaparecimento e de transferência da ureia plasmática para o rúmen.

Dieta	Ureia no plasma (mg N l^{-1})	NH_3 no rúmen (mg N l^{-1})	MO aparentemente digerida no rúmen (g dia^{-1})	Transf. de ureia para o rúmen (mg N h^{-1} kg^{-1} PV)	Des. de ureia para o rúmen (ml h^{-1} kg^{-1} PV)
Feno de luzerna	250	289	308	1,44	5,8
Feno de luzerna	169	259	214[1]	1,39	8,2
Pellets de luzerna	220	150	458[2]	1,08	4,9
Pellets de bromo	138	99	257[3]	5,80	42,0
	150	97	513[3]	5,65	37,6
	242	127	459[3]	4,10	16,9
	254	90	459[3]	4,17	16,4
	216	200	459[3]	1,85	8,6
	260	173	459[3]	2,37	9,1
Pellets de bromo	152	98	544	5,16	34,2
	145	73	391	7,72	59,5
	156	68	602	6,81	44,8
Feno	57	27	118[4]	0,67	11,8
	138	84	153[4]	0,60	4,4
	72	44	122[4]	0,48	6,6
Feno+melaços	72	63	-	2,65	36,8

[1]Assumindo que a digestão aparente da MO é 48,5% da ingestão de MO;
[2]Assumindo que a digestão aparente da MO no rúmen é 40% da ingestão de MO digestível;
[3]Assumindo que a digestão aparente da MO no rúmen é 36% da ingestão de MO;
[4]Assumindo que a digestão aparente da MO no rúmen é 60% da ingestão de MO digestível.
ADAPTADO DE KENNEDY e MILLIGAN (1980).

de amoníaco e a quantidade ou taxa de fermentação da MO influenciam a permeabilidade do epitélio do rúmen à ureia e, portanto, a taxa de transferência de ureia através da parede é suportado pelos resultados obtidos por NOLAN e LENG (1972) e NOLAN *et al.* (1976). A importância da quantidade e da taxa de fermentação da MO na taxa de entrada da ureia no rúmen é, também, evidente no estudo de KENNEDY (1980) no qual a taxa de transferência da ureia para o rúmen de vacas alimentadas com uma dieta de feno e sacarose foi superior (21,8 g N dia^{-1} *versus* 10,9 g N dia^{-1}) do que em vacas alimentadas apenas com feno. Neste estudo, a suplementação com sacarose aumentou o número de bactérias aderentes e o desaparecimento de ureia e diminuiu a concentração de amoníaco no rúmen. O desaparecimento por unidade de peso vivo em ovinos é superior do que em bovinos alimentados com dietas similares, o que pode contribuir para explicar o porquê dos ovinos manterem uma concentração superior de amoníaco no rúmen (SATTER e ROFFLER, 1977).

Mas, a adição de hidratos de carbono fermentáveis ao rúmen aumenta, também, a actividade dos microrganismos, estando a produção e a absorção dos produtos finais da fermentação (propionato, butirato e dióxido de carbono) associados com um aumento da permeabilidade da parede do rúmen à ureia, embora os mecanismos de acção permaneçam,

ainda, por esclarecer (KENNEDY e MILLIGAN, 1980; OBARA *et al.*, 1991; RÉMOND *et al.*, 1993). É possível que um aumento na pressão osmótica no fluído ruminal estimule a permeabilidade das paredes do rúmen à ureia (HOUPT, 1970). Contudo, RÉMOND *et al.* (1993) referem que o aumento da osmolalidade do rúmen diminui ligeiramente a absorção de amoníaco. Maiores quantidades de AGV podem, também, promover a proliferação do epitélio que reveste as paredes do rúmen (FLATT *et al.*, 1958) e modificar o tipo e a extensão das papilas das paredes deste compartimento (WEIGAND *et al.*, 1975). SAKATA e TAMATE (1978 e 1979), utilizando infusões de soluções individuais de sais sódicos de AGV, demonstraram que o butirato de sódio tem o maior efeito na proliferação do epitélio ruminal. SAKATA *et al.* (1980) verificaram que a infusão intravenosa de insulina estimula a proliferação de células epiteliais e sugeriram que as respostas aos AGV pode ser mediada pelos níveis aumentados de insulina circulante após a absorção de AGV. A infusão de butirato a longo prazo afecta, provavelmente, a estrutura da parede do rúmen, a qual, através do aumento da área de troca de metabolitos ou do aumento da permeabilidade da camada epitelial queratinizada, aumenta a transferência de ureia (NORTON *et al.*, 1982).

Infusões de ureia no abomaso ou na veia jugular aumentam a concentração plasmática de ureia e de amoníaco no rúmen, sendo a relação, nalguns casos, curvilínea (WESTON e HOGAN, 1967; VERCOE, 1969; THORNTON, 1970a e 1970b; MCINTYRE, 1971). ALLEN e MILLER (1976) referem que a reciclagem de ureia não se relacionou com a concentração plasmática de ureia em ovelhas, mas relacionou-se de forma exponencial em carneiros, o que sugere um controlo da reciclagem, não resultando esta de simples difusão do sangue para o tubo digestivo.

HOUPT (1970) sugeriu que a urease bacteriana presente no epitélio cornificado pode facilitar a transferência de ureia plasmática se a hidrólise resultar num gradiente de amoníaco no epitélio a favor da difusão para o rúmen mais ácido. Mais tarde, CHENG e WALLACE (1979) e RÉMOND *et al.* (1993) confirmaram que a urease bacteriana facilita a transferência de ureia plasmática para o rúmen, sugerindo os primeiros, que como a actividade da urease se relaciona inversamente com a concentração de amoníaco, a extensão em que a difusão de ureia é facilitada pela urease bacteriana é controlada pela concentração de amoníaco no rúmen.

A transferência de N para o rúmen é, ainda, afectada por vários outros factores como aqueles que afectam o fluxo de sangue capilar e a tensão de dióxido de carbono (HUNTINGTON e ARCHIBEQUE, 1999), a dieta prévia ao jejum (HARROP e PHILLIPSON,

1974), as deficiências em nutrientes que, ao limitarem a actividade microbiana, reduzem a digestão da MO da dieta (KENNEDY e SIEBERT, 1972), e as hormonas gastrointestinais (HARROP e PHILLIPSON, 1971).

2.4.2. Intra-ruminal

A reciclagem de N no rúmen envolve a autólise bacteriana, a lise de microrganismos mediada por anaeroplasmas, por bacteriofagos e por privação ou excesso de substrato (acumulação de produtos finais da fermentação), assim como a ingestão de microrganismos por protozoários, a lise de protozoários e a lise de talos de fungos após libertação dos zoósporos. Contudo, no que respeita à extensão e à quantidade de N reciclado pelos fungos presume-se que a sua contribuição para a reciclagem de N total seja mínima (KOENIG *et al.*, 2000).

2.4.2.1. Autólise bacteriana

Alguns estudos mostraram a ocorrência de lise de bactérias em culturas puras (BRYANT e ROBINSON, 1961; DEMEYER e VAN NEVEL, 1979; RUSSELL *et al.*, 1983). JOLLIFFE *et al.* (1981) introduziram um modelo de autólise baseado na localização de protões próximos da membrana celular. Com efeito, DOYLE *et al.* (1988) verificaram que compostos que destruíam o potencial de membrana promoviam a lise dos bacilos. As bactérias de crescimento rápido têm um potencial de membrana elevado que acumula protões na superfície da célula, sendo a autolisina inibida a pH baixo, mas, pelo contrário, a carência de nutrientes pode dissipar o potencial de membrana, aumentar o pH e activar as autolisinas (WELLS e RUSSELL, 1996a). No entanto, não é de esperar que a privação de nutrientes ocorra em animais alimentados frequentemente, visto o fornecimento de nutrientes ser quase contínuo. Além disso, a presença de polissacáridos de reserva na célula pode ajudar a aumentar a sobrevivência, bem como as interacções entre bactérias podem fornecer substratos para bactérias individuais durante períodos de restrição de nutrientes em animais alimentados pouco frequentemente (MCALLISTER *et al.*, 1994).

Compostos que diminuem o potencial de membrana aceleram a lise do *Fibrobacter succinogenes*, mas, mesmo, em células em crescimento com elevado potencial de membrana ocorre lise (WELLS e RUSSELL, 1996b). No *Fibrobacter succinogenes* a lise parece ser uma propriedade das células em crescimento que é independente da taxa de

crescimento em vez de ser uma resposta à carência de nutrientes. De facto, quando as células entram na fase estacionária, a taxa absoluta de lise diminui e esta transição é inibida pelo fenilmetilsulfonil fluoreto, um inibidor das proteases de serina. Como este inibidor só promove a lise de células que estão a alcançar a fase estacionária, o *Fibrobacter succinogenes* parece regular a sua autólise via um mecanismo que envolve a degradação proteolítica das autolisinas (WELLS e RUSSELL, 1996a).

Uma aproximação para diminuir a reciclagem intra-ruminal devida à autólise bacteriana seria a modificação genética das bactérias ruminais, no entanto, a possibilidade da autólise bacteriana e do crescimento serem processos altamente integrados, torna esta solução pouco atractiva.

2.4.2.2. Lise por bacteriofagos

Neste ponto optámos, apenas, por referir a lise de bactérias por bacteriofagos, uma vez que os anaeroplasmas anaeróbios capazes de infectar bactérias Gram negativas vivas estão, provavelmente, presentes no rúmen em concentrações inferiores a 10^4 ml^{-1} fluído ruminal (WELLS e RUSSELL, 1996a). Embora exista considerável variação individual entre animais nas populações de bacteriofagos (SWAIN *et al.*, 1996), o fluído ruminal de ovinos e de bovinos apresenta elevado número de bacteriofagos (2×10^7 a 1×10^8 ml^{-1}, KLIEVE e BAUCHOP, 1988; 3×10^9 a $1{,}6 \times 10^{10}$ ml^{-1}, KLIEVE e SWAIN, 1993). Ao longo dos anos foram isolados e caracterizados bacteriofagos de várias espécies bacterianas (IVERSON e MILLIS, 1976a e 1976b; TYUTIKOV *et al.*, 1980; LOCKINGTON *et al.*, 1988; STYRIAK *et al.*, 1989 e 1991; JIANG *et al.*, 1995; CHEONG e BROOKER, 1998; AMBROZIC *et al.*, 2001), sendo o material genético vírico um constituinte normal do genoma de um número apreciável de bactérias do rúmen (KLIEVE *et al.*, 1989).

Os bacteriofagos líticos promovem a lise bacteriana imediata, podendo os lisogénicos serem retidos no DNA bacteriano por algum tempo (WELLS e RUSSELL, 1996a). IVERSON e MILLIS (1976b) referem que as estirpes de bacteriofagos lisogénicos não constituem uma fonte importante de bacteriofagos no rúmen e KLIEVE *et al.* (1989) referem, também, que os bacteriofagos ruminais líticos são de pequena importância, mas 25% das bactérias ruminais contém profagos lisogénicos cromossomicamente estáveis. Com efeito, parece que, apesar dos bacteriofagos poderem causar lisogenia ou lise (NEWBOLD *et al.*, 1996), existe escassa evidência experimental de que estes processos

sejam importantes determinantes da renovação bacteriana *in vivo* (WELLS e RUSSELL, 1996a; DIJKSTRA *et al.*, 1998). Sublinhe-se que, embora uma bactéria possa favorecer o desenvolvimento de 40-50 bacteriofagos, a camada de polissacáridos das bactérias ruminais pode protegê-las da infecção por bacteriofagos (MCALLISTER *et al.*, 1994).

SWAIN *et al.* (1996) mostraram a existência de grande flutuação diurna no número total de bacteriofagos, ocorrendo a menor concentração dentro de duas horas após a alimentação e as concentrações máximas 8 a 10 horas após. KLIEVE *et al.* (1998) verificaram que animais alimentados com pastagem verde tendem a possuir concentração superior de bacteriofagos, sendo as concentrações duas e dez vezes inferiores, em animais alimentados, respectivamente, com forragens desidratadas e com alimentos concentrados. No entanto, não é claro se as diferenças entre dietas resultam do momento de recolha da amostra em relação à ingestão de alimento, ou de outros factores como a resistência microbiana à infecção (MORRISON, 2000). Assim sendo, pode especular-se que a manipulação da dieta pode permitir reduzir o nível de bacteriofagos que induzem a lise bacteriana, bem como que os bacteriofagos podem desempenhar um importante papel no controlo selectivo de populações de microrganismos do rúmen.

Com o intuito de manipular a população microbiana do rúmen, recentemente, têm sido, também, examinadas a presença e os efeitos das bacteriocinas do ecossistema ruminal (MOROVSKY *et al.*, 1998; WHITFORD *et al.*, 2001; RUSSELL e MANTOVANI, 2002). Estas consistem num grupo heterogéneo de péptidos anti-bacterianos e de proteínas caracterizado pela sua capacidade de inibir estirpes bacterianas, tendo sido detectadas substâncias inibidoras tipo bacteriocinas em vários géneros de bactérias do rúmen, como de *Streptococcus bovis spp.* (WHITFORD *et al.*, 2001) e de *Butyrivibrio fibrisolvens* (RYCHLIK e RUSSELL, 2002). Estas substâncias, sendo proteínas, quando abandonam o rúmen, podem ser digeridas, contribuindo para a cobertura das necessidades em aminoácidos do animal.

2.4.2.3. Lise por défice ou excesso de nutrientes

As bactérias do rúmen diferem quanto à capacidade de manter a sua viabilidade durante períodos de défice de nutrientes (RUSSELL e HESPELL, 1981). Quando as bactérias ruminais estão em situações de défice em N e outros nutrientes, o excesso de hidratos de carbono pode ser tóxico. Muitas espécies de bactérias ruminais produzem polissacáridos e algumas armazenam grandes quantidades desta reserva intracelular (*e.g.*, *Prevotella*

ruminicola, *Fibrobacter succinogenes*; CHENG *et al.*, 1973; COSTERTON *et al.*, 1974; HOWLETT *et al.*, 1976; WELLS e RUSSELL, 1994; LOU *et al.*, 1997). No entanto, a capacidade das bactérias ruminais em armazenar hidratos de carbono como polissacáridos parece ser limitada (FIGURA 2.5; MAGLIONE e RUSSELL, 1997).

Culturas de *Fibrobacter succinogenes* que têm excesso de celobiose secretam glicose e celotriose no meio de cultura e como este microorganismo é destruído pela celobiose quando o N é limitante, a actividade da celobiase, que produz glicose livre, e o efluxo de celodextrina podem constituir mecanismos de protecção das células ao excesso de hidratos de carbono (RUSSELL, 1998).

Algumas bactérias ruminais (*e.g.*, *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*) possuem mecanismos de diminuição da produção de ATP ou de desvio do ATP produzido, que parecem proteger as células. A maioria das bactérias do rúmen utilizam a via Embden-Meyerhof-Parnas para metabolizar as hexoses (WALLNOFER *et al.*, 1966), mas algumas bactérias (*e.g.*, *Pseudomonas saccharophilia*, *Clostridium sphenoides* e *Enterobacter* (*Klebsiella*) *aerogenes*; COOPER, 1984) podem utilizar a via do metilglioxal (COOPER e ANDERSON, 1970). Como a via do metilglioxal não possui fosfato transferases, o metabolismo da glicose por esta via é um mecanismo muito eficaz para diminuição da

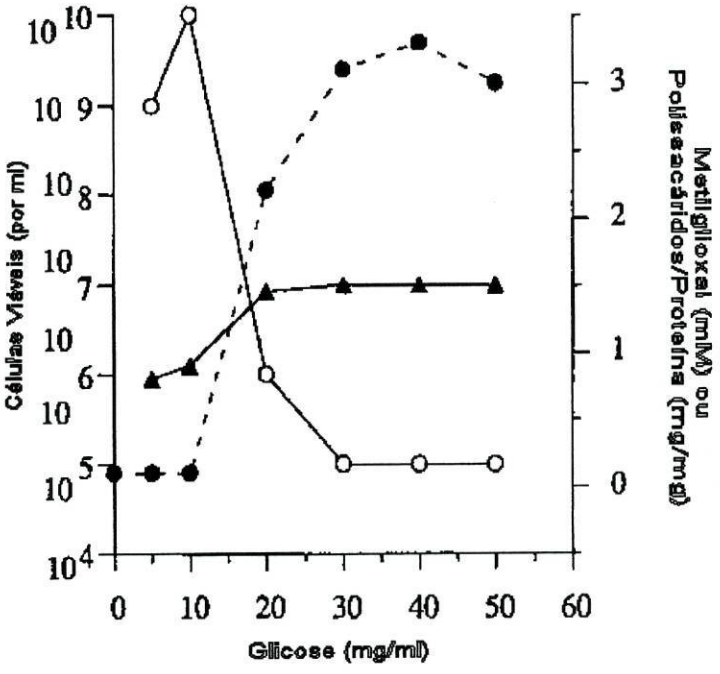


FIGURA 2.5 - Efeito da glicose no número de células viáveis (0), relação polissacáridos/proteína celulares (▲) e produção de metilglioxal (●) da *Prevotella ruminicola* B_14 num meio com baixa concentração de amoníaco (3 mM).
ADAPTADO DE RUSSELL (1992 e 1993).

produção de ATP (FIGURA 2.6).

Mas, as bactérias que possuem metilglioxal sintase nem sempre são capazes de converter o metilglioxal em D-lactato (mesmo a *Escherichia coli* que possui glioxalase pode produzir metilglioxal como produto final) (RUSSELL, 1998). Contudo, o metilglioxal é um composto altamente reactivo e tóxico que destroi o DNA, inibe a síntese proteica e destroi as bactérias (FREEDBERG *et al.*, 1971; FRAVEL e MCBRIEN, 1980). Como a via do metilglioxal não necessita de ADP nem gera ATP, a produção de metilglioxal é, provavelmente, regulada pela taxa de utilização do ATP (COOPER, 1984).

O desvio energético (*energy spilling*) parece ser, também, um método comum das bactérias ruminais lidarem com excesso de hidratos de carbono. A reacção de

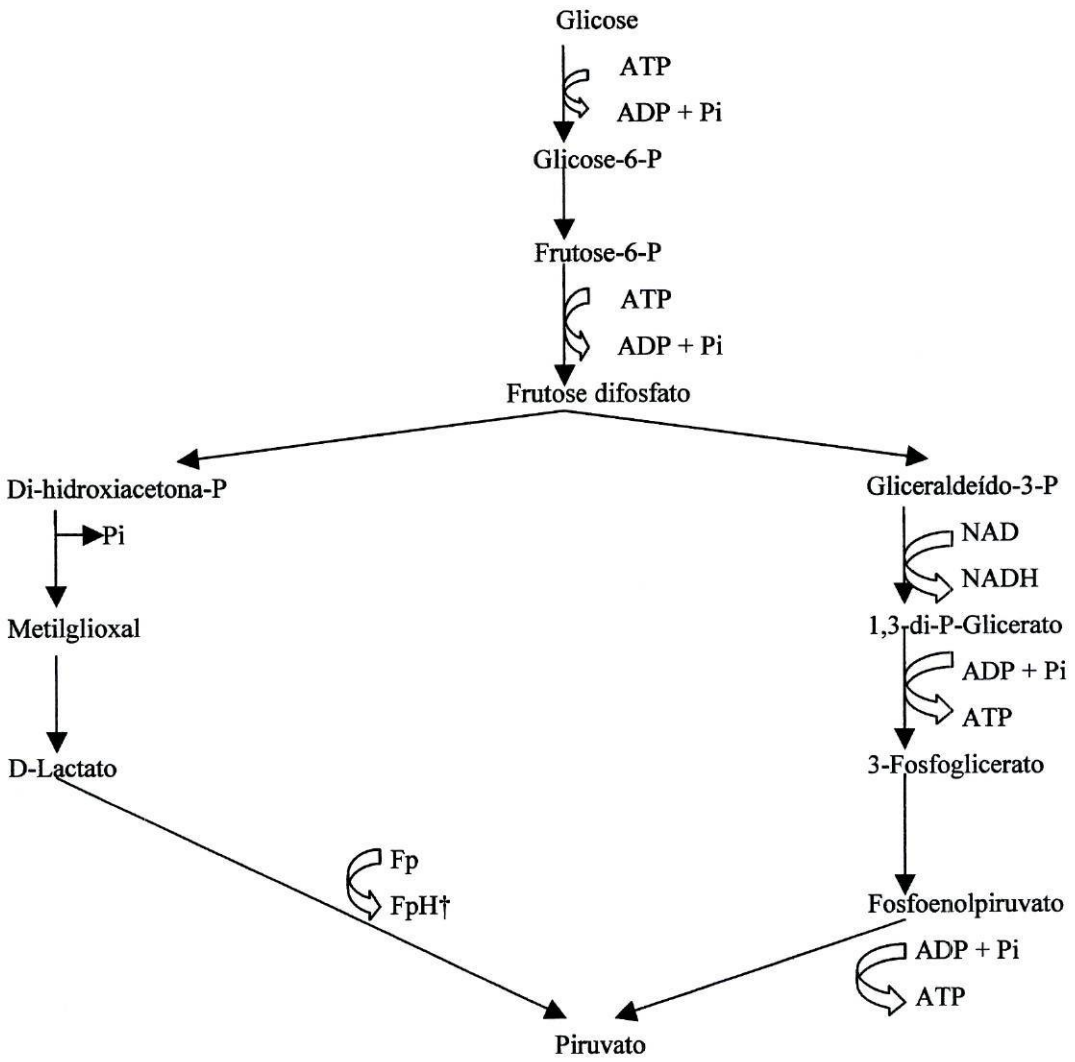


FIGURA 2.6 - Catabolismo da glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas e pela via do metilglioxal.
†Flavoproteína ligada à desidrogenase.
ADAPTADO DE RUSSELL (1998).

desvio energético do *Streptococcus bovis* só pode funcionar de modo cíclico para dissipar ATP se os protões puderem entrar nas células, sendo este efeito apenas explicado pela força motivada por protões (*protonmotive*; RUSSELL, 1998). Quando a força motivada por protões é baixa (pequeno excesso de glicose e baixa taxa glicolítica) a membrana celular do *Streptococcus bovis* é relativamente impermeável aos protões, mas quando a taxa de catabolismo da glicose aumenta, a força motivada por protões aumenta (BOND e RUSSELL, 1998).

2.4.2.4. Lise por protozoários

Os estudos *in vitro* sugerem que a presença de protozoários representa a actividade reguladora mais importante da renovação de N bacteriano no rúmen (NOLAN *et al.*, 1976; WALLACE e MCPHERSON, 1987). Contudo, os aumentos no fluxo de proteína bacteriana em animais defaunados, isto é, sem protozoários, são inferiores aos esperados *in vitro* pela paragem de digestão bacteriana pelos protozoários, provavelmente, porque, em geral, nos estudos *in vitro*, existem poucas partículas de alimento, o que pode conduzir a uma sobrestimativa da predação pelos protozoários, pois, *in vivo*, os protozoários também ingerem proteína da dieta, o que reduz a sua capacidade de ingestão de bactérias (WALLACE e MCPHERSON, 1987; WELLS e RUSSELL, 1996a). Mesmo o facto da concentração de amoníaco no rúmen ser, quase sempre, mais baixa na ausência de protozoários pode dever-se à fácil lise dos protozoários, podendo o amoníaco adicional ser derivado da degradação dos protozoários e não da degradação das bactérias (ABE *et al.*, 1981; LENG, 1982; COLEMAN, 1985; WELLS e RUSSELL, 1996a). Com efeito, em estudo realizado por KOENIG *et al.* (2000) a reciclagem intra-ruminal de N amoniacal e a reciclagem de N amoniacal da ureia plasmática não foram afectadas pela defaunação.

Além disso, a capacidade dos protozoários do rúmen ingerirem bactérias aderidas ou livres é discutível. A ingestão de partículas sólidas de alimento pelos protozoários é bem conhecida, sendo de esperar que resulte, também, na ingestão de bactérias aderidas a essas partículas. Alternativamente, a aderência das bactérias a partículas de plantas pode servir para as proteger da predação por protozoários, sendo esta hipótese confirmada por observações de que após defaunação, as bactérias não fibrolíticas aumentam em maior extensão do que as bactérias aderidas (WEIMER, 1992). Contudo, a preferência dos protozoários por amido e açúcares resultará numa maior disponibilidade de amido e de

açúcares em relação à fibra após a defaunação e, então, num menor aumento das bactérias fibrolíticas aderidas.

DIJKSTRA *et al.* (1998) representaram num modelo alguns processos que contribuem para a reciclagem de matéria microbiana: ingestão de bactérias amilolíticas e fibrolíticas pelos protozoários, ingestão de protozoários por outros protozoários e lise de protozoários relacionada com a disponibilidade de substrato. A captura de bactérias e de protozoários foi representada por equações de *Michaelis-Menten*. Este modelo considera que as bactérias amilolíticas e fibrolíticas são ingeridas na proporção em que se encontram presentes e assume uma relação sigmoide entre a taxa de morte dos protozoários e a quantidade relativa de AGV produzidos pela fermentação do substrato pelos protozoários. Os autores verificaram que o N microbiano total no rúmen aumenta em maior extensão do que a renovação de N microbiano em dietas com elevada inclusão de forragem, observando-se o inverso nas dietas com maior quantidade de alimento concentrado. Este aumento mais rápido na renovação do N com o aumento da ingestão diária e nas dietas com maior quantidade de concentrado, resulta de reduções menos marcadas na proporção de N de protozoários no N microbiano do rúmen e do aumento mais rápido na taxa fraccional de morte dos protozoários.

2.4.2.5. Outros factores

O aumento das taxas de diluição das fases líquida e sólida do rúmen permite aumentar a eficiência de síntese de proteína microbiana, por aumentar a probabilidade dos microrganismos abandonarem o rúmen antes da sua lise e renovação (ISAACSON *et al.*, 1975; KENNEDY e MILLIGAN, 1978). Conquanto alguns sistemas de formulação de regimes alimentares para animais ruminantes, tal como o AFRC (1993), incorporem, já, este efeito da taxa de diluição na eficiência de síntese de proteína microbiana, a taxa é estimada, através de equações empíricas, a partir do nível de ingestão dos animais.

Apesar de termos referido vários factores passíveis de influenciar a reciclagem intra-ruminal de N, a solução mais atractiva, do ponto de vista prático, consiste, certamente, na modificação das taxas de diluição ruminais através da redução do tamanho de partícula ou pela adição de sais (um estudo mais pormenorizado da influência da adição de sais nas taxas de diluição ruminais foi apresentado por SEQUEIRA, 1988).

2.5. NATUREZA DO SUBSTRATO ENERGÉTICO

Embora a quantidade de energia potencialmente fermentável no rúmen constitua um dos factores que mais influencia a produção de proteína microbiana, este parâmetro é, também, afectado pela natureza do hidrato de carbono utilizado como substrato energético (FIGURA 2.7). Com efeito, as bactérias celulolíticas, dado possuírem menores custos de manutenção, são as mais eficientes, mas os substratos energéticos rapidamente fermentáveis melhoram a eficiência de crescimento microbiano, uma vez que reduzem os custos de manutenção graças à maior taxa de fermentação. Contudo, quando são adicionadas à dieta grandes quantidades de amido, as taxas de digestão da fase líquida aumentam e os organismos amilolíticos, como o *Streptococcus bovis*, desviam a produção de acetato, via pela qual obtém quatro unidades de ATP por unidade de glicose fermentada, para a produção de lactato, obtendo, desta forma, apenas duas unidades de ATP por unidade de glicose. Esta estratégia, apesar de menos eficiente em termos de produção de ATP, proporciona a estes microrganismos um ambiente mais favorável para o seu crescimento, reduzindo a população fibrolítica (VAN SOEST *et al.*, 1991).

Por outro lado, sendo o amido o substrato energético preferido dos protozoários, o aumento do nível de amido na dieta pode aumentar o número de protozoários (ABE e IRIKI, 1978; DENNIS *et al.*, 1983; MEYER *et al.*, 1986; DE SMET *et al.*, 1992; FRANZOLIN e

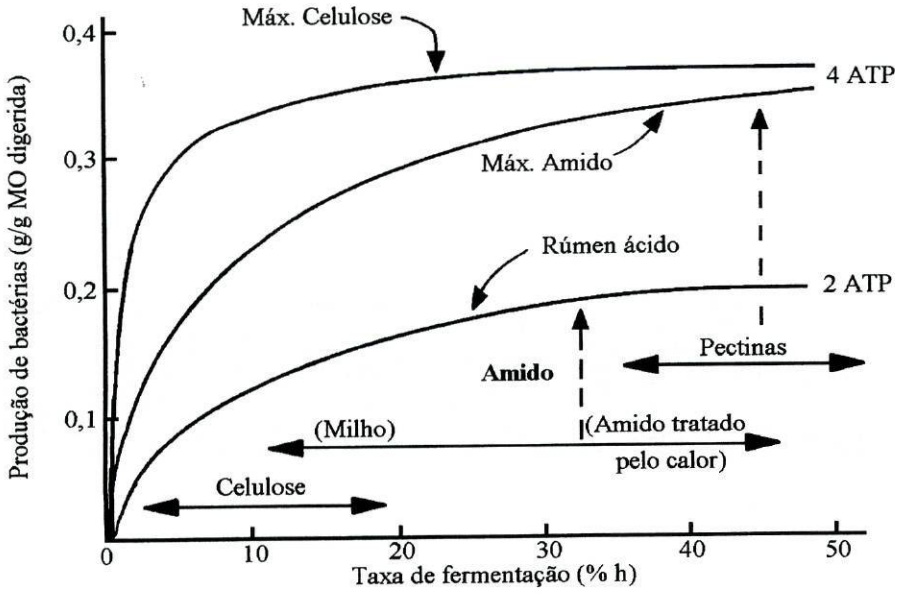


FIGURA 2.7 – Relação entre a quantidade de proteína microbiana produzida por unidade de substrato fermentado e a taxa de fermentação no rúmen.
ADAPTADO DE VAN SOEST *et al.* (1991).

DEHORITY, 1996) e, consequentemente, dietas com níveis de inclusão de alimentos concentrados de 40-60% na MS são as que, provavelmente, permitem maximizar a população de protozoários no rúmen (TOWNE *et al.*, 1988). Todavia, como a ingestão de amido pelos protozoários é, também, acompanhada pela predação selectiva das bactérias amilolíticas que se aderem aos grânulos de amido, os protozoários têm um efeito negativo nas bactérias amilolíticas, diminuindo a eficiência de síntese de proteína microbiana (COLEMAN e SANDFORD, 1980; DEMEYER e VAN NEVEL, 1986; COLEMAN, 1989; USHIDA *et al.*, 1991; IVAN *et al.*, 2000). Aspectos que, aliados ao facto de os protozoários diminuírem a taxa e a extensão de digestão do amido no rúmen, alterando o local de digestão do amido para o intestino delgado, têm um efeito importante na moderação de processos de acidose no rúmen associados a dietas com elevado teor neste hidrato de carbono (MENDOZA *et al.*, 1993; VAN SOEST, 1994).

A existência de protozoários no rúmen favorece, ainda, a digestão da celulose (DEMEYER e VAN NEVEL, 1986; COLEMAN, 1992) por, provavelmente, aumentar o fornecimento de amoníaco às bactérias celulolíticas (USHIDA e KOJIMA, 1991) e por estes microrganismos apresentarem elevada actividade celulolítica (COLEMAN, 1992; NAGARAJA *et al.*, 1992; HIDAYAT *et al.*, 1993), resultando a presença de protozoários ciliados em fermentações mais estáveis, em superiores concentrações ruminais de amónia (LINDSAY e HOGAN, 1972; VEIRA, 1986; BROUDISCOU *et al.*, 1994; IVAN *et al.*, 2000) e em número inferior de bactérias, bem como em alterações na MS, no volume líquido e na taxa de renovação dos conteúdos ruminais (VEIRA, 1986). Apesar do número de bactérias que utilizam lactato normalmente aumentar com a defaunação, a sua proporção na população bacteriana total tende a permanecer inalterada (NEWBOLD *et al.*, 1986).

Mas, se a ingestão de partículas de amido pelos protozoários for elevada pode ocorrer lise, sendo esta uma das razões porque dietas com elevado teor em amido podem levar à eliminação dos protozoários do rúmen, embora certos animais, nestas condições, sejam capazes de manter uma população de ciliados no rúmen, orientando a fermentação para uma maior produção de ácido butírico, característica da maior resistência à depressão do teor em gordura do leite (VAN SOEST, 1994).

As pectinas, ainda que constituam os polissacáridos com taxa de digestão mais elevada, não afectam negativamente a população fibrolítica, devido a não conduzirem à produção de ácido láctico e à estrutura do ácido galacturónico que, ao possuir elevada capacidade de troca catiónica e de ligações a iões metálicos, proporciona às pectinas

elevado poder tampão (VAN SOEST *et al.*, 1991).

O aumento da MO fermentável no rúmen em relação ao N degradável aumenta, por outro lado, a actividade proteolítica no rúmen, como demonstra o trabalho de SALES-DUVAL e BLANCHART (2001). Estes autores forneceram, a ovelhas, dietas com diferentes relações N fermentável/energia fermentável (144 g N fermentável kg^{-1} energia fermentável e 126 g N fermentável kg^{-1} energia fermentável) e verificaram que a taxa de desaparecimento das proteínas solúveis foi 2,5 vezes superior e as concentrações de amoníaco significativamente inferiores na dieta com menor relação N fermentável/energia fermentável, tendo, também, a actividade proteolítica total, considerando todos os compartimentos bacterianos, sido significativamente superior nessa dieta. Estas diferenças podem explicar-se por diferenças na actividade proteolítica total nas fases sólida e líquida do rúmen, tais como a superior actividade exopeptidase na fase líquida e maior diversidade de actividades endopeptidase na fase sólida do conteúdo ruminal de animais alimentados com dietas com menor relação N fermentável/energia fermentável. Contrariamente, RUSSELL *et al.* (1983) observaram que, quer a disponibilidade de hidratos de carbono, quer a taxa de crescimento bacteriano, tiveram pouca influência na proteólise e na acumulação de péptidos, estando a produção de amoníaco sempre inversamente relacionada com a taxa de fermentação dos hidratos de carbono.

Assim sendo, para se atenuar a competição pelos substratos, torna-se importante o fornecimento, na dieta, de diferentes fontes de hidratos de carbono. Mais ainda, as proporções de AGV produzidos no rúmen variam com a fonte de energia, aspecto relevante, dado as suas diferentes funções ao nível do animal hospedeiro. Daqui decorre que consoante for o objectivo de produção, a escolha deve recair em diferentes equilíbrios entre os vários substratos energéticos, pois, é sabido que alimentos ricos em pectinas e em hidratos de carbono estruturais tendem a aumentar a relação acetato/propionato, enquanto os ricos em amido tendem a diminui-la (*e.g.*, SCHAIBLY e WING, 1974; WING, 1975; SUTTON *et al.*, 1987; BEN-GHEDALIA *et al.*, 1989; NENGOMASHA, 1992; KENNELLY *et al.*, 1999; MOWREY *et al.*, 1999), sendo os efeitos na proporção molar de butirato e, mesmo, na relação acetato/propionato, em ambos os casos, nem sempre consistentes (HENNING *et al.*, 1980; ESTEVES *et al.*, 1987; FONSECA *et al.*, 2001). Saliente-se, ainda, que a escolha é dificultada dado existirem diferenças na proporção de AGV e de proteína microbiana produzidos no rúmen entre as forragens e os ingredientes dos alimentos concentrados (*e.g.*, MURPHY *et al.*, 1982; DE VISSER, 1993; BOSS e BOWMAN, 1996; HRISTOV e BRODERICK,

1996; VAN BARNEVELD, 1999).

HOOVER e STOKES (1991), baseados em estudos *in vitro* e *in vivo*, referem que a taxa de digestão dos hidratos de carbono é o factor principal que controla a disponibilidade de energia para o crescimento microbiano. À medida que o nível de NSC aumenta na dieta, o aumento concomitante da quantidade ingerida de hidratos de carbono, aumenta a produção diária de proteína microbiana através do fornecimento de mais energia para o seu crescimento, o que tem possíveis efeitos na produção de leite. Com efeito, BEAUCHEMIN *et al.* (1997) obtiveram relações curvilíneas entre a ingestão de amido degradável no rúmen (RDS; kg dia^{-1}) e a produção de leite:

Produção de leite (kg dia^{-1}) = -5,59 + 23,37 x RDS – 4,31 x RDS^2;

FCM (kg dia^{-1}) = -1,86 + 18,52 x RDS – 3,45 x RDS^2;

onde as produções máximas de leite e de leite corrigido para o teor em gordura (FCM) se obtêm quando a ingestão de RDS iguala 2,7 kg dia^{-1}, verificando-se a partir deste nível uma diminuição da produção de leite. Contrariamente, NOCEK e TAMMINGA (1991) referem que a máxima produção de leite é obtida maximizando a ingestão de RDS. Isto porque, embora o amido digerido por processos enzimáticos possa ser usado mais eficientemente para a produção de leite do que o amido fermentado no rúmen, não existe evidência de que a digestão pós-ruminal do amido aumente a produção de leite. Estes autores referem, ainda, que parece não haver limitações à digestão do amido no intestino, pois esta aumenta com o aumento da quantidade de amido que escapa à degradação no rúmen e relacionaram a produção de leite, para igual ingestão de energia *net* para a lactação (NE_L), com a ingestão de RDS (kg dia^{-1}) e com a ingestão de amido que é digerido no intestino (IDSI; kg dia^{-1}), de acordo com a seguinte equação:

Produção de leite (kg dia^{-1}) = 6,07 + 0,55 x NE_L + 0,48 x RDS + 2,28 x IDSI.

Contudo, o aumento dos NSC na dieta não melhora necessariamente a produção de proteína microbiana na vaca leiteira, uma vez que a quantidade necessária destes substratos depende, entre outros factores, da natureza e do nível da fonte proteica, da taxa de renovação ruminal e do pH (STERN *et al.*, 1994).

2.5.1. Efeito "pH"

Em situações de produção em que a taxa de fermentação dos hidratos de carbono a

AGV ultrapassa a capacidade das paredes do rúmen para absorverem AGV, a passagem de AGV para os compartimentos posteriores e o poder tampão da saliva – situações típicas de inclusão de níveis elevados de açúcares e de amido na dieta – verifica-se uma acumulação de AGV no rúmen que, em conjunto com a produção de ácido láctico, induz uma diminuição do pH deste compartimento. A esta diminuição estão, geralmente, associadas reduções na digestibilidade da MS e das paredes celulares (*e.g.*, MACGREGOR *et al.*, 1983; DIXON, 1986; KOVACIK *et al.*, 1986; GRANT e MERTENS, 1992; SMET *et al.*, 1995; KALSCHEUR *et al.*, 1997a; DIJKSTRA *et al.*, 1998; KENNELLY *et al.*, 1999; KHORASANI e KENNELLY, 2001; NOCEK *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002), bem como reduções na relação acetato/propionato e, consequentemente, no teor em gordura do leite (*e.g.*, GAYNOR *et al.*, 1995; KALSCHEUR *et al.*, 1997a; KENNELLY *et al.*, 1999; KHORASANI e KENNELLY, 2001).

A diminuição da digestibilidade da fibra tem sido atribuída à diminuição da actividade celulolítica dos microrganismos do rúmen, que é totalmente inibida quando o pH do rúmen desce para valores inferiores a 6 (EL-SHAZLY *et al.*, 1961; HENNING *et al.*, 1980; MOULD e ØRSKOV, 1983/1984; DIXON, 1986; ØRSKOV, 1994; VAN SOEST, 1994; VARGA e KOLVER, 1997; WEIMER *et al.*, 1999); à diminuição da capacidade de aderência das bactérias fibrolíticas às partículas (CHENG *et al.*, 1980); e à diminuição da taxa de divisão destas bactérias como resultado da maior necessidade de energia para manter a força de protões através da membrana celular, isto é, do aumento do custo energético de manutenção das células (RUSSELL e DOMBROVSKI, 1980). Contudo, CALSAMIGLIA *et al.* (2002) concluíram, recentemente, que situações constantes de pH baixo diminuem a digestibilidade da fibra e da proteína e aumentam o fluxo total de aminoácidos para o abomaso, mas diminuições transitórias de pH têm efeitos pequenos ou insignificantes (QUADRO 2.10). Estes resultados sugerem que as bactérias fibrolíticas são capazes de sobreviver a condições de pH transitoriamente baixo, não sendo a fermentação microbiana, em geral, afectada, podendo estas condições serem, mesmo, benéficas em termos de nutrição proteica, pois podem aumentar o fluxo de N não amoniacal e de aminoácidos essenciais para o abomaso. Não esquecer, porém, como já referido, que períodos longos de pH baixo podem diminuir a digestão da fibra, a disponibilidade de energia e reduzir a ingestão voluntária.

O período de adaptação dos animais a dietas ricas em amido pode, também, ser importante, como demonstra o estudo realizado por MATTHÉ *et al.* (2003). Estes autores forneceram, a vacas, uma dieta rica em amido e verificaram um aumento significativo do

QUADRO 2.10 – Efeitos do pH e da sua flutuação na digestibilidade da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO) e da fibra de detergente neutro (NDF) e ácido (ADF), no metabolismo azotado dos microrganismos do rúmen e no fluxo total de aminoácidos (AA).

	Tratamento[1]				
	HH	LL	HL	H2L	EP†
Digestão, %					
Aparente					
MS	46,3[a]	39,2[b]	44,2[ab]	43,7[ab]	1,5
MO	38,8	34,3	36,4	38,6	1,2
Verdadeira					
MS	60,5	57,9	56,1	57,4	1,4
MO	52,3	47,3	52,5	53,1	1,5
NDF	53,8[a]	34,3[b]	46,1[a]	53,3[a]	2,1
ADF	51,7[a]	29,1[b]	45,3[a]	54,3[a]	2,5
$N\text{-}NH_3$, mg 100 ml^{-1}	20,4[a]	11,9[c]	15,8[b]	17,8[ab]	0,8
Fluxo de N, g dia^{-1}					
Total	3,24	3,38	3,29	3,26	0,07
Amoniacal	0,69[a]	0,39[c]	0,53[b]	0,59[ab]	0,03
Não amoniacal	2,55[b]	2,99[a]	2,76[ab]	2,66[ab]	0,08
Bacteriano	1,20	1,21	1,33	1,14	0,06
Da dieta	1,35[b]	1,77[a]	1,43[b]	1,52[ab]	0,06
Digestão intestinal, %	78,3	82,4	79,1	79,5	
Degradação da PB	55,6[a]	41,6[b]	56,0[a]	49,9[ab]	2,1
EMPS[2]	23,0	25,7	25,3	21,6	1,2
Fluxo total de AA, mg dia^{-1}	19,07	22,59	22,13	20,08	1,13

[a,b,c]Médias na mesma linha com diferentes notações são significativamente diferentes ($P<0,05$);
[1]HH = pH elevado; LL = pH baixo; HL = Ciclos de 4 horas de pH elevado e 4 horas de pH baixo; H2L = pH elevado, excepto durante dois ciclos por dia de pH baixo;
[2]Eficiência de síntese de proteína microbiana (g N kg^{-1} MO verdadeiramente digerida);
†Erro padrão.
ADAPTADO DE CALSAMIGLIA *et al.* (2002).

pH (5,4 *versus* 5,9) e uma diminuição significativa na concentração total de AGV (144,1 mmol l^{-1} *versus* 134,3 mmol l^{-1}) no rúmen quando o período de adaptação à dieta aumentou de 16 para 37 dias. Não observaram, contudo, qualquer efeito significativo nas proporções molares de AGV. Mas, a digestibilidade da MO e do amido no rúmen foram superiores quando o período de adaptação à dieta aumentou de 21 para 42 dias, tendo a digestibilidade da PB apresentado tendência para diminuir.

A redução da digestibilidade da fibra no rúmen, com dietas ricas em amido, pode aumentar a fracção do amido e da dieta que escapa à fermentação no rúmen, tornando a digestão/fermentação no intestino mais importante (RUSSELL *et al.*, 1981; DEGREGORIO *et al.*, 1982; ZINN e OWENS, 1983; SICILIANO-JONES e MURPHY, 1989a e 1989b). Mas, embora a extensão potencial de fermentação da fibra no intestino grosso seja considerável (HOOVER, 1978), o seu volume relativamente pequeno e a elevada taxa de passagem podem limitar os fenómenos de compensação digestiva (GALYEAN e OWENS, 1991).

A diminuição do pH do rúmen afecta, também, as bactérias pectinolíticas, as metanogénicas (STROBEL e RUSSELL, 1986; VAN SOEST, 1994) e as proteolíticas (VAN SOEST, 1994), assim como os protozoários ciliados (EADIE e MANN, 1970; LATHAM *et al.*, 1971; VANCE *et al.*, 1972; ABE *et al.*, 1973; MACKIE *et al.*, 1978; LYLE *et al.*, 1981; VAN SOEST, 1994). Contudo, alguns trabalhos demonstram que o pH nem sempre tem efeito negativo no número de protozoários no rúmen (SLYTER *et al.*, 1970; FURCHTENICHT e BRODERICK, 1987; TOWNE *et al.*, 1990; FRANZOLIN e DEHORITY, 1996). A manutenção de uma população protozoária funcional em animais alimentados com dietas com elevada inclusão de alimentos concentrados (>90%) pode, além do pH, estar, ainda, relacionada, entre outros factores, com condições fisiológicas como a taxa e a extensão de produção de saliva e a taxa de passagem das fracções líquida e sólida em cada animal (CHRISTIANSEN *et al.*, 1964; KREIKEMEIER *et al.*, 1990; FRANZOLIN e DEHORITY, 1996), com o tipo de protozoários, uma vez que os *Entodinia* são mais tolerantes a condições de pH baixo e têm taxas de crescimento mais rápidas, permanecendo no rúmen de animais alimentados com elevadas percentagens de amido (LATHAM *et al.*, 1971; VANCE *et al.*, 1972; ABE *et al.*, 1973; MACKIE *et al.*, 1978; LYLE *et al.*, 1981; VAN SOEST, 1994) e, com a fonte de N (DENNIS *et al.*, 1983).

O possível efeito negativo de dietas ricas em amido no número de bactérias proteolíticas e de protozoários ciliados e, consequentemente, na actividade proteolítica e amilolítica, pode ser ultrapassado, pelo menos parcialmente, pelo aumento das bactérias amilolíticas, mais tolerantes a pH baixo (RUSSELL e DOMBROWSKI, 1980; THERION *et al.*, 1982; VAN SOEST, 1994). Estas bactérias possuem, também, em geral, actividade proteolítica (USHIDA *et al.*, 1991; MCALLISTER *et al.*, 1993; MENDOZA *et al.*, 1993), aumentando a relação propionato/acetato (BIRD e LENG, 1978; MENDOZA *et al.*, 1993; BROUDISCOU *et al.*, 1994). Não obstante a degradabilidade das proteínas ser, geralmente, inferior em animais defaunados, o efeito dos protozoários é superior quando a solubilidade da proteína é baixa (USHIDA e JOUANY, 1985; WALLACE *et al.*, 1987; USHIDA e KOJIMA, 1991). Isto porque o efeito dos protozoários é maior na fracção insolúvel das proteínas, dada a maior capacidade dos protozoários para digerirem as partículas sólidas e bactérias suspensas na fase líquida, estando as bactérias mais envolvidas na fermentação de compostos azotados solúveis (MATHIEU *et al.*, 1995).

A eliminação dos protozoários aumenta o número de bactérias amilolíticas que, ao degradarem rapidamente o amido, produzem AGV a taxas elevadas que diminuem o pH do

rúmen e, assim, o número de bactérias celulolíticas. Mas, segundo USHIDA *et al.* (1991) a relação entre os protozoários e as bactérias celulolíticas depende da natureza da dieta (sem ou com suplementação com alimentos concentrados) e do tipo de protozoários presente no rúmen. Assim, a eliminação dos protozoários no rúmen diminui a digestão da fibra no rúmen, variando o efeito entre forte inibição (50%) a leve estimulação (15%) (DEMEYER, 1989; YANG e VARGA, 1993; JOUANY, 1994), sendo os efeitos negativos mais importantes em dietas com elevada incorporação de amido (USHIDA *et al.*, 1990 e 1991). A redução da actividade celulolítica pela eliminação dos protozoários pode, porém, ser parcialmente compensada pelo aumento da população de fungos (ROMULO *et al.*, 1989; HSU *et al.*, 1991). A redução do número de bactérias celulolíticas pode, também, diminuir a digestibilidade da fracção azotada ligada às paredes celulares ou encapsulada por estas (GANEV *et al.*, 1979; ØRSKOV *et al.*, 1983).

A diminuição do pH do rúmen associada a dietas com elevada inclusão de hidratos de carbono rapidamente fermentáveis pode ser contrariada pela inclusão, na dieta, de substâncias alcalinizantes ou com capacidade tampão. Estas substâncias afectam as condições ruminais aumentando o pH ou aumentando a resistência do fluído ruminal a alterações do pH (MOULD *et al.*, 1983/1984b; LE RUYET e TUCKER, 1992). Com efeito, vários são os trabalhos que mostram que a adição, à dieta, de substâncias alcalinizantes ou com capacidade tampão aumenta a ingestão de MS (BHATTACHANYA e WARNER, 1968; ERDMAN *et al.*, 1982; ROGERS *et al.*, 1985; WEST *et al.*, 1987; VICINI *et al.*, 1988), a produção de leite e a produção de gordura do leite (THOMAS *et al.*, 1984; ROGERS *et al.*, 1985; SOLORZANO *et al.*, 1989). Todavia, outros estudos há em que não foram observadas respostas positivas (DEPETERS *et al.*, 1984; AMARAL *et al.*, 1985; ROGERS *et al.*, 1985; PHILLIP e HIDALGO, 1989; PHILLIP e SIMPSON, 1992; FELLNER *et al.*, 2000). Estes resultados contraditórios podem ser explicados pelo tipo e teor de forragem na dieta porque em dietas, no mínimo, com 30% de forragem, os efeitos no pH do rúmen e na percentagem de gordura do leite são menos pronunciados (ERDMAN, 1988). Além das forragens poderem influenciar a produção de saliva durante a ingestão e a ruminação, a capacidade tampão inerente da forragem altera o pH do rúmen e o metabolismo ácido-base do animal (ERDMAN, 1988), sendo este facto particularmente importante em dietas à base de silagem de milho – forragem com elevado poder acidificante (DEWHURST *et al.*, 2001; WADHWA *et al.*, 2001a e 2001b).

Note-se, nesta matéria, que existe evidência experimental que demonstra a

preferência dos animais ruminantes por dietas que atenuem a acidose ruminal (PHY e PROVENZA, 1998a e 1998b). TOLKAMP *et al.* (1998a e 1998b) propuseram, com base nas conclusões de estudos de selecção da dieta em vacas leiteiras, que os ruminantes seleccionam a dieta com base no seu teor em ERDP e não em MP, evitando a ingestão de RDP em excesso. Esta teoria é suportada pelos factos da proteína microbiana representar a principal fonte de aminoácidos para o ruminante e do amoníaco resultante da degradação da fracção azotada da dieta que não é capturado pelos micróbios ser absorvido pelo animal e, sendo um composto tóxico, este ter de gastar energia para manter os níveis circulantes deste composto dentro de valores fisiológicos aceitáveis. JAMES *et al.* (2001) testaram a hipótese, em ovelhas em crescimento, de que os ruminantes seleccionam a dieta por forma a evitar um consumo excessivo de RDP, utilizando ureia como fonte de RDP em alimentos com diferente teor em PB, tendo colocado à disposição dos animais alimentos com diferentes teores em ureia (12,5 ou 25 g ureia kg^{-1} alimento). Mas, ao contrário do esperado, os animais mostraram preferência consistente para o alimento com maior concentração de ureia, independentemente do alimento a que foi adicionada, parecendo que o consumo excessivo de RDP na forma de ureia não foi minimizado, antes, pelo contrário, os animais seleccionaram dietas com claro excesso de RDP. Saliente-se, porém, que neste trabalho foram, apenas, oferecidos alimentos concentrados sem fontes de fibra com estrutura física, o que pode ter diminuído a ruminação e, consequentemente, a produção de saliva e o pH do rúmen. Assim sendo, as ovelhas poderiam estar a seleccionar a dieta não para o RDP, mas sim para o pH do rúmen, uma vez que a ingestão de ureia permite aumentar o pH.

Os trabalhos supradiscutidos ainda que sugiram que, quer a manutenção do pH do rúmen acima de um determinado valor, quer o evitar a ingestão excessiva de RDP, são dois objectivos-força na selecção da dieta dos animais ruminantes, não permitem tirar ilações quanto à prioridade de objectivos. Ou seja, quando estes dois objectivos entram em conflito, qual deles será prioritário? Na tentativa de dar resposta a esta questão, JAMES *et al.* (2002) realizaram um trabalho posterior, também em ovelhas, e verificaram que, quando bicarbonato de sódio foi adicionado aos alimentos, a necessidade de ureia como tampão reduziu-se e, consequentemente, os animais passaram a seleccionar dietas com menor teor em ureia. Daqui decorre que a necessidade que o ruminante tem em manter o pH do rúmen próximo da neutralidade parece ser um objectivo prioritário em relação à excessiva ingestão de RDP, e, quem sabe, em relação a outros objectivos-força na selecção

da dieta.

As substâncias tampão podem, ainda, desempenhar um papel importante no metabolismo azotado do animal. Isto porque, em situações de acidose metabólica, a proteína corporal pode ser catabolizada para gerar bicarbonato e, desta forma, restaurar o equilíbrio ácido-base. Nestas condições, a adição de bicarbonato de sódio à dieta pode diminuir a degradação da proteína corporal, reduzir a excreção de N na urina e melhorar o balanço azotado (HANNAFORD *et al.*, 1982), embora esta melhoria nem sempre se verifique (PHILLIP, 1983; FELLNER *et al.*, 2000). Os suplementos proteicos utilizados, nomeadamente os bagaços de oleaginosas, caracterizam-se por um equilíbrio anião-catião positivo o que, com dietas ricas em alimentos concentrados, pode modificar consideravelmente a ingestão da vaca, em particular no início da lactação (DELAQUIS e BLOCK, 1995b). As proteínas podem, também, tamponar o sangue e o rúmen através do amoníaco, embora estes efeitos sejam menos pronunciados (FAVERDIN *et al.*, 2003). Este papel das proteínas na regulação do pH pode explicar, parcialmente, o facto de nalguns estudos se ter observado uma menor resposta em termos de ingestão à adição de proteína a dietas com substâncias tampão (RICO-GOMEZ e FAVERDIN, 2001).

O menor ou nulo crescimento de algumas bactérias em condições de pH baixo pode, também, advir do efeito tóxico dos AGV (WOLIN, 1969; WALLACE *et al.*, 1989; DIJKSTRA *et al.*, 1998). Tradicionalmente, o efeito antimicrobiano dos AGV tem sido explicado pela diminuição do pH e pela inibição metabólica provocada pelas moléculas indissociadas dos ácidos (JAY, 1992 citado por RUSSELL e WILSON, 1996), mas a proposta da teoria quimiosmótica nos anos sessenta (MITCHELL, 1961) e a demonstração de que as bactérias possuem gradientes de pH e eléctricos através das suas membranas celulares permitiram fornecer uma explicação mais mecanística do efeito antimicrobiano dos AGV com base no desacoplamento. Esta teoria considera que classes de ácidos sintéticos são capazes de tornar as células desacopladas ao transportar protões através da membrana, libertando-os no interior das células e dirigindo o anião associado com a membrana para a superfície externa que, de seguida, é protonado, continuando o ciclo até a força motivada por protões ser dissipada (FIGURA 2.8; RUSSELL e WILSON, 1996).

Esta teoria apresenta, contudo, algumas lacunas. Com efeito, os aniões dos AGV são substâncias hidrofílicas que possivelmente não ultrapassam a membrana, ao contrário dos aniões sintéticos que são lipofílicos (FIGURA 2.9) e as substâncias sintéticas são tóxicas para todas as bactérias, ao passo que estas têm sensibilidade variada aos AGV (RUSSELL,

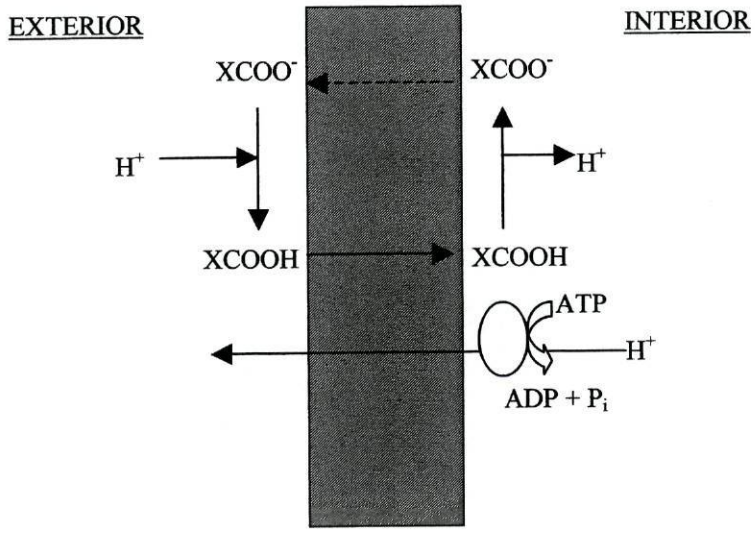


FIGURA 2.8 – Representação esquemática de um desacoplador (XCOOH) e a sua capacidade de translocação de protões através da membrana celular da bactéria.
ADAPTADO DE RUSSELL e WILSON (1996).

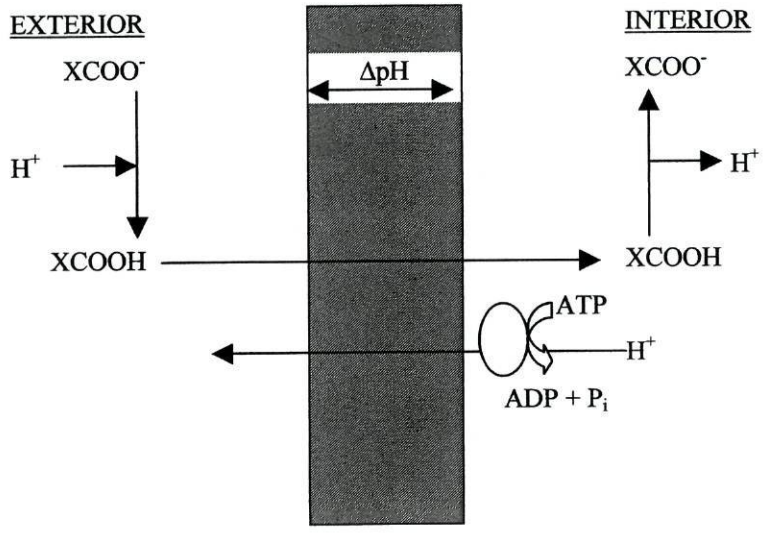


FIGURA 2.9 – Efeito do gradiente de pH através da membrana celular (ΔpH) na acumulação intracelular de aniões de ácidos gordos voláteis ($XCOO^-$).
ADAPTADO DE RUSSELL e WILSON (1996).

1992). Sublinhe-se, porém, que as bactérias resistentes ao pH ácido desenvolveram as capacidades de diminuir o seu pH intracelular, de manter um pequeno gradiente de pH através da membrana e de evitar a acumulação intracelular de aniões de AGV e que as bactérias celulolíticas são incapazes de crescer a pH intracelular baixo, levando o aumento do gradiente de pH à toxicidade por aniões (RUSSELL e WILSON, 1996).

2.5.2. Efeito "hidrato de carbono"

Na secção anterior ficou claro que a menor digestibilidade da fibra associada a dietas ricas em hidratos de carbono rapidamente fermentáveis pode explicar-se pela diminuição do pH do fluído ruminal, isto é, pelo efeito "pH", mas depende, também, do efeito "hidrato de carbono" (MOULD e ØRSKOV, 1983/84). Isto porque quando se adicionam à dieta substâncias tampão, que aliviam a descida do pH do rúmen, a digestão da fibra pode continuar a ser deprimida pela fermentação dos NSC (MOULD *et al.*, 1983/1984b; WESTON, 1988). Com efeito, vários autores (CHASE e HIBBERD, 1987; HIGHFILL *et al.*, 1987; ZORRILLA-RIOS *et al.*, 1989; PORDOMINGO *et al.*, 1991; FONSECA *et al.*, 2001; GOMES, 2001) observaram, em dietas à base de alimentos fibrosos suplementadas com NSC, reduções na digestibilidade da fibra não atribuídas ao efeito "pH", mas sim a possíveis interacções negativas entre alimentos explicadas pelo efeito "hidrato de carbono".

O efeito "hidrato de carbono" está relacionado com os diferentes substratos energéticos, com as espécies microbianas que os utilizam e com as interacções entre estes microrganismos e as bactérias celulolíticas (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995). Obviamente, se o efeito "hidrato de carbono" não é fácil de definir, é, ainda, mais difícil de medir. Todavia, STROBEL e RUSSELL (1986) consideram que o pH tem um efeito superior no padrão de fermentação do que o tipo de hidrato de carbono.

O efeito da fermentação dos hidratos de carbono rapidamente fermentáveis na digestão da fibra no rúmen depende, assim, da taxa de fermentação do hidrato de carbono, da taxa de fermentação dos outros componentes da dieta, da capacidade tampão do rúmen, do nível de suplementação e da maior competição por nutrientes essenciais promovida pelos NSC entre os microrganismos fibrolíticos e os responsáveis pela fermentação dos NSC (MULHOLLAND *et al.*, 1976; MOULD *et al.*, 1983/1984a; VAN SOEST, 1994; CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995). Como os microrganismos fibrolíticos são menos competitivos têm maior dificuldade em se reproduzir a taxas suficientemente elevadas para se manterem no rúmen, pelo que o seu número tende a diminuir e, consequentemente, a degradação da fibra é reduzida (MOULD *et al.*, 1983/1984a; VAN SOEST, 1994). Curiosamente, há mais de 30 anos EL-SHAZLY *et al.* (1961) propuseram que a digestão da celulose será deprimida por um inibidor produzido pelos microrganismos amilolíticos e por uma dominância da microflora que fermenta o amido na população ruminal, referindo CHALUPA (1968) que a competição pelo N entre os grupos de bactérias celulolíticas e

amilolíticas é o principal factor envolvido na inibição da digestão da celulose por amido, parecendo que a ureia constitui a melhor fonte de N para aliviar esta inibição!

A fonte glucídica da dieta, por poder diminuir a actividade celulolítica, pode, também, afectar a degradação da fracção azotada da dieta. GUEDES (2001) estudou o efeito da fonte de hidratos de carbono, na dieta, na degradação *in sacco* da proteína de fontes proteicas de origem vegetal (n = 15) e de origem animal (n = 5). Nesse estudo, os animais foram alimentados com uma dieta controlo constituída por feno de prado natural suplementado com bagaço de soja (83/15, na MS) substituindo parte do feno por 36, 34 e 40% de polpa de beterraba, de milho ou de trigo na MS da dieta, respectivamente. A polpa de beterraba teve um efeito positivo na degradação *in sacco* da proteína, em particular das fontes proteicas com níveis elevados de N solúvel ou insolúvel, mas não ligado à fibra. A variação diurna do pH e os níveis de amoníaco no rúmen nesta dieta sugeriram a existência de maior sincronismo entre a libertação de energia e de N no rúmen e, provavelmente, maior crescimento microbiano. Pelo contrário, a suplementação com trigo ou milho, diminuiu a degradação da proteína, sobretudo das fontes proteicas de origem vegetal. Este efeito foi mais evidente com o trigo e pode ter sido devido à redução da população microbiana no rúmen e/ou à sua actividade proteolítica por esgotamento progressivo da fonte glucídica mais rapidamente fermentável (amido) após uma intensa actividade proteolítica nas primeiras horas após a ingestão das dietas com cereais. Os resultados deste estudo mostram, claramente, o efeito da fonte de hidratos de carbono na degradação *in sacco* da proteína, dependendo a natureza e a extensão deste efeito, quer da fonte de hidratos de carbono, quer da fonte de proteína.

2.6. EFEITO DAS NECESSIDADES DE MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS NA SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Os microrganismos do rúmen, à semelhança de qualquer biota, têm, também, necessidades em nutrientes para se manterem vivos. HESPELL e BRYANT (1979) definiram as necessidades de manutenção dos microrganismos como o desvio aparente ou real da energia e/ou do carbono do substrato limitante ao crescimento para processos que não resultam em aumento da massa celular. As necessidades de manutenção, segundo estes autores, contêm vários componentes: (1) energia para a motilidade; (2) energia e nutrientes para a renovação dos constituintes celulares; (3) energia e nutrientes para a produção de

proteínas extracelulares, de polímeros de hidratos de carbono, etc; (4) energia necessária para o transporte activo; (5) eficiência da fosforilação; (6) desacoplamento energético (*energetic uncoupling*); (7) lise e síntese *de novo* de células; e (8) factores desconhecidos; variando, em magnitude, cada componente em função do tipo de microrganismo e das condições ambientais de crescimento.

HESPELL e BRYANT (1979) referem, ainda, que os custos com a motilidade, a renovação, a formação de polímeros extracelulares e o transporte não contribuem, provavelmente, com mais de 15% para a diminuição dos valores teóricos de Y_{ATP} (g MS células microbianas formadas $mole^{-1}$ ATP gasto) ou para o total de ATP necessário para a formação das células. Com efeito, os valores teóricos de Y_{ATP} corrigidos para os custos energéticos com o transporte foram *ca* 13 a 20% inferiores aos valores não corrigidos (STOUTHAMER, 1973; QUADRO 2.11). A eficiência de fosforilação diz respeito ao grau relativo com que o ATP é formado *per se* a partir de reacções que geram ATP ou de processos associados, quer ao substrato, quer à fosforilação oxidativa, e o desacoplamento energético está relacionado com o grau relativo com que o ATP ou outros compostos energéticos produzidos por actividades catabólicas são utilizados pelas actividades anabólicas da célula (SENEZ, 1962). A explicação, mais simples, da ocorrência, na maioria das bactérias, do desacoplamento energético reside no facto do seu potencial para produzir energia a partir de processos catabólicos exceder grandemente o seu potencial para utilizar essa energia para fins biossintéticos (HESPELL e BRYANT, 1979). O desvio energético pode ser causado por ciclos fúteis de potássio, amónia ou protões através da membrana celular (RUSSELL e COOK, 1995).

QUADRO 2.11 – Influência das necessidades energéticas com o transporte e do meio de crescimento na produção de matéria seca de células microbianas por mole de ATP consumido (Y_{ATP}[1]).

Meio de crescimento	Y_{ATP}	Y_{ATP} corrigido para os custos energéticos com o transporte	Diminuição na Y_{ATP}, %
Complexo	39,1	31,9	18,4
Glicose/sais inorgânicos			
Basal	33,9	28,8	15,0
+ Aminoácidos	35,6	28,6	19,7
+ Bases de ácidos nucleicos	37,1	32,1	13,5
+ Aminoácidos e bases	39,2	31,9	18,6
- Glicose, + lactato	18,5	13,4	27,6 (53,5)[2]
- Glicose, + acetato	14,5	10,0	31,0 (65,3)[2]

[1]Assume que o transporte de uma mole de aminoácidos, de K^+, de NH_4^+, de HPO_4^{-2}, de lactato ou de acetato requer no mínimo 1,0, 0,5, 0,5, 1,0, 1,0 ou 1,0 mole de ATP, respectivamente.
[2]Percentagem de diminuição comparado com o valor de Y_{ATP} da glicose (28,8).
ADAPTADO DE STOUTHAMER (1973).

É evidente que, para se obter a máxima produção de células microbianas por unidade de nutrientes fornecidos, a taxa de produção de ATP pelas reacções de fermentação deve igualar, a todo o momento, a taxa de utilização pelas reacções biossintéticas, isto é, o desacoplamento energético deve ser minimizado. Um dos factores principais que pode, facilmente, regular o potencial biossintético geral das células é a natureza das fontes azotadas utilizadas para o crescimento, se o seu fornecimento for adequado. Concentrações baixas de amoníaco no rúmen podem produzir desacoplamento energético, nomeadamente por reduzirem a taxa de crescimento dos microrganismos (ISAACSON *et al.*, 1975; HESPELL e BRYANT, 1979). Por outro lado, níveis elevados de amoníaco por formarem bicarbonato de amónia e, consequentemente, aumentarem o pH do rúmen, podem permitir um melhor crescimento microbiano (HESPELL e BRYANT, 1979).

PIRT (1965) sugeriu a seguinte equação para determinação das necessidades de manutenção de bactérias em cultura contínua: $1/Y = M_s/\mu+1/Y_g$, onde Y representa a produção celular, μ a taxa de crescimento específico (MS sintetizada g^{-1} células microbianas secas h^{-1}), Y_g o crescimento microbiano máximo corrigido para a manutenção e M_s o coeficiente de manutenção. Dada a variação na produção de ATP por mole de substrato fermentado, VRIES *et al.* (1970) propuseram que a produção de ATP poderia ser determinada pela análise dos produtos de fermentação e STOUTHAMER e BETTENHAUSSEN (1973) modificaram a equação por forma a incluir a taxa de diluição.

ISAACSON *et al.* (1975) estimaram as necessidades de manutenção de culturas mistas de bactérias ruminais em 0,26 mmol glicose g^{-1} MS bacteriana e h^{-1}. Contudo, a ordem de grandeza dos valores pode variar, consideravelmente, com a espécie bacteriana em causa (HESPELL e BRYANT, 1979; RUSSELL e BALDWIN, 1979; JOUANY, 1994), bem como com as condições químicas no rúmen, nomeadamente de pH e de osmolalidade (HESPELL e BRYANT, 1979; RUSSELL e DOMBROWSKI, 1980; SHI e WEIMER, 1992; VAN SOEST, 1994). As bactérias anaeróbias estritas, quando comparadas com as anaeróbias facultativas, tendem a ter necessidades de manutenção menores (JOUANY, 1994). VAN SOEST (1994) refere, por exemplo, que os custos de manutenção do *Streptococcus bovis* é seis vezes superior aos do *Fibrobacter succinogenes*.

Já o pH baixo parece desviar a energia para funções microbianas que não o crescimento (FIGURA 2.10), sendo a energia libertada sob a forma de calor. Isto acontece porque à medida que o pH extracelular diminui, a quantidade de energia necessária para expelir protões do interior da célula aumenta. Mas, note-se que quando o amido ou

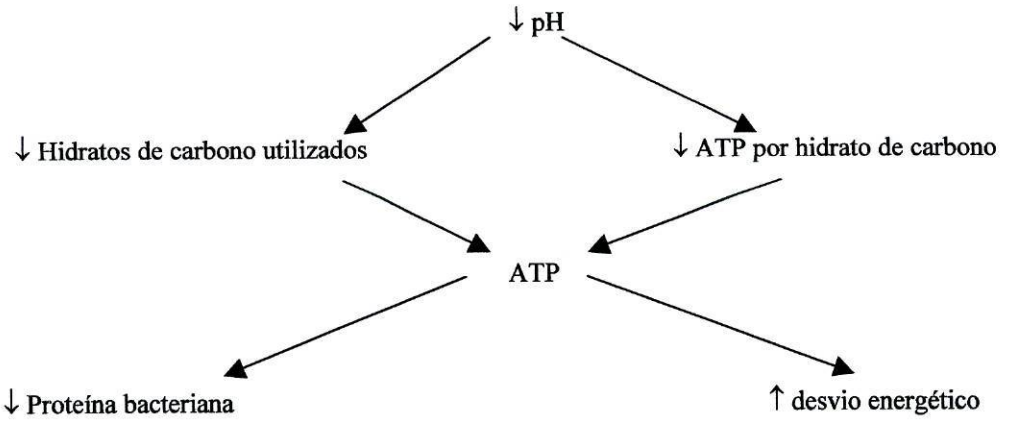


FIGURA 2.10 – Representação esquemática dos efeitos metabólicos potenciais que levam à redução da síntese de proteína bacteriana no rúmen em condições de pH baixo.
ADAPTADO DE STROBEL e RUSSELL (1986).

sacarose são utilizados como substratos as perdas de energia por desvio energético são insignificantes (STROBEL e RUSSELL, 1986), sendo de esperar valores superiores de desvio energético em situações em que predominem, no rúmen, microrganismos utilizadores de celobiose, de xilanas e de pectinas, podendo as diferenças no desvio energético reflectir a tolerância ao pH das bactérias que fermentam os vários hidratos de carbono (RUSSELL e DOMBROWSKI, 1980).

Por outro lado, quanto mais tempo um microrganismo permanecer no rúmen, maiores serão as suas necessidades de manutenção (ISAACSON *et al.*, 1975; RUSSELL e HESPELL, 1981; PRESTON e LENG, 1984) e quanto menor for a taxa de crescimento dos microrganismos maior será a proporção de substrato utilizado para manter as células microbianas vivas, o que resultará em menor produção de biomassa microbiana (HESPELL e BRYANT, 1979; RUSSELL e HESPELL, 1981). Assim sendo, na procura da máxima eficiência animal, devemos contrabalançar a digestibilidade total e a produção bacteriana para fornecer a máxima quantidade de nutrientes essenciais por unidade de tempo.

Conquanto as necessidades de manutenção dos microrganismos do rúmen sejam, geralmente, determinadas em condições de crescimento em que os hidratos de carbono são limitantes, existe evidência experimental de que as necessidades de manutenção são muito superiores quando o crescimento bacteriano é limitado por outros nutrientes que não hidratos de carbono (NEIJSSEL e TEMPEST, 1976), mormente em situações de défice em aminoácidos (VAN KESSEL e RUSSELL, 1996). Constatação que vai ao encontro do facto do

potencial dos micróbios para produzir energia a partir de processos catabólicos exceder o seu potencial para usar essa energia com fins biossintéticos, quando a disponibilidade de outros substratos que não os hidratos de carbono é limitada (HESPELL e BRYANT, 1979).

Concluindo, a partição do substrato disponível entre as necessidades de crescimento e de não crescimento influencia a eficiência de síntese de proteína microbiana, decorrendo daqui que as estratégias de alimentação da vaca leiteira devem permitir reduzir as necessidades de manutenção dos microrganismos do rúmen, por forma a que a eficiência de síntese de proteína microbiana e, consequentemente, a contribuição dos aminoácidos microbianos para a cobertura das necessidades em aminoácidos do animal sejam maximizadas.

2.7. CONCLUSÃO

Neste CAPÍTULO, após termos abordado, de forma resumida, os principais pressupostos dos sistemas de formulação de regimes alimentares para animais ruminantes mais vulgarmente utilizados (INRA, 1988; AFRC, 1993; NRC, 2001), tratámos e discutimos factores relacionados com a variação da disponibilidade de nutrientes azotados e energéticos passíveis de influenciar a função ruminal e, consequentemente, a resposta produtiva dos animais e que ou não são considerados por estes sistemas ou são-no, apenas, parcialmente.

A bibliografia consultada mostra que nenhum microrganismo específico ocupa o nicho de fermentador proteico no rúmen, o que representa um aspecto muito interessante da ecologia ruminal. Apesar do amoníaco representar a única fonte de N para alguns microrganismos, a concentração, no rúmen, de N amoniacal que permite o máximo crescimento microbiano não está, ainda, caso a caso, definida e, provavelmente, esta concentração pode ser diferente da requerida para a óptima digestão e ingestão dos alimentos. Outro aspecto importante reside no facto de os efeitos do tipo de nutrientes azotados na síntese de proteína microbiana dependerem do tipo de substrato energético presente, uma vez que o crescimento das bactérias amilolíticas parece ser estimulado pela presença de aminoácidos e/ou péptidos, enquanto as bactérias fibrolíticas podem não necessitar destes substratos para o máximo crescimento, apesar da resposta à adição de aminoácidos e de péptidos poder ser positiva devido à cobertura das suas necessidades em ácidos gordos de cadeia ramificada. Daqui decorre que, na formulação de regimes

alimentares, é fundamental ter presente que o crescimento microbiano varia com a fonte de N fornecido, devendo considerar-se a forma preferencial de N da população microbiana presente, num dado momento, no rúmen, não esquecendo que esta depende do tipo de substrato energético.

A reciclagem de N para o rúmen, ao permitir colmatar parcialmente o défice em N degradável, pode ser extremamente importante em animais alimentados com dietas de baixo teor em N. Já com dietas com um teor em N suficiente para satisfazer as necessidades dos microrganismos do rúmen e do animal hospedeiro, a reciclagem de N para o rúmen pode, também, ser benéfica na medida em que permite aumentar a sincronização das disponibilidades de N e de energia em períodos do dia em que o N disponível para os microrganismos é limitante ao seu crescimento. Assim sendo, a quantificação da reciclagem de N para o rúmen e a sua consideração aquando da formulação de regimes alimentares poderá contribuir para uma economia do N da dieta e para uma maior eficiência de utilização dos nutrientes.

A reciclagem intra-ruminal de N, por diminuir o fluxo de proteína microbiana para o duodeno, deve ser contrariada. Apesar de existirem vários factores passíveis de influenciar a reciclagem intra-ruminal de N, a solução mais atractiva, de um ponto de vista prático, consiste na modificação das taxas de diluição ruminais pela redução do tamanho de partícula e, eventualmente, pela adição de sais.

O aumento da MO fermentável aumenta, em geral, a actividade proteolítica no rúmen, sendo, no entanto, importante considerar a natureza do substrato energético. Isto porque, além dos produtos finais da digestão poderem ser diferentes e, consequentemente, poderem influenciar a resposta produtiva, os diferentes tipos de hidratos de carbono têm efeitos distintos na fermentação. A diminuição do pH do rúmen em resultado da maior inclusão de fontes de açúcares e de amido rapidamente fermentável na dieta pode acarretar uma diminuição da digestibilidade da fibra e diminuir a actividade proteolítica, que pode, contudo, ser parcialmente compensada pela proliferação de bactérias amilolíticas, mais tolerantes a condições de pH baixo. Mas, esta menor digestibilidade da fibra pode, além do efeito "pH", ser devida ao efeito "hidrato de carbono", que está relacionado com os diferentes substratos energéticos, com as espécies microbianas que os utilizam e com as interacções entre estes microrganismos e as bactérias celulolíticas. A natureza do substrato energético afecta, também, a degradação proteica no rúmen, dependendo a natureza e a extensão deste efeito, quer da fonte de hidrato de carbono, quer da fonte de proteína.

Aspecto que reforça a necessidade de se considerarem as interacções entre os substratos azotados e os substratos energéticos veiculados por uma determinada dieta.

Finalmente, a partição do substrato disponível entre as necessidades de crescimento e de manutenção dos microrganismos do rúmen influencia a eficiência de síntese de proteína microbiana. Assim, as estratégias de alimentação da vaca leiteira devem permitir reduzir as necessidades de manutenção dos microrganismos, por forma a que a eficiência de síntese de proteína microbiana e, consequentemente, a contribuição dos aminoácidos microbianos para a cobertura das necessidades em aminoácidos do animal sejam maximizadas.

"Synchronizing the availability of energy and nitrogen in the rumen is seen as offering considerable potential to enhance the output of microbial protein from the rumen in certain dietary circumstances, many of which are not uncommon in practice." (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995).

CAPÍTULO 3

Sincronismo entre as Disponibilidades de Azoto e de Energia no Rúmen

3.1. INTRODUÇÃO

Embora seja lugar comum afirmar-se que os microrganismos do rúmen necessitam de N e de energia para o seu crescimento, não basta, porém, incluir, na dieta, fontes indiferenciadas daqueles elementos. Assim, na alimentação da vaca leiteira tem de se reconhecer a importância de balancear o fornecimento de N (RDP) com o de energia (FME) e de considerar o sincronismo entre as disponibilidades de ambos.

O eventual assincronismo entre as taxas a que a energia e o N se tornam disponíveis conduz, quer à reduzida eficiência de captura de N pelos microrganismos, quer à ineficiente utilização do ATP produzido para o crescimento microbiano (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995). Com efeito, em dietas assíncronas, os picos de disponibilidade de N (sobretudo amoníaco), porque estão desfasados dos picos de energia disponível levam a uma considerável absorção de amoníaco no rúmen e à utilização dos aminoácidos como fonte de energia (NOCEK e RUSSELL, 1988). Por outro lado, quando a fermentação dos hidratos de carbono atinge o pico, o fornecimento ruminal de N, por ser marcadamente insuficiente, não permite a síntese de proteína microbiana, fazendo com que a fermentação ocorra largamente sem o crescimento de células microbianas (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995).

Conceptualmente, é possível alterar o sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, quer pela alteração dos ingredientes da dieta, quer pela alteração dos padrões de alimentação. A sincronização permitirá, pelo menos em termos teóricos,

maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes da dieta com o consequente aumento do fluxo de proteína microbiana para o duodeno e diminuir, assim, as necessidades de fornecimento de DUP. Neste CAPÍTULO passamos em revista os efeitos do sincronismo (entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen) alcançado pela alteração dos ingredientes da dieta e pela alteração dos padrões de alimentação, na função ruminal e na resposta produtiva de vacas leiteiras.

3.2. Alteração dos ingredientes

A sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen pode ser realizada alterando a fonte de energia, a fonte de N ou ambas. Note-se que a simples alteração da relação forragem/concentrado pode, também, ser considerada como uma forma de alteração do sincronismo. No entanto, esta aproximação depende de vários factores, como o nível de ingestão da forragem e a sua taxa de fermentação, a composição do alimento concentrado e o seu efeito na digestibilidade da forragem, que complicam a interpretação dos resultados (HAGEMEISTER *et al.*, 1981; RODE *et al.*, 1985; SNIFFEN e ROBINSON, 1987; MCALLAN *et al.*, 1988; YANG *et al.*, 2001). De facto, o efeito observado pode estar mais relacionado com a quantidade e a taxa de fermentação da MO no rúmen do que, especificamente, com a relação forragem/concentrado (CLARK *et al.*, 1992). Além disso, os escassos estudos, com vacas leiteiras, sobre a influência da relação forragem/concentrado, no fluxo de N para o duodeno, não conseguiram estabelecer uma relação óptima, o que sugere que a alteração dessa relação, no intervalo necessário para maximizar a produção de leite, não afecta significativamente a passagem de aminoácidos para o duodeno (RODE *et al.*, 1985; RODE e SATTER, 1988; KLUSMEYER *et al.*, 1991). Isto porque, quer a composição das forragens, quer a dos alimentos concentrados, podem contribuir para optimizar a fermentação no rúmen e a passagem de compostos azotados para o duodeno, podendo a simples alteração da relação forragem/concentrado modificar os efeitos pretendidos – maximização da fermentação no rúmen e passagem de aminoácidos e de outros nutrientes para o duodeno (CLARK *et al.*, 1992).

3.2.1. Fontes de amido de diferente degradabilidade

A maior parte dos estudos sobre os efeitos da alteração da fonte energética da dieta no sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen têm-se baseado na

utilização de fontes de amido de diferente degradabilidade. Com efeito, o objectivo principal da substituição de fontes de amido por fontes de fibra degradável tem sido o de avaliar o potencial destas na atenuação dos possíveis efeitos adversos daquelas (em particular quando rapidamente fermentáveis) na função ruminal e, consequentemente, na utilização produtiva dos nutrientes da dieta (FORSTER *et al.*, 1993; GALLOWAY *et al.*, 1993; GRIGSBY *et al.*, 1993; O'MARA *et al.*, 1997; LEIVA *et al.*, 2000; IPHARRAGUERRA *et al.*, 2002; HRISTOV e ROPP, 2003).

No âmbito dos efeitos do amido, os estudos mais recentes, sobretudo de autores americanos, têm-se centrado na comparação: (1) de grãos de diferentes espécies (mais frequentemente milho e cevada – alimentos bastante disponíveis e com taxas de degradação muito diferentes; NOCEK e TAMMINGA, 1991); (2) de grãos de diferentes variedades da mesma espécie; e, ainda, (3) de diferentes processamentos. Não existem, contudo, muitos estudos que se tenham debruçado, sobre os efeitos na função ruminal e na produtividade, em simultâneo.

No QUADRO 3.1 apresentam-se os resultados obtidos por vários autores sobre os efeitos da alteração da fonte de amido no pH, nas concentrações de AGV e de N amoniacal no rúmen, na digestão ruminal, pós-ruminal e total do amido, no N ingerido, nos fluxos de N (total, não amoniacal, não microbiano e microbiano) para o duodeno e na eficiência de síntese de proteína microbiana.

A análise comparativa dos estudos sumariados permite avançar com algumas relações gerais. Assim, o pH do fluído ruminal não é, em geral, afectado pela degradabilidade do amido (PLASCENCIA e ZINN, 1996; YANG *et al.*, 1997; CROCKER *et al.*, 1998; KNOWLTON *et al.*, 1998; BEAUCHEMIN *et al.*, 1999; GARCÍA *et al.*, 2000; KHORASANI *et al.*, 2001), podendo as diferenças de pH observadas, entre estudos, ser devidas à variedade do cereal, à extensão de processamento do grão e ao tipo de forragem. Este último aspecto está bem patente no estudo de KUNG *et al.* (1992) que verificaram que o pH do rúmen não foi afectado pelo tipo de cereal, mas diminuiu significativamente com a substituição do feno de luzerna por silagem de milho.

Nalguns estudos (GALLOWAY *et al.*, 1993; BOSS e BOWMAN, 1996; YANG *et al.*, 1997; SURBER e BOWMAN, 1998; KHORASANI *et al.*, 2001), a menor degradabilidade do amido reflectiu-se na menor produção de AGV. O efeito na concentração de N amoniacal é de difícil interpretação, pois, se por um lado, a rápida degradação do amido pode permitir

QUADRO 3.1 - Efeito da alteração da fonte de amido do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na digestão ruminal (R), pós-ruminal (PR) e total do amido da dieta, no N ingerido (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno e na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]).

Ref.	Animais	Forragem base	Fonte de amido no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	Digestão do amido (%)			NI	Fluxo de N ($g\ dia^{-1}$)				ESPM
		Relação F^2/C			(mM)	($mg\ dl^{-1}$)	R	PR	Total	($g\ dia^{-1}$)	Nt	NANMN	NAN	NM	
[1]	Novilhos	FL+FS	SF(0.42†)(85)	6,29*			79,8	18,7	98,5	107		57,2**	107	50,3*	16,0
		12/88	SF(0.36†)(85)	6,12			82,6	16,5	99,1	108		63,9	113	49,4	16,2
			SF(0.30†)(85)	6,08			86,9	12,8	99,6	109		56,8	112	54,9	16,1
[2]	Novilhos	FB	-		$79,4^{b}$		$100,0^{f}$	0^{cd}	$100,0^{f}$	97	$119,5^{c}$	$45,1^{c}$		$60,6^{c}$	21,4
			MM(0,7%PV)		$81,6^{b}$		$78,6^{d}$	$14,1^{e}$	$92,7^{e}$	140	$182,5^{d}$	$72,5^{d}$		$103,9^{d}$	25,6
			MI(0,7%PV)		$82,0^{b}$		$84,3^{de}$	$-4,6^{c}$	$81,2^{d}$	139	$180,9^{d}$	$74,0^{d}$		$84,6^{cd}$	21,6
			SGM(0,7%PV)		$79,4^{b}$		$66,0^{c}$	$6,2^{de}$	$72,2^{c}$	143	$203,6^{e}$	$86,3^{e}$		$82,2^{cd}$	24,4
			TrM(0,7%PV)		$90,2^{c}$		$95,6^{ef}$	$2,3^{cd}$	$98,0^{f}$	149	$173,1^{d}$	$65,7^{d}$		$96,0^{d}$	21,7
[3]	Novilhos	PT	-		$75,1^{3a}$										
			C(82)		$77,6^{b}$										
			C(79)		$79,9^{b}$										
			M(80)		$79,4^{b}$										
			M(77)		$76,4^{b}$										
[4]	Vacas	FL	SF(61)						$95,9^{a}$						
		34/66	SFS(61)						$97,7^{a}$						
			SRC(61)						$91,8^{b}$						
			DRS(61)						$91,3^{b}$						

[a, b, c, d, e, f]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$).

[1] ZINN, 1990; [2] GALLOWAY *et al.*, 1993; [3] REYNOLDS *et al.*, 1993; [4] CHEN *et al.*, 1994. [1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rumen; [2]Forragem; [3]mmol ml^{-1}. †Densidade do floco; *Efeito linear; **Efeito quadrático. C = cevada; DRS = sorgo-rolagem a seco; FB = feno de gramíneas; FL = feno de luzerna; FS = feno de erva do Sudão; M = milho; MI = milho inteiro; MM = milho moído; PT = palha de trigo; SF = milho expandido; SFS = sorgo expandido; SGM = sorgo moído; SRC = milho extrudido; TrM = trigo moído.

QUADRO 3.1 - Efeito da alteração da fonte de amido do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na digestão ruminal (R), pós-ruminal (PR) e total do amido da dieta, no N ingerido (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno e na eficiência de síntese de proteína microbiana ($ESPM^1$) (continuação).

Ref.	Animais	Forragem base	Fonte de amido no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	Digestão do amido (%)			NI	Fluxo de N ($g\ dia^{-1}$)				ESPM
		Relação F^2/C			(mM)	($mg\ dl^{-1}$)	R	PR	Total	($g\ dia^{-1}$)	Nt	NANMN	NAN	NM	
[5]	Vacas	FL	SRC(59)				$72,1^{cd}$		$91,2^{ab}$	659	534	256	502	246	12,5
		23/77	DRS(59)				$61,5^{d}$		$85,0^{b}$	730	493	195	458	262	13,3
			SFS(59)				$81,2^{c}$		$97,1^{a}$	635	576	245	550	307	14,6
			DRS(30)+SFS(30)				$62,2^{cd}$		$88,0^{b}$	667	498	218	467	251	12,7
[6]	Vacas	SL+SM	M(72)	5,91*	119,8	18,3*	41,9*	49,0*		602*	601	327*	584	257	30,8
		45/55	M(54)+CR(22)	5,82	121,8	15,2	60,6	32,8		584	523	271	505	233	23,8
			M(36)+CR(45)	5,85	120,7	14,5	60,9	33,0		569	536	276	517	242	26,3
			M(18)+CR(67)	5,82	118,8	13,3	74,4	21,0		523	498	239	477	238	24,0
			CR(89)	5,79	123,0	12,9	74,4	21,8		520	531	224	507	282	30,0
[7]	Novilhos	FA	M(70)		$67,9^{a}$		91,7	$41,8^{a}$	$95,7^{a}$	130^{b}	92^{a}	29^{c}	93^{a}	67^{a}	16^{a}
			C1(80)		$72,7^{b}$		92,3	$78,2^{b}$	$98,3^{b}$	130^{b}	115^{b}	19^{b}	111^{b}	92^{bc}	22^{bc}
			C2(80)		$77,4^{c}$		93,0	$90,2^{b}$	$98,9^{b}$	113^{a}	121^{b}	20^{b}	119^{b}	101^{c}	25^{c}
			C3(80)		$72,7^{b}$		94,3	$77,5^{b}$	$98,7^{b}$	132^{b}	101^{a}	12^{a}	97^{a}	85^{b}	20^{b}
[8]	Vacas	FL	DR(0.52†)(70)	6,32			47,0	$48,8^{a}$	$76,7^{a}$	382^{a}		245	384^{a}	139^{a}	$19,9^{a}$
		43/57	SF(0.39†)(70)	6,50			45,3*	$83,4^{b}$	$92,8^{*b}$	427^{b}		280**	452^{b}	172^{b}	$26,8^{b}$
			SF(0.32†)(70)	6,37			64,6	$91,5^{b}$	$96,8^{b}$	403^{b}		248	429^{b}	181^{b}	$23,3^{b}$
			SF(0.26†)(70)	6,42			69,1	$95,8^{b}$	$98,5^{b}$	409^{b}		277	452^{b}	175^{b}	$23,2^{b}$

[a, b, c, d] Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$).

[5] OLIVEIRA *et al.*, 1995; [6] OVERTON *et al.*, 1995; [7] BOSS e BOWMAN, 1996; [8] PLASCENCIA e ZINN, 1996.

[1] $g\ N\ kg^{-1}$ matéria orgânica verdadeiramente digerida no rumen; [2] Forragem; †Densidade do floco; *Efeito linear; ** Efeito quadrático.

C1, C2 e C3 = diferentes variedades de cevada; CR = cevada extrudido; DR = milho-rolagem a seco; DRS = sorgo-rolagem a seco; FA = feno de azevém; FL = feno de luzerna; M = milho; SF = milho expandido; SFS = sorgo expandido; SL = silagem de luzerna; SM = silagem de milho; SRC = milho extrudido.

QUADRO 3.1 - Efeito da alteração da fonte de amido do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na digestão ruminal (R), pós-ruminal (PR) e total do amido da dieta, no N ingerido (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno e na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]) (continuação).

Ref.	Animais	Forragem base	Fonte de amido no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	Digestão do amido (%)			NI	Fluxo de N (g dia^{-1})				ESPM
		Relação F^2/C			(mM)	(mg dl^{-1})	R	PR	Total	(g dia^{-1})	Nt	NANMN	NAN	NM	
[9]	Novilhos	SE	C				90,2			97,5	76,6		65,5	49,0	26,5[4]
		[3]	Tr				88,1			93,1	80,6		68,1	46,5	27,8
			A				86,0			93,8	81,2		68,0	46,0	26,5
			MP				69,3			101,6	81,2		68,6	45,4	24,3
[10]	Vacas	SC+FL	CR(51)	6,02	91,3[a]	9,58[b]	68,6[a]		93,2[a]		546		526	286[a]	23,4
		40/60	CD(50)	6,04	82,5[ab]	12,58[a]	46,7[b]		78,1[b]		543		518	235[b]	24,4
			SRC(50)	6,12	78,4[b]	10,06[b]	35,3[b]		84,5[ab]		526		505	237[b]	24,9
[11]	Vacas	FL	DR(49)	6,40	123,7	13,61*	24,8*	53,0	77,8*	506,6	400,8	249,1	420,8	171,7	22,7
		45/55	DR(33)+SF(16)	6,38	125,4	11,37	32,5	53,0	85,4	532,6	484,6	265,5	463,8	198,3	24,8
			DR(16)+SF(33)	6,31	125,5	10,34	37,8	53,1	90,9	516,1	473,8	260,5	455,1	194,6	23,7
			SF(49)	6,33	127,8	9,97	45,2	51,8	97,0	503,7	503,0	275,8	483,7	207,9	27,4
[12]	Vacas	SL	DG(77)	6,14	105[3]	15,5	60,9[a]		88,9[a]	782[a]	713	269		443	32,5
		45/55	DR(77)	6,27	111	16,6	69,2[a]		76,4[b]	788[a]	696	349		359	26,9
			HMG(77)	6,14	115	13,2	86,8[b]		98,2[c]	855[b]	704	318		385	25,1
			HMR(77)	6,16	124	13,0	81,2[b]		95,7[d]	831[b]	805	333		471	34,0

[a, b, c]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$). [9] SCOLLAN *et al.*, 1996; [10] YANG *et al.*, 1997; [11] CROCKER *et al.*, 1998; [12] KNOWLTON *et al.*, 1998; [1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rumen; [2]Forragem; [3]Suplementos fornecidos a 10% da ingestão de MS de silagem; [4]g de N microbiano sintetizado kg^{-1} matéria orgânica aparentemente digerida no rumen. *Efeito linear; **Efeito quadrático.
A = aveia; C = cevada; CD = cevada descascada extrudida; CR = cevada extrudida; DG = milho moído seco; DR = milho-rolagem a seco; FL = feno de luzerna; HMG = milho moído húmido; HMR = milho-rolagem húmida; MP = milho partido; SC = silagem de cevada; SE = silagem de erva; SF = milho expandido; SL = silagem de luzerna; SRC = milho extrudido; Tr = trigo.

QUADRO 3.1 - Efeito da alteração da fonte de amido do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na digestão ruminal (R), pós-ruminal (PR) e total do amido da dieta, no N ingerido (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno e na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]) (conclusão).

Ref.	Animais	Forragem base	Fonte de amido no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	Digestão do amido (%)			NI	Fluxo de N (g dia^{-1})				ESPM
		Relação F^2/C			(mM)	(mg dl^{-1})	R	PR	Total	(g dia^{-1})	Nt	NANMN	NAN	NM	
[13]	Novilhos	FA	M(70)		53,4[a]		88,6[a]	55,4[a]	94,6[a]	117	94	33	91	56	13
		20,5/79,5	C(80)		60,3[b]		92,4[b]	90,3[b]	99,3[b]	124	97	26	93	68	15
[14]	Vacas	SC+HL	CR(84)	6,03	103,5	12,4[a]	64,9	46,4[a]	82,7[a]	599	564	279		267	22,7
		45/55	CR(84)+EF	6,12	101,1	11,8[a]	65,0	67,5[b]	89,2[b]	594	573	281		273	22,9
			CD(84)	6,02	102,5	8,8[b]	75,0	73,6[c]	92,9[c]	599	609	323		269	22,8
			CD(84)+EF	6,05	103,0	9,8[b]	73,3	85,2[d]	96,2[d]	613	597	291		290	23,4
[15]	Novilhas	AI	-	6,10	96,7	29,0[a]	51,4	27,5	88,4[a]	320[a]	184,3	59,4	161,8	102,4	19,9
			C(99)	6,09	90,3	19,4[b]	68,0	23,1	96,2[b]	222[b]	160,3	39,9	142,5	102,5	21,9
			M(99)	6,02	97,3	26,9[c]	62,1	22,7	96,8[c]	273[b]	178,6	64,0	158,5	94,4	18,4
[16]	Vacas	FL+SL+SCT	M(61)	5,96	96,0*	17,4									
		40/60	M(50)+C(50)	5,99	97,6	18,7									
			C(61)	5,99	103,6	18,7									

[a, b, c, d]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$).

[13] SURBER e BOWMAN, 1998; [14] BEAUCHEMIN *et al.*, 1999; [15] GARCIA *et al.*, 2000; [16] KHORASANI *et al.*, 2001.

[1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rumen; [2]Forragem; [3]mol.

*Efeito linear.

AI = aveia de inverno fresca; C = cevada; CD = cevada descascada extrudida; CR = cevada extrudida; EF = enzima fibrolítica; FA = feno de azevém; FL = feno de luzerna; HL = feno-silagem de luzerna; M = milho; SC = silagem de cevada; SCT = silagem de cevada e triticale; SL = silagem de luzerna.

uma elevada utilização do amoníaco do rúmen, por outro, se a proteína dos cereais for, também, de elevada degradabilidade, a utilização mais rápida do amido pode resultar, inicialmente, numa melhor utilização do N, mas, depois, o eventual défice em energia fermentável, pode resultar numa acumulação de N amoniacal (BOSS e BOWMAN, 1996; YANG *et al.*, 1997; CROCKER *et al.*, 1998; BEAUCHEMIN *et al.*, 1999; GARCÍA *et al.*, 2000).

A alteração da fonte de amido pode influenciar, também, o local e os produtos finais da digestão absorvidos pelo animal. Nomeadamente, a digestão ruminal do amido é, em geral, superior em dietas com cevada do que com milho (OVERTON *et al.*, 1995; SURBER e BOWMAN, 1998), sendo a digestão pós-ruminal superior quando o milho é usado como fonte de amido (OVERTON *et al.*, 1995). A utilização de fontes de amido mais degradáveis, ao diminuir, provavelmente, a digestibilidade da fibra (CAPÍTULO 2), pode contrariar os efeitos benéficos da maior digestibilidade do amido, resultando numa similar quantidade de MO fermentada no rúmen (BEAUCHEMIN *et al.*, 1999).

Apesar das várias fracções de N que deixam o rúmen para o duodeno poderem ser afectadas pela degradabilidade do amido, o fluxo total de N para o duodeno e a eficiência de síntese de proteína microbiana não são, geralmente, afectados. Isto porque a quantidade de N não amoniacal que passa para o duodeno pode ser similar, pois o fluxo de N proteico para o duodeno aumenta com as fontes de amido menos degradável (*e.g.*, milho) devido à menor degradabilidade da PB do cereal no rúmen (ZINN, 1990; GALLOWAY *et al.*, 1993; OVERTON *et al.*, 1995; BOSS e BOWMAN, 1996) e porque as fontes de amido mais degradável (*e.g.*, cevada) aumentam o fluxo de N microbiano para o duodeno, devido à maior digestibilidade da MO no rúmen (ZINN, 1990; GALLOWAY *et al.*, 1993; BOSS e BOWMAN, 1996; PLASCENCIA e ZINN, 1996; YANG *et al.*, 1997).

O processamento físico do grão de cereal aumenta a taxa de digestão do amido no rúmen através da rotura das camadas concêntricas de amilose e de amilopectina o que favorece o acesso das enzimas dos microrganismos (THEURER, 1986; KNOWLTON *et al.*, 1998; THEURER *et al.*, 1999). A aplicação de calor, de humidade e de pressão aumenta a susceptibilidade do amido à digestão basicamente através da rotura da matriz proteica dos grânulos de amido e da gelatinização do próprio amido, que rompe a estrutura cristalina (POTTER *et al.*, 1971; ROONEY e PFLUGDFELDER, 1986; KOTARSKI *et al.*, 1992). O maior grau de processamento dos grãos de cereais promove maior digestão ruminal, pós-ruminal e total do amido (GALLOWAY *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1995; PLASCENCIA e ZINN, 1996; CROCKER *et al.*, 1998; KNOWLTON *et al.*, 1998), aumentando a

conversão, no rúmen, da proteína do alimento em proteína microbiana (GALLOWAY *et al.*, 1993; PLASCENCIA e ZINN, 1996).

Os resultados analisados sugerem que a quantidade de energia capturada pelos microrganismos é essencial à quantidade de proteína microbiana sintetizada no rúmen e que quando aumenta a MO fermentada no rúmen mais proteína microbiana e menos N proteico e não microbiano passam para o duodeno. De facto, alguma evidência experimental sugere que a energia disponível no rúmen é o factor mais limitante à utilização do N neste compartimento (HERRERA-SALDANA *et al.*, 1990; SHABI *et al.*, 1998; OBA e ALLEN, 2003). Contudo, apesar de, teoricamente, o fornecimento de uma fonte de hidratos de carbono rapidamente degradável, como a cevada, aumentar a síntese de proteína microbiana no rúmen, na realidade os benefícios podem ser mínimos. Com efeito, CLARK *et al.* (1992) obtiveram uma relação quadrática entre a MO verdadeiramente digerida no rúmen e a eficiência microbiana, sugerindo que outros factores afectam a síntese de proteína microbiana. OBA e ALLEN (2003) verificaram, também, que a síntese microbiana não dependeu do teor em amido da dieta, mas sim das taxas de passagem da MO e do amido. Estes autores verificaram que a eficiência microbiana se correlacionou negativamente com a taxa de digestão do amido, o que é consistente com a teoria de "desvio energético" (CAPÍTULO 2).

Dos estudos constantes no QUADRO 3.1 que utilizaram vacas leiteiras e mediram a sua resposta produtiva, alguns verificaram efeito positivo e significativo do aumento da fermentabilidade do amido na ingestão de MS e na produção de leite (CHEN *et al.*, 1994; PLASCENCIA e ZINN, 1996; BEAUCHEMIN *et al.*, 1999), outros verificaram o oposto (OVERTON *et al.*, 1995), não tendo outros observado qualquer efeito (OLIVEIRA *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1997; CROCKER *et al.*, 1998; KNOWLTON *et al.*, 1998). As respostas positivas na produção de leite foram atribuídas à maior ingestão de MS, à maior ingestão de energia (BEAUCHEMIN *et al.*, 1999), ao aumento da digestibilidade do amido e da fibra de detergente neutro (NDF; CHEN *et al.*, 1994; PLASCENCIA e ZINN, 1996), ao maior fluxo de proteína para o duodeno ou ao aumento da palatabilidade da dieta (PLASCENCIA e ZINN, 1996). No estudo de KHORASANI *et al.* (2001), apenas, as vacas primíparas responderam ao tratamento, tendo a sua produção de leite variado de forma quadrática com o aumento de inclusão de cevada na dieta. YANG *et al.* (1997), apesar de terem observado diferenças na produção de AGV, na utilização do N amoniacal e no fluxo de N microbiano para o duodeno, tais diferenças não se reflectiram na ingestão de MS e na produção e composição

do leite. Igualmente, a amplitude das diferenças observadas na utilização do N amoniacal e na digestibilidade do amido, no rúmen e total, no estudo de CROCKER *et al.* (1998) não foi suficiente para se reflectir na ingestão de MS, na produção e na composição do leite. Resultados semelhantes foram obtidos por OLIVEIRA *et al.* (1995) e por KNOWLTON *et al.* (1998).

Outros ensaios produtivos (que não constam do QUADRO 3.1) que compararam a cevada com outros fontes de amido fermentável no rúmen observaram menores produção de leite e ingestão de MS com cevada (BILODEAU *et al.*, 1989; CASPER e SCHINGOETHE, 1989; MCCARTHY *et al.*, 1989; CASPER *et al.*, 1999), enquanto noutros a produção de leite e a ingestão voluntária foram similares ou aumentaram com a inclusão de cevada (DE PETERS e TAYLOR, 1985; SNIFFEN e ROBINSON, 1987; RODE e SATTER, 1988; HERRERA-SALDANA e HUBER, 1989; CASPER *et al.*, 1990; GRINGS *et al.*, 1992a). Esta discrepância de respostas pode dever-se à maior ingestão de MS, à maior passagem de amido e de aminoácidos para o duodeno nas dietas à base de milho (MCCARTHY *et al.*, 1989), ao maior teor em amido das dietas à base de milho, que aumenta a produção de AGV (CASPER *et al.*, 1999), à maior digestão ruminal e pós-ruminal do amido nas dietas à base de cevada, aumentando a produção de energia, a eficiência de conversão alimentar e a síntese de proteína microbiana (SURBER e BOWMAN, 1998), ao maior teor em fibra das dietas com cevada (MCCARTHY *et al.*, 1989) e às necessidades dos animais (KHORASANI *et al.*, 2001). A quantidade superior de amido digerido no duodeno em dietas à base de milho aumenta a disponibilidade de glucose para a síntese de lactose e as cadeias carbonadas de alguns aminoácidos adicionais que passam para o duodeno podem ser utilizadas para a síntese de glucose (MCCARTHY *et al.*, 1989).

3.2.2. Azoto proteico e azoto não proteico

A alteração da fonte azotada da dieta constitui, também, uma forma de manipular as disponibilidades de N e de energia no rúmen. Neste contexto, a substituição de proteína verdadeira por N não proteico, apesar de poder ser considerada alteração do sincronismo, tem sido realizada, tirando vantagem das particularidades digestivas do ruminante, sobretudo com o objectivo de diminuir os custos da alimentação e de ultrapassar o problema da escassez de fontes proteicas. Assim, os estudos que utilizaram esta estratégia visaram, principalmente, avaliar as possíveis perdas na eficiência de produção com esta

substituição e não o efeito no sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen. Sendo o objectivo maximizar a eficiência de síntese de proteína microbiana a partir de fontes de N não proteico, mais baratas, é essencial garantir, na dieta, uma fonte de energia rapidamente fermentável que permita o uso, pelos microrganismos, do amoníaco rapidamente libertado (*e.g.*, STERN *et al.*, 1978; MACGREGOR *et al.*, 1983; JAQUETTE *et al.*, 1987). Daqui decorre que quando se analisa o efeito da alteração da fonte de N na dieta não se pode deixar de considerar a fonte de energia utilizada.

Como já referido no CAPÍTULO 2, existe evidência substancial, *in vitro*, que suporta o princípio de que a síntese de proteína microbiana aumenta com o fornecimento de proteína verdadeira degradável (aminoácidos e péptidos) a bactérias que crescem em meios com hidratos de carbono solúveis, mas as respostas *in vivo* ao fornecimento de proteína verdadeira degradável têm sido menos consistentes (ARMENTANO *et al.*, 1993; CHIKUNYA *et al.*, 1996), muito, provavelmente, devido a diferenças na taxa de fermentação dos hidratos de carbono.

Com efeito, os hidratos de carbono diferem muito em termos de capacidade de promoverem a utilização de fontes de N não proteico. A celulose parece ser o hidrato de carbono menos efectivo na promoção da utilização do amoníaco proveniente da ureia e o amido o mais efectivo, mesmo mais do que os açúcares (HELMER e BARTLEY, 1971). O facto da celulose não favorecer a utilização efectiva do N da ureia pode ser explicado pela baixa quantidade de celulose que é hidrolisada, com rapidez suficiente, após a ingestão e se torna disponível no momento em que as bactérias necessitam de energia para capturar o N da ureia rapidamente libertado (REID, 1953; COLOVOS *et al.*, 1967).

Os açúcares têm sido mais avaliados pelo seu efeito positivo na palatabilidade das dietas com ureia do que pelo seu efeito na utilização do N desta fonte (HELMER e BARTLEY, 1971). Aspecto que, no entanto, não foi corroborado por VAN HORN *et al.* (1967) que verificaram que a ingestão de um alimento concentrado com 1,9% de ureia não foi melhorada pela adição de 4,7% de melaços. Provavelmente, os açúcares dos melaços deixam o rúmen ou são degradados de forma excessivamente rápida para serem totalmente utilizados pelos microrganismos (REID, 1953). Fontes de amido rapidamente fermentável diminuem o pH do rúmen, permitindo a manutenção de um maior reservatório de amoníaco para a síntese de proteína microbiana, pois, como visto no CAPÍTULO 2, a parede do rúmen é mais permeável à forma livre (NH_3), existente em condições de pH ruminal mais elevado. Obviamente que a cozedura do amido, ao torná-lo mais susceptível à

degradação microbiana, permite que este forneça energia a uma taxa mais próxima da libertação de N da ureia, possibilitando que os microrganismos do rúmen usem o amoníaco mais eficientemente (CAPÍTULO 2), bem como que o risco de toxicidade da ureia (amoníaco) seja diminuído (BARTLEY e DEYOE, 1981).

3.2.3. Fontes energéticas e azotadas de taxas de degradação semelhantes

No QUADRO 3.2 encontram-se sumariados os efeitos do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, alcançado pela alteração das fontes de N e de energia no alimento concentrado, no pH do rúmen, nas concentrações de AGV totais e de N amoniacal no rúmen, na ingestão de N, nos fluxos de N para o duodeno, na eficiência de síntese de proteína microbiana, na ingestão de MS e na produção de leite. Da análise do QUADRO 3.2 ressalta que a conjugação, na dieta, de fontes de energia e de N com taxas de degradação similares – dietas sincronizadas – tem efeitos diferentes nos parâmetros considerados.

O pH médio do rúmen não foi, em geral, afectado, tendo a concentração de AGV aumentado, nalguns estudos, com o aumento da energia fermentável na dieta (MCCARTHY *et al.*, 1989; STOKES *et al.*, 1991; MANSFIELD e STERN, 1994; SHABI *et al.*, 1998), o que se reflectiu, nalguns casos, na maior utilização da fracção de N degradável no rúmen (MCCARTHY *et al.*, 1989; MANSFIELD e STERN, 1994) e no fluxo de N microbiano para o duodeno (MCCARTHY *et al.*, 1989).

A concentração de N amoniacal no rúmen pode fornecer uma indicação da utilização da fracção azotada da dieta. Com efeito, no estudo de CASPER e SCHINGOETHE (1986), a concentração de N amoniacal no rúmen indica que a dieta com soro de leite desidratado aumentou a utilização do N através da estimulação da síntese de proteína microbiana, provavelmente, devido à maior quantidade de lactose (rapidamente fermentável) representar uma fonte de energia para a síntese proteica. Também MCCARTHY *et al.* (1989) observaram um aumento de utilização de N amoniacal com o aumento do teor em amido das dietas.

No entanto, na interpretação dos valores da concentração de N amoniacal no rúmen deve ter-se em conta que a diminuição desta pode resultar, quer de uma maior utilização pelos microrganismos, quer da absorção de N amoniacal pelas paredes do órgão, quer de uma menor degradação da proteína da dieta neste compartimento. Com efeito, no

QUADRO 3.2- Efeito do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen alcançado por alteração das fontes de hidratos de carbono (HC) e de N do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na ingestão de N (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno, na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]), na ingestão de matéria seca (IMS; kg dia^{-1}) e na produção de leite (PL; kg dia^{-1}).

Ref.	Animais	Forragem base	Fontes HC e N no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	NI	Fluxo de N g dia^{-1}				ESPM	IMS	PL
		Relação F^2/C			(mM)	(mg dl^{-1})	(g dia^{-1})	Nt	NANMN	NAN	NM			
[1]	Vacas	SM+FL	M(69)+BS(29)	6,49	86,2[3]	11,8[b]							22,0[b]	33,8
		50/50	M(75)+BS(22)+U(1)	6,37	84,1	20,3[a]							20,2[c]	33,4
			M(48)+BS(18)+U(1)+LD(30)	6,43	84,5	13,5[b]							23,1[a]	33,2
[2]†	Vacas	SM+FL	M(60)+BS(32)	6,49	80,0[3]	14,4							20,0	32,7
		50/50	M(66)+BS(25)+U(1)	6,62	77,4	16,4							20,9	32,9
			C(67)+BS(25)	6,58	81,2	8,6							19,1	31,9
			C(73)+BS(17)+U(1)	6,54	76,5	14,2							18,5	31,3
			M(34)+LD(30)+BS(29)	6,54	75,2	10,4							20,7	32,1
			M(40)+LD(30)+BS(21)+U(1)	6,46	74,4	14,0							20,3	30,4
[3]†	Vacas	HLE+SM	M(84)+FP(13)	5,96	104,2	2,86	544	646	373[a]	632	259[a]	31,2	23,3	35,9
		45/55	M(79)+BS(17)	5,72	119,48	3,54	567	685	372[a]	666	294[b]	35,2	24,2	35,2
			C(91)+FP(6)	5,62	122,66	1,39	483	608	307[b]	589	282[a]	30,9	20,5	32,4
			C(88)+BS(8)	5,73	118,56	2,83	504	620	289[b]	599	310[b]	31,2	20,9	32,6

[a, b, c]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$). †Os efeitos foram determinados utilizando contrastes (comparações e nível de significância não apresentados).

[1] CASPER e SCHINGOETHE, 1986; [2] CASPER e SCHINGOETHE, 1989; [3] MCCARTHY *et al.*, 1989.

[1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rumen; [2]Forragem; [3]µm/ml.

BS = bagaço de soja; C = cevada; FL = feno de luzerna; FP = farinha de peixe; HLE = feno-silagem de luzerna e de gramíneas; LD = soro de leite desidratado; M = milho; SM = silagem de milho; U = ureia.

QUADRO 3.2- Efeito do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen alcançado por alteração das fontes de hidratos de carbono (HC) e de N do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na ingestão de N (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno, na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]), na ingestão de matéria seca (IMS; kg dia^{-1}) e na produção de leite (PL; kg dia^{-1}) (continuação).

Ref.	Animais	Forragem base	Fontes HC e N no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	NI	Fluxo de N g dia^{-1}				ESPM	IMS	PL
		Relação F[2]/C			(mM)	(mg dl^{-1})	(g dia^{-1})	Nt	NANMN	NAN	NM			
[4]	Vacas	SM+FL	M(60)+BS(32)	6,56	83,4[3]	15							20,4[b]	32,1
		50/50	M(66)+BS(25)+U(1)	6,62	81,8	19,5							21,0[a]	32,2
			C(67)+BS(25)	6,54	84,4	10,9							19,8[c]	31,7
			C(73)+BS(17)+U(1)	6,60	84,1	14,6							18,7[d]	31,9
[5]†	Vacas	FL+CAl	C(66)+Bal(19)	5,6	42,11[4]	12,2					480	45,3		
		35/65	C(50)+BDG(36)	5,7	40,28	13,6					422	37,1		
			S(63)+Bal(22)	5,9	41,82	15,3					378	35,4		
			S(46)+BDG(39)	6,0	38,77	14,2					342	35,7		
[6]†	Vacas	HL+SM	FP(7)	5,94	113,0	7,3	560	612	239	596	357	38,3	23,1	31,2
		55/45	FP(7)+U(1,7)	5,96	114,3	15,3	629	635	239	613	374	41,7	23,0	31,8
			FP(11)+Am(21)+D(7)	5,90	109,4	5,2	517	593	266	578	312	37,3	21,6	29,9
			FP(11)+U(1,7)+Am(21)+D(7)	5,74	121,3	12,6	564	651	254	630	376	44,7	21,0	31,4
[7]	Vacas	SM+FG+PT	NSC(38)/DIP(13,2)	5,9	142,6*	21,2*	633	542	201*	519	317*	24,8	21,9	37,5
			NSC(31)/DIP(11,8)	6,3	121,4	15,0	642	566	204	537	333	26,4	21,1	34,3
			NSC(24)/DIP(9)	6,6	99,0	8,0	552	584	366	568	202	22,0	18,3	30,4

[a, ,b, c, d]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$). †Os efeitos foram determinados utilizando contrastes (comparações e nível de significância não apresentados). [4] CASPER *et al.*, 1990; [5] HERRERA-SALDANA *et al.*, 1990; [6] CAMERON *et al.*, 1991; [7] STOKES *et al.*, 1991. [1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rumen; [2]Forragem; [3]µm/ml; [4]mM/l. *Efeito linear.
Am = amido; Bal = bagaço de algodão; BDG = drêches de cevada; BS = bagaço de soja; C = cevada; CAl = cascas de algodão; D = dextrose; DIP = ingestão de proteína degradável; FG = feno de gramíneas; FL = feno de luzerna; FP = farinha de peixe; HL = feno-silagem de luzerna; M = milho; S = sorgo; NSC = hidratos de carbono não estruturais; PT = palha de trigo; SM = silagem de milho; U = ureia.

QUADRO 3.2- Efeito do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen alcançado por alteração das fontes de hidratos de carbono (HC) e de N do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na ingestão de N (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno, na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]), na ingestão de matéria seca (IMS; kg dia^{-1}) e na produção de leite (PL; kg dia^{-1}) (continuação).

Ref.	Animais	Forragem base	Fontes HC e N no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	NI	Fluxo de N g dia^{-1}				ESPM	IMS	PL
		Relação F^2/C			(mM)	(mg dl^{-1})	(g dia^{-1})	Nt	NANMN	NAN	NM			
[8]†	Vacas	SM+SL	RANSC(80,7)/RAP(65,7)	6,29[a]	147,9[3]	12,4[a]	700[a]	555		536	262[4]	17,9	25,0	39,3
			RANSC(82,1)/RAP(52,4)	6,40[b]	135,6	8,9[b]	691[a]	580		565	214	14,5	24,9	38,8
			RANSC(71,1)/RAP(65,2)	6,26[a]	143,7	14,8[a]	755[b]	566		549	234	15,2	26,7	39,6
			RANSC(67,6)/RAP(51,1)	6,37[b]	138,7	10,4[b]	722[b]	648		633	237	17,8	25,3	39,6
[9]†	Vacas	SM+FL+FG	M(59)+BS(32)	6,47	93,0	20,3	607		344	549	205[4]	25	20,2	28,7
		52/48	M(54)+BST(36)	6,55	90,4	13,3	588		368	590	222	23	20,8	28,4
			CS(63)+BS(29)	6,36	100,4	17,2	610		357	590	233	24	20,7	27,7
			CS(58)+BST(33)	6,56	96,0	11,6	574		373	579	206	25	19,1	26,6
[10]†	Vacas	SE	-	6,29	102,1	10,9							18,8[a]	20,1[a]
		C: 0,8% PV	M+BS	6,21	101,8	11,6							20,8[b]	23,9[b]
			C+A+BS	6,28	95,6	9,4							20,3[b]	23,2[b]
			PB+BS	6,15	103,0	8,9							20,4[b]	22,9[b]
			PB+FP	5,98	97,6	7,1							20,7[b]	22,3[b]

[a, b]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$). †Os efeitos foram determinados utilizando contrastes (comparações e nível de significância não apresentados).

[8] ALDRICH *et al.*, 1993; [9] MANSFIELD e STERN, 1994; [10] PETIT e TREMBLAY, 1995a.

[1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rumen; [2]Forragem.; [3]µm/ml; [4]N bacteriano.

A = aveia; BS = bagaço de soja; BST = bagaço de soja tratado com linhosulfonate; C = cevada; CS = cascas de soja; FG = feno de gramíneas; FL = feno de luzerna; FP = farinha de peixe; M = milho; PB = polpa de beterraba; PV = peso vivo; RANSC = hidratos de carbono não estruturais disponíveis no rúmen; RAP = proteína disponível no rúmen; SE = silagem de erva; SL = silagem de luzerna; SM = silagem de milho;

QUADRO 3.2- Efeito do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen alcançado por alteração das fontes de hidratos de carbono (HC) e de N do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na ingestão de N (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno, na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]), na ingestão de matéria seca (IMS; kg dia^{-1}) e na produção de leite (PL; kg dia^{-1}) (continuação).

Ref.	Animais	Forragem base	Fontes HC e N no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	NI	Fluxo de N g dia^{-1}				ESPM	IMS	PL
		Relação F[2]/C			(mM)	(mg dl^{-1})	(g dia^{-1})	Nt	NANMN	NAN	NM			
[11]	Vacas	SM+FV	RDP(73,8)/RNSC(85,3)				419	451[a]			226[3a]	28	15,8	
		38-43/62-57	RDP(72,4)/RNSC(75,3)				402	445[a]			226[a]	27	16,1	
			RDP(67,7)/RNSC(86,0)				432	538[b]			280[b]	32	15,7	
			RDP(66,3)/RNSC(76,0)				421	518[b]			277[b]	31	16,2	
[12]†	Vacas	SM+FV	RDOM(58,1)/RDCP(60,2)	6,6	85,1[a]	16,6[b]	432[a]	448[a]				26	16,7[a]	18,5
		54/46	RDOM(56,7)/RDCP(55,1)	6,6	81,2[ab]	14,4[c]	432[a]	464[a]				25	16,4[ab]	18,2
			RDOM(54,5)/RDCP(59,8)	6,6	82,3[ab]	18,2[a]	400[b]	384[b]				25	15,5[b]	17,5
			RDOM(53,1)/RDCP(54,7)	6,7	79,0[b]	15,3[c]	416[ab]	432[a]				31	16,1[ab]	18,2
[13]†	Vacas	FL+SM	M(78)+BS(21)	5,9	132,8[3]	15,0[a]					282		20,7	25,1
		50/50	M(78)+BSE(21)	5,9	139,2	10,4[b]					312		21,8	27,5
			C(85)+BS(14)	6,0	120,5	9,0[b]					275		19,9	23,8
			C(85)+BSE(14)	6,1	118,1	11,3[b]					295		20,0	23,5

[a, b]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$). †Os efeitos foram determinados utilizando contrastes (comparações e nível de significância não apresentados).

[11] MABJEESH *et al.*, 1997; [12] SHABI *et al.*, 1998; [13] CASPER *et al.*, 1999.

[1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rúmen; [2]Forragem; [3]N bacteriano.

BS = bagaço de soja; BSE = bagaço de soja extrudido; C = cevada; FL = feno de luzerna; FV = feno de vícia; M = milho; RDCP = proteína bruta degradável no rúmen; RDOM = matéria orgânica degradável no rúmen; RDP = proteína degradável no rúmen; RNSC = hidratos de carbono não estruturais degradáveis no rúmen; SM = silagem de milho.

QUADRO 3.2- Efeito do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen alcançado por alteração das fontes de hidratos de carbono (HC) e de N do alimento concentrado (C) no pH e nas concentrações de ácidos gordos voláteis (AGV) e de N amoniacal ($N\text{-}NH_3$) no rúmen, na ingestão de N (NI), nos fluxos de N total (Nt), de N não amoniacal e não microbiano (NANMN), de N não amoniacal (NAN) e de N microbiano (NM) para o duodeno, na eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM[1]), na ingestão de matéria seca (IMS; kg dia^{-1}) e na produção de leite (PL; kg dia^{-1}) (conclusão).

Ref.	Animais	Forragem base	Fontes HC e N no C (%)	pH	AGV	$N\text{-}NH_3$	NI	Fluxo de N g dia^{-1}				ESPM	IMS	PL
		Relação F^2/C			(mM)	(mg dl^{-1})	(g dia^{-1})	Nt	NANMN	NAN	NM			
[14]	Vacas	FL+SM												
		46/54	M(34)+BS(19)+CGF(7)+CS(9)	$6,13^{f}$	100,4	8,86							24,1	28,6
		38/62	M(30)+BS(16)+CGF(12)+CS(8)+TM(7)	$6,06^{f}$	101,6	9,21							22,6	28,5
		29/71	M(27)+BS(14)+CGF(16)+CS(13)+TM(6)	$6,10^{f}$	97,7	8,63							23,0	28,3
		46/54	M(25)+BS(15)+CGF(14)+CS(8)+TM(8)	$6,11^{f}$	97,3	9,06							23,1	26,6
		47/53	M(15)+BS(13)+CGF(20)+CS(15)+TM(8)	$6,25^{e}$	98,5	8,65							23,3	28,4
[15]	Vacas	SM+FL	M(61)+BS(33)		$113,6^{3a}$	14,2							$22,1^{a}$	30,7
		50/50	MDH(62)+M(34)		$97,7^{b}$	11,7							$19,7^{b}$	30,8
[16]†	Vacas	SM+FL+SA	17%PB:M(41)+U(0,6)		131,0	$4,9^{3}$					2091		25,7	34,3
		62/48	17%PB:M(28)+U(0,6)+Sc(7)		123,2	3,9					1830		25,5	33,2
			18,5%PB:M(29)+U(1,6)+Sc(7)		126,0	6,5					1981		26,8	33,6
			18,5%PB:M(28)+U(0,9)+BS(11)+Sc(6)		133,7	9,1					2133		26,3	33,7

[a, b, e, f]Na mesma coluna, para a mesma experiência, valores com notações diferentes diferem significativamente ($P<0,05$). †Os efeitos foram determinados utilizando contrastes (comparações e nível de significância não apresentados).

[14] MOWREY *et al.*, 1999; [15] SCHINGOETHE *et al.*, 1999; [16] SANNES *et al.*, 2002.

[1]g N kg^{-1} matéria orgânica verdadeiramente digerida no rúmen; [2]Forragem; [3]mM.

BS = bagaço de soja; CGF = *corn gluten feed*; CS = cascas de soja; FL = feno de luzerna; M = milho; MDH = milho destilado húmido; PB = proteína bruta; SA = sementes de algodão; Sc = sacarose; SM = silagem de milho; TM = sêmea de trigo; U = ureia.

estudo de CASPER e SCHINGOETHE (1989) a menor concentração de N amoniacal no rúmen, com dietas com hidratos de carbono mais solúveis e degradáveis (cevada ou soro de leite desidratado) e ureia, deve ter resultado da absorção de amoníaco pela corrente sanguínea e da sua conversão em ureia, no fígado, pois a concentração de ureia no soro foi superior nas vacas alimentadas com cevada e com ureia do que com milho e bagaço de soja. Assim, neste estudo, o fornecimento, na dieta, de fontes de hidratos de carbono mais solúveis e degradáveis (cevada ou soro de leite desidratado) não aumentou, como era esperado, a utilização de uma fonte de N altamente solúvel (ureia) para a produção de leite. As maiores concentrações de N amoniacal com bagaço de soja do que com ureia, observadas no estudo de SANNES *et al.* (2002) foram surpreendentes e, muito provavelmente, foram devidas ao facto do teor em PB da dieta com bagaço de soja ter sido superior ao previsto (19,6%). Neste estudo (SANNES *et al.*, 2002), a adição de sacarose, apesar de ter diminuído a concentração de N amoniacal no rúmen, diminuiu, também, a síntese de proteína microbiana, não tendo os autores apresentado qualquer explicação para esta falta de consistência dos resultados. A depressão na concentração de N amoniacal observada por CAMERON *et al.* (1991), quando as dietas foram suplementadas com amido, não terá resultado de maior utilização do amoníaco pelas bactérias, porque a passagem de N microbiano para o duodeno não aumentou, podendo ser atribuída a diminuição da produção de amoníaco no rúmen, devida a menor degradação da PB da dieta, como indicado pelo superior fluxo de N não amoniacal e não microbiano com o aumento do amido na dieta.

Nos estudos analisados, os fluxos de N para o duodeno e a eficiência de síntese de proteína microbiana foram, geralmente, afectados, uma vez que as dietas utilizadas promoveram diferenças significativas na produção de AGV no rúmen. HERRERA-SALDANA *et al.* (1990) demonstraram que dietas sincronizadas para libertação rápida de N e de energia, contendo cevada e bagaço de algodão, promoveram maior produção e maior eficiência de síntese de proteína microbiana do que dietas sincronizadas, mas lentamente fermentáveis, contendo sorgo e drêches de cevada, ou dietas assíncronas, com cevada e drêches de cevada, ou sorgo e bagaço de algodão.

Em termos de resposta produtiva ao sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, os resultados não são consistentes. HERRERA-SALDANA e HUBER (1989) utilizando as mesmas dietas do ensaio posterior (HERRERA-SALDANA *et al.*, 1990), mostraram que vacas no início da lactação, alimentadas com uma dieta sincronizada para

rápida degradação ruminal de energia e de N, produziram mais leite do que vacas alimentadas com dieta sincronizada, mas lentamente fermentável, ou com dietas assíncronas, provavelmente devido à maior produção de proteína microbiana no primeiro caso. A maior utilização do N de ureia na dieta com soro de leite desidratado, no estudo de CASPER e SCHINGOETHE (1986), reflectiu-se na ingestão voluntária de vacas no início da lactação. Já outros autores (CASPER e SCHINGOETHE, 1989; MCCARTHY *et al.*, 1989; CASPER *et al.*, 1990; CAMERON *et al.*, 1991; STOKES *et al.*, 1991; ALDRICH *et al.*, 1993; MANSFIELD e STERN, 1994; PETIT e TREMBLAY, 1995a; CASPER *et al.*, 1999; MOWREY *et al.*, 1999; SCHINGOETHE *et al.*, 1999; SANNES *et al.*, 2002) não observaram respostas positivas na produção de leite ao maior sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen.

A ausência de resposta produtiva ao sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia não é claramente explicada pelos efeitos na fermentação no rúmen. Por exemplo, no estudo de MCCARTHY *et al.* (1989), embora a digestão da MO e o fluxo de N microbiano tivessem sido superiores com a dieta à base de cevada suplementada com bagaço de soja, as dietas à base de milho suportaram maiores produções de leite. Salienta-se, contudo, que estas respostas podem ter sido afectadas pela ingestão significativamente inferior com dietas à base de cevada, o que pode ter mascarado as respostas devidas à fonte de proteína e de hidratos de carbono. CASPER e SCHINGOETHE (1989) e CASPER *et al.* (1990) referem que a menor produção de leite de vacas alimentadas com dietas com cevada e ureia pode estar relacionada com o facto das taxas de degradação da cevada e da ureia serem incompatíveis, afectando a ingestão de MS. Opinião que vai no sentido oposto à defendida por BLAUWIEKEL e KINCAID (1986). Perante estes resultados contraditórios, CASPER *et al.* (1990) sugeriram que diferenças na solubilidade dos NSC, mas não na degradabilidade, podem resultar em diferentes respostas animais, referindo CASPER *et al.* (1999) que os benefícios mínimos do sincronismo entre as fontes de NSC e de RDP observados se deveram ao facto de as vacas utilizadas se encontrarem no meio da lactação e, portanto, terem menores necessidades em proteína.

Alguns estudos constantes no QUADRO 3.2 avaliaram os efeitos do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen manipulando a relação entre a energia fermentável e o N degradável no rúmen, com vista a identificar qual a relação ideal entre estes dois factores. STOKES *et al.* (1991) verificaram que vacas leiteiras alimentadas com dietas com elevadas concentrações de NSC e de RDP (38 e 13,7% na MS,

respectivamente) não exibiram elevada eficiência de síntese ou de produção de PB microbiana, quando comparadas com vacas alimentadas com menores concentrações destes componentes, sugerindo que a ausência de resposta se deveu à diminuição drástica do pH no rúmen. Também MABJEESH *et al.* (1997) sugeriram que quando as dietas contém uma elevada concentração de RDP (73% da PB total da dieta), a suplementação com uma concentração elevada de NSC degradáveis no rúmen não tem influência positiva na produção bacteriana ou na eficiência de síntese de proteína microbiana, provavelmente devido à diminuição do pH do rúmen, provocada pela elevada concentração de NSC, ou à falta de N para a população bacteriana, o que pode ocorrer via assincronismo entre a energia libertada ou pela falta de compostos azotados, que não N amoniacal. Os resultados deste estudo sugerem que um fornecimento deficiente de aminoácidos e de péptidos ao rúmen é responsável pelo menor fluxo de PB bacteriana em ambas as dietas com elevadas concentrações de RDP. Já ALDRICH *et al.* (1993) observaram maior fluxo de N microbiano para o duodeno com dieta com elevada disponibilidade ruminal de NSC e de proteína. SHABI *et al.* (1998) observaram maior fluxo de N para o duodeno com dietas com mais MO degradável e menos PB degradável no rúmen, tendo sido observado o menor fluxo de N para o duodeno nas vacas alimentadas com menos MO e mais PB degradáveis no rúmen.

Note-se, contudo, que os resultados podem ser diferentes em vacas com maiores níveis de ingestão e de produção de leite, uma vez que a ingestão de MS pode afectar a eficiência de síntese de proteína microbiana, pela alteração das taxas de passagem das fases sólida e líquida, afectando a libertação de energia e de N e a sincronia quantitativa entre eles.

3.2.4. Índices de sincronização

Os trabalhos até agora discutidos mostram que os efeitos do sincronismo, alcançado por alteração dos ingredientes, entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen têm efeitos variados no crescimento e na eficiência de crescimento microbiano. Contudo, tais trabalhos podem ter utilizado dietas sincronizadas numa base temporal alargada (dia, por exemplo), mas desequilibradas em períodos curtos (hora, por exemplo). SINCLAIR *et al.* (1993 e 1995) utilizaram os dados da degradação dos alimentos *in situ* para tentar melhorar a eficiência de síntese de proteína microbiana, através da manutenção de quantidades e de relações apropriadas entre os fornecimentos de hidratos de carbono disponíveis e de N

numa base horária. Estes autores calcularam o "índice de sincronização" de acordo com a seguinte equação:

$$\left(25 - \sum_{1...24} \sqrt{(25 - N/MO \cdots horários)^2} / 24)\right) / 25$$

onde 25 = 25 g N kg^{-1} MO verdadeiramente digerida no rúmen, que se assume ser a relação óptima, e onde um índice de 1 representa uma perfeita sincronia entre os fornecimentos de N e de energia durante o dia, enquanto valores inferiores a 1 indicam o grau de assincronia.

Utilizando esta aproximação, SINCLAIR *et al.* (1993) efectuaram um estudo em ovelhas, com o objectivo de examinar os efeitos do sincronismo do fornecimento horário de energia e de N. Formularam uma dieta sincronizada (dieta A; RDP kg^{-1} hidratos de carbono = 44,6) e outra assíncrona (dieta B; RDP kg^{-1} hidratos de carbono = 57,6) em relação ao fornecimento horário de energia e de N. As dietas continham ingredientes diferentes, mas teor idêntico em energia metabolizável (EM; 9,5 MJ kg^{-1} MS) e em RDP (96 g kg^{-1} MS). Estes autores verificaram que as proporções de AGV no rúmen foram mais estáveis com a dieta sincronizada, tendo sido o pH inferior em todos os tempos, após as refeições com a dieta A. Esta dieta nunca promoveu deficiência em amoníaco para o crescimento microbiano, enquanto a dieta B o provocou durante 20 horas por dia. Estes resultados sugerem que a dieta sincronizada deu origem a uma população mais estável de microrganismos no rúmen, resultando em menor variação nas proporções molares de AGV. Contrariamente, foi evidente uma maior reciclagem de N com a dieta assíncrona. A concentração de hidratos de carbono das bactérias do rúmen foi medida para determinar se os micróbios armazenam energia em excesso em relação ao fornecimento de N e, deste modo, para servir como um índice de sincronização. No entanto, o teor de hidratos de carbono armazenados foi mais influenciado pela forma e pela taxa de degradação da fracção hidratos de carbono do que pelo grau de sincronismo entre a libertação de N e de energia.

Por outro lado, SINCLAIR *et al.* (1993) assumiram uma relação constante de 6,4 kg MO verdadeiramente digerida no rúmen kg^{-1} RDP como óptima para o crescimento microbiano, mas a relação óptima pode depender, entre outros, do estado fisiológico do animal, o que pode modificar as conclusões retiradas. Com efeito, O'CONNOR *et al.* (1993), numa revisão da literatura, mostraram que a eficiência microbiana das vacas lactantes e não lactantes era de 4,8 e 6,5 kg MO fermentável no rúmen kg^{-1} PB microbiana,

respectivamente, tendo ARIELI *et al.* (1993) verificado que para vacas no meio da lactação, alimentadas com proporções variáveis de RDP, a relação foi de 4,5 kg MO efectivamente degradável no rúmen kg^{-1} PB microbiana.

A produção microbiana pode, também, depender da fracção RDP, da taxa de digestão dos substratos energéticos no rúmen (HOOVER e STOKES, 1991) e do padrão de fornecimento de energia (HENNING *et al.*, 1993). ARIELI *et al.* (1996), ao testarem a técnica dos sacos de *nylon* na avaliação das flutuações de metabolitos no rúmen, observaram uma forte relação entre os dados de degradabilidade *in sacco* e a variação nos parâmetros ruminais, que foi induzida pelas refeições e, como as alterações na concentração de N amoniacal no rúmen foram superiores na dieta com elevado teor em RDP e baixo teor em MO degradável, concluíram que a relação MO/PB deve ser superior a 4,6 para assegurar a mínima flutuação de metabolitos.

SINCLAIR *et al.* (1995) efectuaram, posteriormente, um estudo com o objectivo de examinar os efeitos do sincronismo do fornecimento horário de energia e de N em dietas com similar composição em hidratos de carbono, mas diferindo na taxa de libertação de N. Duas dietas foram formuladas: uma para ser sincronizada (dieta S) e outra para ser assíncrona (dieta A) em termos de libertação horária de N e de energia no rúmen. A eficiência de síntese de proteína microbiana (g N kg^{-1} MO verdadeiramente degradada no rúmen) foi 11 a 20% superior nos animais alimentados com a dieta S do que com a dieta A. Ambas as dietas forneceram um excesso de ERDP, em relação ao valor de 9 g ERDP MJ^{-1} FME recomendado pelo AFRC (1993) para animais alimentados ao nível da manutenção, com uma relação estimada em 9,5 e 9,9 g ERDP MJ^{-1} FME para as dietas, respectivamente, S e A. A relação diária observada de N degradável no rúmen em relação aos componentes energéticos foi, também, similar entre as duas dietas e acima do nível óptimo recomendado por CZERKAWSKI (1986). Os autores concluíram, então, que a produção de N microbiano foi mais eficiente quando os fornecimentos de energia e de N foram sincronizados.

WITT *et al.* (2000) testaram, também, em ovelhas, o efeito do sincronismo horário. A partir dos dados de degradabilidade *in situ* dos alimentos, formularam três dietas à base de silagem de erva (11,8 MJ EM kg^{-1} MS; 102 g MP kg^{-1} MS) de igual relação N/MO de fornecimento diário, mas de diferente padrão horário de libertação dos nutrientes (sincronizado, assíncrono e intermédio), tendo verificado que o sincronismo horário de energia e de N (dieta sincronizada) não afectou significativamente a produção de leite, a

produção de gordura do leite, o teor em proteína do leite e a ingestão de MS, mas diminuiu a concentração plasmática de ureia ao longo do dia. Concluíram, assim, que o sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen não tem um efeito importante na produção de leite em ovelhas e sugeriram que os ruminantes quando alimentados com dietas assíncronas, *ad libitum*, têm a possibilidade de modificar o seu padrão de ingestão para atingir uma taxa de libertação mais sincronizada de N e de energia.

A discussão realizada permite concluir que a manipulação do sincronismo através da alteração dos ingredientes da dieta apresenta alguns problemas, tais como a impossibilidade de identificar se os aumentos na síntese de proteína microbiana observados nalguns estudos são efeito do sincronismo ou de factores associados à manipulação dos ingredientes (nível e tipo) da dieta, pois, efeitos claros passíveis de serem atribuídos ao sincronismo podem ser efeitos específicos, por exemplo de nutrientes individuais, particularmente proteína e energia (DEWHURST *et al.*, 2000a), de diferentes alimentos, de diferentes quantidades totais ou relações entre os nutrientes libertados no rúmen (HENNING *et al.*, 1991; NEWBOLD e RUST, 1992; HENNING *et al.*, 1993). Mais, outro problema dos estudos em que as taxas de degradação/fermentação das fracções proteicas e energéticas, pré-determinadas em estudos *in sacco* (SINCLAIR *et al.*, 1993 e 1995), são utilizadas para calcular o "índice de sincronização" passa pelo facto da secagem e da moenda dos substratos alterarem as suas características e, por isso, a disponibilidade dos componentes utilizados para derivar o índice (DAVIES *et al.*, 1998).

3.3. Alteração do padrão de alimentação

Os problemas inerentes ao estudo do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen alcançado pela alteração dos ingredientes da dieta, podem, pelo menos parcialmente, ser ultrapassados pela utilização de meios *in vitro*, nos quais é possível o controlo da quantidade e da taxa de fornecimento de nutrientes (NEWBOLD e RUST, 1992), pela infusão de nutrientes directamente no rúmen ou pelo fornecimento dos mesmos ingredientes aos animais de acordo com diferentes padrões de alimentação (DEWHURST *et al.*, 2000a).

Já a interpretação dos resultados de estudos nos quais o padrão de alimentação é alterado nem sempre é clara, sendo isto especialmente verdadeiro quando a dieta é rica em hidratos de carbono rapidamente fermentáveis (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995). Isto

porque se a frequência de alimentação de toda a dieta ou do componente rico em hidratos de carbono rapidamente fermentáveis é alterado, existem, geralmente, efeitos pronunciados no pH do rúmen, nas proporções molares de AGV, etc., que podem influenciar o crescimento microbiano. Assim sendo, provavelmente, o delineamento experimental que, nesta matéria, oferece a interpretação mais clara é aquele em que o padrão de alimentação do componente proteico da dieta é alterado, enquanto todos os outros são mantidos constantes (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995).

3.3.1. Estudos in vitro e infusão de nutrientes no rúmen

No QUADRO 3.3 encontram-se sumariados resultados, obtidos por diferentes autores, do efeito da sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen, manipulada pela infusão de nutrientes ou utilizando sistemas *in vitro*, na síntese e na eficiência de síntese de proteína microbiana. Na discussão dos resultados obtidos nestes trabalhos não distinguiremos a metodologia experimental utilizada (infusões ou sistemas *in vitro*), uma vez que o objectivo destes estudos é similar, ou seja, estudar os efeitos da sincronização da disponibilidade de nutrientes no rúmen, anulando os efeitos perturbadores da alteração dos ingredientes da dieta.

Como se pode observar, existe pouca evidência experimental de resposta positiva à sincronização das disponibilidades de N e de energia no crescimento microbiano e na eficiência de síntese de proteína microbiana (ROOKE *et al.*, 1987; NEWBOLD e RUST, 1992; KIM *et al.*, 1999a). Os fornecimentos de N e de energia da silagem de erva são, normalmente, considerados assíncronos. Com efeito, alguns estudos delineados de forma a rectificar este problema deram resultados positivos, que foram interpretados como indicadores de uma resposta do crescimento microbiano à sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen (ROOKE *et al.*, 1987; DAWSON *et al.*, 1988; ROOKE e ARMSTRONG, 1989). Contudo, estes estudos não tiveram como objectivo principal testar o efeito da sincronização, pelo que outros factores podem ter desempenhado algum papel e mascarado o efeito do sincronismo *per se*. Já os resultados obtidos por KIM *et al.* (1999a e 1999b; QUADRO 3.3) são difíceis de explicar. Com efeito, o assincronismo associado com silagens de erva prende-se com o facto da disponibilidade de energia rapidamente fermentável ser reduzida na altura em que se encontram disponíveis em abundância, péptidos, aminoácidos e amoníaco. Mas, KIM *et al.* (1999a) não

QUADRO 3.3 - Efeito da sincronização entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, manipulada por infusão de nutrientes no rúmen, ou em estudos *in vitro*, na síntese de proteína microbiana e na eficiência de síntese de proteína microbiana.

Ref.	Unidade Exp.	Dieta base Distribuição	Infusões/ Nutrientes adicionados *in vitro*	Observações
Infusões				
[1]	Novilhos	P(60)+CC(40)	Amido e Ureia numa única dose às 09 h	Condições de sincronismo e padrão de fornecimento de energia sem efeito na eficiência de síntese de proteína microbiana.
		P 1x dia^{-1}	Amido numa única dose às 09 h e Ureia em três doses iguais (09, 11 e 13 h)	
		CC 2x dia^{-1}	Glucose numa única dose às 09 h e Ureia em três doses iguais (09, 11 e 13 h)	
			Glucose e Ureia em três doses iguais (09, 11 e 13 h)	
[2]†	Vacas	SE	Caseína (21 g N dia^{-1} + 0,17 kg MO dia^{-1})	As infusões com glucose aumentaram o crescimento microbiano. A eficiência de síntese de proteína microbiana aumentou, apenas, quando a mistura de caseína e glucose foi infundida.
		2x dia^{-1}	Ureia (28 g N dia^{-1})	
			Glucose (0,87 kg MO dia^{-1})	
			Caseína + Glucose (17 g N dia^{-1} + 0,93 kg MO dia^{-1})	
[3]	Vacas	SE	Sacarose† (170 g kg^{-1} MS de silagem)	A infusão de caseína aumentou o crescimento microbiano ($P<0,05$) e a eficiência de síntese de proteína microbiana (efeito não significativo).
		2x dia^{-1}	Sacarose + Caseína‡ (23 g kg^{-1} MS de silagem)	
			Sacarose + Ureia‡ (8 g kg^{-1} MS de silagem)	
			Sacarose + Bagaço de soja‡ (64 g kg^{-1} MS de silagem)	

[1] SALTER *et al.*, 1983; [2] ROOKE *et al.*, 1987; [3] ROOKE e ARMSTRONG, 1989.
†Infusões realizadas a taxa constante; ‡Fornecidos em duas partes iguais.
CC = alimento concentrado; P = palha; SE = silagem de erva.

QUADRO 3.3 - Efeito da sincronização entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, manipulada por infusão de nutrientes no rúmen, ou em estudos *in vitro*, na síntese de proteína microbiana e na eficiência de síntese de proteína microbiana (continuação).

Ref.	Unidade Exp.	Dieta base Distribuição	Infusões/ Nutrientes adicionados *in vitro*	Observações
[4] Exp.1	Ovelhas	PT(90) + FP(6)+M(3)+U(0,4)	Açúcares (340 g) + Ureia (9,2 g) + Caseínato de sódio (10,2 g)	Condições de sincronismo a nível da manutenção (Exp. 1) ou a nível superior (Exp. 2) diminuíram a concentração e a variação de N amoniacal, mas não afectaram o crescimento microbiano e a eficiência de síntese de crescimento microbiano. A infusão contínua de açúcares aumentou a eficiência de crescimento microbiano.
		6x dia^{-1}	2 doses iguais (08/20 h)	
			Açúcares em 2 doses iguais (08/20 h) + N em contínuo (gradual)	
			Açúcares em contínuo + N em 2 doses iguais (08/20 h)	
			Açúcares e N em contínuo	
[4] Exp.2	Ovelhas	PT(88) + FP(6)+M(5)+U(0,4)	Açúcares (680 g) + Cloreto de amónia (32,6 g) + Caseínato de sódio (22,8 g)	
		6x dia^{-1}	Metade dos açúcares e total do N em 2 doses iguais (08/20 h) + metade dos açúcares em contínuo	
			Metade dos açúcares em 2 doses iguais (08/20 h)+N+metade dos açúcares em continuo	
			Açúcares em continuo + N em 2 doses iguais (08/20 h)	
			Açúcares e N em contínuo	

[4] HENNING *et al.*, 1993.
FP = farinha de peixe; M = melaços; PT = palha de trigo; U = ureia.

QUADRO 3.3 - Efeito da sincronização entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, manipulada por infusão de nutrientes no rúmen, ou em estudos *in vitro*, na síntese de proteína microbiana e na eficiência de síntese de proteína microbiana (continuação).

Ref.	Unidade Exp.	Dieta base Distribuição	Infusões/ Nutrientes adicionados *in vitro*	Observações
[5]	Vacas	SE 7,9 kg MS dia^{-1} 2x dia^{-1} (10/22 h)	Sem infusão Sacarose (1 kg dia^{-1}) em contínuo Sacarose (1 kg dia^{-1}) em 2 infusões de 6 h com início às 10.00 e 22.00 h Sacarose (1 kg dia^{-1}) em 2 infusões de 6 h com início às 16.00 e 04.00 h	Infusão de sacarose de forma sincronizada sem efeito na síntese de proteína microbiana.
[6]	Vacas	SE + C + BA 8 kg MS dia^{-1} + 4,2 kg MS dia^{-1} + 1,8 kg MS dia^{-1} 2x dia^{-1} (10/22 h)	Sem infusões 2 kg maltodextrina em contínuo 2 kg maltodextrina em 2 infusões de 6 h com início às 10 e 22 h 2 kg maltodextrina em 2 infusões de 6 h com início às 16 e 04 h	Infusão de maltodextrina de forma sincronizada aumentou a síntese de proteína microbiana.

[5] KIM *et al.*, 1999a; [6] KIM *et al.*, 1999b.
BA = bagaço de amendoim; C = cevada; SE = silagem de erva.

QUADRO 3.3 - Efeito da sincronização entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, manipulada por infusão de nutrientes no rúmen, ou em estudos *in vitro*, na síntese de proteína microbiana e na eficiência de síntese de proteína microbiana (continuação).

Ref.	Dieta base Distribuição	Infusões/ Nutrientes adicionados *in vitro*	Observações
In vitro			
[7]	*In vitro*	Glucose (25 g) intermitente no tempo 0 + N em excesso Glucose (25 g) em padrão intermédio + N em excesso Glucose (25 g) em incrementos graduais com 0,5 h de intervalo + N em excesso Glucose (12,5 g) intermitente no tempo 0 + N em excesso Glucose (12,5 g) em padrão intermédio + N em excesso Glucose (12,5 g) em incrementos graduais com 0,5 h de intervalo + N em excesso	As condições de sincronismo diminuíram a concentração e a variação de N amoniacal, mas não afectaram o crescimento microbiano e a eficiência de síntese de crescimento microbiano. A infusão intermitente de açúcares aumentou a eficiência de crescimento microbiano, sendo para níveis aceitáveis de fornecimento de N, a sincronização entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen de menor importância do que o padrão de fornecimento de energia.
[7]	Glucose (12,5 g l^{-1})+N (0,306 g l^{-1} + 0,9 g l^{-1} tripticase)	Glucose e N intermitente no tempo 0 Glucose intermitente no tempo 0 e N em 24 aumentos graduais com intervalos de 0,5 h Glucose em 24 aumentos graduais com intervalos de 0,5 h e N intermitente Glucose e N em 24 aumentos even com intervalos de 0,5 h	

[7] HENNING *et al.*, 1991.

QUADRO 3.3 – Efeito da sincronização entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, manipulada por infusão de nutrientes no rúmen, ou em estudos *in vitro*, na síntese de proteína microbiana e na eficiência de síntese de proteína microbiana (conclusão).

Ref.	Dieta base Distribuição	Infusões/ Nutrientes adicionados *in vitro*	Observações
[8]	*In vitro*	26 mg de N-ureia g^{-1} de glucose Aumento exponencial de 0,013 mg N g^{-1} glucose às 0 h até 48,9 g N g^{-1} glucose às 11 h	O número de microrganismos foi superior em condições de sincronismo das 5 às 8 horas de incubação, mas ao fim de 12 horas não foram detectadas diferenças. O assincronismo entre os fornecimentos de N de energia apenas teve efeito de curta duração no crescimento bacteriano.
[8]	*In vitro*	ML+BS ML+BSD MS+BS MS+BSD	

[8] NEWBOLD e RUST, 1992.
BS = bagaço de soja; BSD = bagaço de soja digerido; ML = milho de tamanho de partícula longo; MS = milho de tamanho de partícula pequeno.

observaram nenhuma melhoria no fluxo de N microbiano em condições de sincronismo obtidas através de infusão de sacarose e KIM *et al.* (1999b) verificaram que, quando forneceram a vacas apenas silagem de erva, a infusão de açúcar não teve efeito na síntese de proteína microbiana, mas quando forneceram silagem de erva e alimento concentrado a infusão já aumentou a síntese de proteína microbiana. Os autores, perante estes resultados, sugeriram que o sincronismo, apenas, tem efeito na síntese de proteína microbiana em dietas com níveis elevados de hidratos de carbono fermentáveis no rúmen, embora isto pareça, somente, provável se a capacidade dos microrganismos em armazenarem hidratos de carbono for ultrapassada.

No estudo de HENNING *et al.* (1993; QUADRO 3.3), apesar de a concentração de N amoniacal no rúmen ter sido inferior e mais estável com condições de sincronismo, o fluxo de N microbiano e a eficiência de síntese de proteína microbiana não foram afectados. Esta observação pode ser explicada pelo facto de, embora o padrão de variação da concentração de N amoniacal ter diferido entre tratamentos, a concentração actual, em relação ao crescimento microbiano resultante dos vários padrões de fornecimento de energia, nunca ter sido limitante. Além disso, a reciclagem de N para o rúmen pode contribuir para explicar a ausência de resposta à sincronização das disponibilidades de N e de energia, pois durante períodos em que existe disponibilidade excessiva de N no rúmen, o N amoniacal é absorvido pelas paredes do órgão e, parte, aparece como ureia no reservatório do plasma, podendo este N ser, depois, reciclado para o rúmen, durante períodos de défice em N. Mas, apesar de, neste estudo, a reciclagem de N poder explicar a ausência de resposta ao maior sincronismo, isto pode não ser verdade para situações de fornecimento elevado de energia e de N, porque, neste caso, o N em excesso pode ser absorvido e excretado na urina e a posterior reciclagem do N para o rúmen pode ser insuficiente para assegurar as necessidades ditadas pela elevada disponibilidade de energia.

Na segunda experiência do estudo de HENNING *et al.* (1993), um maior sincronismo resultante de um nível de alimentação mais elevado não melhorou o fluxo de proteína microbiana nem a eficiência da sua síntese. Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por SALTER *et al.* (1983) que não verificaram resposta positiva ao sincronismo quando adicionaram mandioca ou glucose (como fonte de energia) ao rúmen de novilhos alimentados com palha, provocando diferentes graus de sincronização. Saliente-se, no entanto, que os resultados obtidos por SALTER *et al.* (1983) podem ser de difícil interpretação pelo facto dos tratamentos terem, também, diferido nas relações e nas

quantidades de N e de hidratos de carbono adicionadas ao rúmen.

No entanto, o facto de no estudo *in vivo* de HENNING *et al.* (1993) a energia fornecida de forma gradual ao rúmen ter resultado em maior e mais eficiente síntese de proteína microbiana, do que a mesma quantidade de energia fornecida de acordo com um padrão rápido, vai na direcção oposta ao observado *in vitro* por HENNING *et al.* (1991) para tratamentos similares. Esta contradição de resultados pode, contudo, ser explicada pelos factos de no estudo *in vitro* o pH ter-se mantido acima dos 6, sem nunca ter descido abaixo desse valor e dos valores de eficiência de síntese de proteína microbiana terem sido, apenas, calculados até ao ponto de deplecção dos substratos energéticos; enquanto no estudo *in vivo* houve períodos de pH baixo e níveis reduzidos de substratos rapidamente fermentáveis. Os resultados deste estudo *in vivo* vão, também, em direcção oposta ao observado por SALTER *et al.* (1983) que não observaram diferenças significativas na eficiência de síntese de proteína microbiana, apesar do fornecimento intermitente (*pulse dose*) ter diminuído o pH para 5,5, enquanto o fornecimento contínuo manteve o pH sempre acima de 6.

Uma vez que os resultados obtidos por HENNING *et al.* (1993) sugerem que a mera melhoria do grau de sincronização entre as taxas de libertação de N e de energia no rúmen não aumenta a produção microbiana, estes autores referem que o objectivo, aquando da formulação de dietas, deverá ser, primeiro, o de obter o padrão de fornecimento de energia contínuo e, depois, garantir o fornecimento de uma quantidade apropriada de N disponível no rúmen em relação à quantidade de energia que se espera seja libertada nesse compartimento por dia. Somente depois poderá haver alguma vantagem em assegurar, também, um padrão de fornecimento de N mais contínuo, em particular evitando uma libertação muito rápida de N no rúmen.

NEWBOLD e RUST (1992) demonstraram que o assincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen, apenas, teve efeitos de curta duração no crescimento bacteriano. Contudo, os autores salientam que estas observações não permitem concluir que o assincronismo não é importante *in vivo*. Isto porque: (1) alterações na taxa de degradação do N devida a alterações na fonte de N podem ser acompanhadas por alterações no fornecimento de aminoácidos; (2) se as taxas de fornecimento de N e de energia não são sincronizadas, qualquer alteração na taxa de passagem do rúmen reduzirá a eficiência de utilização ruminal do N e dos hidratos de carbono, dependendo qual o nutriente em excesso (com efeito, neste estudo não houve diferença no número de

microrganismos entre os tratamentos, para um tempo de retenção no rúmen simulado de 12 horas, mas se este tempo fosse encurtado, o fornecimento de N em relação ao de energia era reduzido e o crescimento bacteriano seria limitado em condições de assincronismo); e (3) os efeitos de excessos de N de curta duração não podem ser adequadamente estudados utilizando meios de cultura simples que não simulam a perda do excesso de N por absorção através das paredes do rúmen. Os estudos *in vitro* apresentam, ainda, a limitação de a acumulação de produtos finais da fermentação poder afectar o crescimento bacteriano (PIRT, 1975).

3.3.2. Alteração do padrão de alimentação do suplemento proteico

A manipulação do sincronismo entre as disponibilidades de N e de energia no rúmen através da alteração das fontes de N pode ser realizada, na prática, pelo menos, por três processos: (1) utilização, na dieta, de fontes proteicas de diferente degradabilidade no rúmen; (2) tratamento das fontes proteicas, para alteração da sua degradabilidade; e (3) fornecimento mais frequente ou alteração do padrão de alimentação das fontes proteicas durante o dia. A terceira possibilidade, embora não altere a taxa de degradação das proteínas, modifica a fase do dia em que a proteína está disponível para os microrganismos do rúmen. Os efeitos da alteração do padrão de alimentação e da frequência de alimentação do suplemento proteico na fermentação ruminal e na produtividade de vacas leiteiras têm sido estudados sobretudo por P.H. ROBINSON e colaboradores.

A informação disponível sobre a fermentação ruminal e a cinética de passagem das partículas no rúmen sugere a existência de um período após a alimentação em que as condições de fermentação favorecem a passagem do rúmen de partículas recentemente ingeridas com características de densidade apropriadas (ROBINSON, 1989). Uma vez que, em vacas alimentadas duas vezes por dia, a actividade de ruminação foi superior durante a noite do que durante o dia (ULYATT *et al.*, 1984) e que a capacidade do rúmen foi máxima à meia noite e mínima cerca das sete horas da manhã (ROBINSON *et al.*, 1987), o período entre aproximadamente as 24 horas e a refeição da manhã pode ser o período do dia com o mais rápido fluxo do rúmen. Isto representa, então, uma oportunidade para que maiores proporções de proteína e de alimentos concentrados, com características de densidade e de tamanho que conduzam à passagem, escapem do rúmen neste período. Esta passagem pode beneficiar as proteínas rapidamente fermentáveis e as fontes de amido que podem afectar

negativamente a fermentação no rúmen e que são mais eficientemente digeridas no intestino.

GILL e ROBINSON (1995) observaram, porém, maior percentagem de proteína da dieta que escapou à degradação no rúmen quando o suplemento proteico foi fornecido de dia (08:30 horas, 50%) do que quando foi fornecido à noite (00:30 horas; 39%), sugerindo que a manipulação das estratégias de alimentação podem alterar o sincronismo da absorção dos nutrientes. Igualmente, ROBINSON *et al.* (1997) forneceram, a quatro vacas no meio da lactação, uma dieta base constituída por silagem de luzerna, silagem de aveia e alimento concentrado, constituído maioritariamente por cevada, e um suplemento proteico a 15% da ingestão de MS da dieta base fornecido uma vez ao dia, 0,5 horas após a refeição da manhã (dia) ou 7,5 horas após a refeição da tarde (noite) e verificaram que o fornecimento do suplemento proteico de noite não afectou o pH e a concentração de N amoniacal no rúmen, mas aumentou a digestibilidade ruminal aparente da MO e da PB e a concentração de AGV no rúmen, excepto a de isobutirato, e diminuiu o fluxo de N não amoniacal e não bacteriano. Estes autores concluíram que o fornecimento de fontes proteicas à noite estimula a fermentação no rúmen, particularmente durante a noite, resultando em maior digestão da MO e menor passagem da proteína da dieta para os compartimentos posteriores do tubo digestivo.

O padrão de variação diurna do perfil em aminoácidos da proteína que chega ao duodeno pode, também, fornecer informação sobre o efeito do padrão de alimentação do suplemento proteico na passagem da proteína da dieta do rúmen. Neste sentido, ROBINSON *et al.* (2002) forneceram, a quatro vacas, uma dieta, *ad libitum*, das 8 às 24 horas e 2,5 kg (na MS) de um suplemento proteico (47% PB; constituído por cevada, bagaço de colza, bagaço de soja, farinha de peixe e glúten de milho) às 8.30h ou às 0.30h. A hora de fornecimento do suplemento não afectou as proporções diárias de qualquer aminoácido na proteína duodenal, mas todos os aminoácidos, excepto a tirosina e a fenilalanina, variaram com a altura do dia em que o suplemento proteico foi fornecido, sugerindo a possível ocorrência de padrões diurnos na relação proteína bacteriana e proteína da dieta que escapou à degradação. Com efeito, o aumento na proporção de ácido glutâmico na proteína do digesta duodenal entre as 12 e as 21 horas em vacas com suplemento dado às 8.30h, sugere um aumento no fluxo de proteína que escapou à degradação em relação à proteína bacteriana. Isto é suportado pela diminuição na proporção de ácido aspártico na proteína do digesta duodenal neste período. Contrariamente, o grande aumento na proporção de ácido

aspártico na proteína do digesta duodenal entre as 17 e as 4 horas em vacas às quais o suplemento foi fornecido às 8.30h, sugere uma diminuição na proteína da dieta que escapou à degradação. Nas vacas que receberam o suplemento às 0:30h, a proporção de ácido glutâmico na proteína do digesta duodenal aumentou entre as 8 e as 17 horas, enquanto a proporção de ácido aspártico diminuiu, indicando que a proporção de proteína que escapou à fermentação no rúmen no digesta duodenal estava a aumentar. Já entre as 17 e as 22 horas, o aumento na proporção de ácido aspártico e a diminuição de ácido glutâmico sugere precisamente o contrário, ou seja, que a contribuição da proteína microbiana para o fluxo total de PB duodenal era superior.

É, geralmente, assumido que os alimentos consumidos pela vaca leiteira com tamanho de partícula suficientemente pequeno para passar para os compartimentos posteriores do tubo digestivo terão um tempo de latência de passagem muito pequeno. Todavia, os resultados do estudo supramencionado questionam este princípio, devido ao atraso (6 a 7 horas) observado entre o consumo do suplemento proteico contendo glúten de milho e farinha de peixe (ambos lentamente degradáveis, ambos com tamanho de partícula suficientemente pequeno para deixarem o rúmen) e para que a alteração no perfil de aminoácidos da proteína do digesta duodenal reflectisse o perfil em aminoácidos do suplemento proteico. Deste modo, tempos de latência de passagem tão longos para alimentos com tamanho de partícula pequeno sugerem que a quantidade de proteína da dieta que escapa à fermentação no rúmen pode não ser rigorosamente prevista através de modelos de cinética de primeira ordem e que as avaliações da fracção PB e, talvez, de outras fracções dos alimentos feitas nesta base podem ter pequeno valor, a não ser que sejam, também, incluídos no modelo de avaliação os tempos de latência de passagem e de digestão.

ROBINSON e MCQUEEN (1994) avaliaram o efeito da sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen, alcançada por alteração da frequência de alimentação do suplemento proteico, na função ruminal e na produtividade de vacas leiteiras. Estes autores realizaram um estudo com 24 vacas no início da lactação, às quais forneceram, *ad libitum*, uma dieta base constituída por 47% de silagem de luzerna e timóteo e 53% de alimento concentrado, contendo cevada e milho. As fontes proteicas (bagaço de soja ou farinha de sangue + glúten de milho) foram fornecidas duas ou cinco vezes por dia a um nível de 9% da ingestão total de MS. Os resultados obtidos encontram-se sumariados no QUADRO 3.4. Apesar dos resultados não suportarem a existência de

benefícios de libertação sincronizada de N e de energia no rúmen na resposta produtiva, sugerem que proteína solúvel ou péptidos ou ambos podem actuar como um reservatório para fornecer N para o crescimento microbiano em alturas do dia em que as concentrações de N amoniacal são muito baixas. Todavia, segundo os autores, existem, pelo menos, três razões possíveis para a falta de diferenças observadas neste estudo: (1) a manipulação de libertação de proteína no rúmen teve pouca influência nos padrões diurnos das fracções de N solúvel ou nos seus valores médios; (2) uma vez que quando o alimento concentrado foi fornecido cinco vezes por dia as vacas consumiram a dieta base mais rapidamente do que quando foi fornecido duas vezes por dia, a maior contribuição do N da dieta base nessas vacas contraria a menor contribuição do N da fonte proteica suplementar, sendo consistente com a falta de diferenças entre estes grupos nos padrões diurnos de concentrações de componentes de N solúvel no rúmen; e (3) o crescimento microbiano não foi limitado pela ingestão de RDP.

3.4. Frequência de alimentação

O fraccionamento da dieta total ou do alimento concentrado, bem como as estratégias de distribuição do alimento concentrado, na alimentação da vaca leiteira, têm sido direccionados para os possíveis efeitos na eficiência microbiana, mediados por alteração na flutuação de metabolitos no rúmen, e para os efeitos na ingestão voluntária resultantes da provável alteração da taxa de degradação dos alimentos. Todavia, o aumento da frequência de alimentação é, de facto, um método que permite ultrapassar quase todos os problemas de assincronismo entre as disponibilidades de nutrientes no rúmen. Assim sendo, quando se fala dos efeitos do sincronismo entre as disponibilidades de nutrientes no rúmen, estes aspectos não podem deixar de ser considerados.

A questão da frequência de alimentação assume, claramente, maior importância nos animais explorados em regime de estabulação, quando a quantidade de alimento ingerido e a frequência de alimentação são muito reguladas pelo produtor. Isto porque, no estado selvagem, os ruminantes podem ingerir alimento ao longo do dia, do nascer ao pôr do sol, ou mesmo durante a noite. A quantidade ingerida e a frequência das refeições estão basicamente dependentes da vontade do animal e da disponibilidade de alimento, continuando os animais, quando em pastoreio, a manifestar este tipo de comportamento.

Na discussão do efeito do número diário de refeições da dieta, na fermentação no

QUADRO 3.4 - Efeito da fonte proteica (bagaço de soja = BS; farinha de sangue = FS; glúten de milho = GM) e frequência de alimentação do concentrado proteico (duas, 2x, ou cinco, 5x, vezes por dia) nos parâmetros ruminais, na ingestão de matéria seca (IMS) e na produção e composição do leite.

	BS		FS+GM		Efeitos		
	2x	5x	2x	5x	Fonte	Frequência	Interacção
Parâmetros ruminais							
pH	6,14	6,21	6,15	6,24	0,577	0,036	0,790
	mg l^{-1}						
NH_3	89,3	94,5	79,3	81,5	0,030	0,582	0,721
proteína	$16,9^{ab}$	$16,4^{ab}$	$13,5^{b}$	$18,9^{a}$	0,756	0,083	0,034
péptidos	113,7	108,1	110,2	99,2	0,388	0,217	0,716
total	219,2	219,0	203,1	199,5	0,131	0,756	0,904
Ácidos gordos voláteis, mmol l^{-1}							
acetato	66,7	66	66,3	65,6	0,694	0,467	0,995
propionato	23,8	21,5	21,2	18,6	<0,001	<0,001	0,859
isobutirato	0,8	0,8	0,8	0,8	0,559	0,924	0,936
butirato	11	11,6	11,4	11,2	0,994	0,493	0,283
isovalerato	$1,5^{a}$	$1,4^{b}$	$1,5^{ab}$	$1,6^{ab}$	0,018	0,251	0,045
valerato	1,4	1,3	1,3	1,3	0,060	0,293	0,765
total	106,3	102,5	102,5	99,2	0,034	0,036	0,863
Parâmetros produtivos							
IMS, kg dia^{-1}	26,23	26,00	26,06	26,11	0,976	0,928	0,889
Produção, kg dia^{-1}							
leite	35,89	35,89	36,19	35,92	0,923	0,935	0,934
gordura	1,28	1,18	1,26	1,29	0,993	0,840	0,775
proteína	1,12	1,13	1,11	1,09	0,686	0,888	0,823
lactose	1,68	1,69	1,71	1,69	0,871	0,925	0,869
Composição, %							
gordura	3,61	3,58	3,52	3,63	0,915	0,819	0,715
proteína	3,14	3,16	3,10	3,07	0,402	0,926	0,700
lactose	4,7	4,71	4,71	4,70	0,955	0,974	0,877

[a,b]Na mesma linha valores com notações diferentes diferem significativamente (P<0,05).
ADAPTADO DE ROBINSON e MCQUEEN (1994).

rúmen, deve ter-se em consideração o nível de inclusão de alimentos concentrados, sendo de esperar maiores benefícios com uma maior frequência de distribuição, em dietas com baixa relação forragem/concentrado, situação comum em vacas no início da lactação e de maior nível de produção. Obviamente, que se deve tomar em consideração não, apenas, o

teor em NSC, mas, também, a rapidez com que os substratos são fermentados no rúmen, pois mesmo uma dieta com um teor relativamente elevado em amido pode não beneficiar do aumento do número de refeições se a fonte de amido for lentamente degradável no rúmen (ROBINSON e SNIFFEN, 1985).

A distribuição da dieta uma vez ao dia pode gerar grandes flutuações diurnas nas concentrações de amoníaco (CECAVA *et al.*, 1990; SHABI *et al.*, 1998; LE LIBOUX e PEYRAUD, 1999; SHABI *et al.*, 1999), de AGV (KAUFFMAN, 1976; ROBINSON *et al.*, 1986) e de ácido láctico (ROBINSON *et al.*, 1986) no rúmen. Estas condições extremas de metabolitos neste compartimento podem inibir o crescimento e a actividade microbiana e, consequentemente, a degradação microbiana do alimento (ROBINSON, 1989). Assim sendo, a maior frequência de alimentação, ao diminuir as flutuações de metabolitos (KWAN *et al.*, 1977; SUTTON *et al.*, 1986; CECAVA *et al.*, 1990; ØRSKOV, 1994; SHABI *et al.*, 1999), pode, teoricamente, aumentar a eficiência de utilização dos nutrientes no rúmen (JOHNSON, 1976; BALDWIN e DENHAM, 1979). Todavia, a maior frequência de alimentação pode diminuir a flutuação diária do pH do rúmen (SUTTON *et al.*, 1986; CECAVA *et al.*, 1990; ØRSKOV, 1994; SHABI *et al.*, 1999), mas o valor médio de pH pode, também, diminuir (SUTTON *et al.*, 1986; SHABI *et al.*, 1999; DEHORITY e TIRABASSO, 2001). Note-se que se a maior frequência de alimentação resultar numa variação no pH do rúmen entre 5,7 e 5,9, o efeito na fermentação da fibra pode ser mais negativo quando comparado com uma menor frequência de alimentação que promova um padrão de variação em que o pH desça para valores de 5,3, mas, também, atinja valores de 6,7 em diferentes alturas do dia (ROBINSON, 1989; CALSAMIGLIA *et al.*, 2002).

Os efeitos do fraccionamento da dieta total na digestibilidade da MS, da MO, da PB, do amido e da fracção NDF não são consistentes. Com efeito, em vários estudos a digestibilidade total da dieta (RAKES *et al.*, 1957; SHABI *et al.*, 1998; DHIMAN *et al.*, 2002) e a ingestão voluntária (STANLEY e MORITA, 1967; NOCEK e BRAUND, 1985; KLUSMEYER *et al.*, 1990b; SHABI *et al.*, 1998; DHIMAN *et al.*, 2002) não foram afectadas pela sua distribuição mais de uma vez ao dia. SHABI *et al.* (1999) referem, porém, aumentos na digestibilidade pós-ruminal da MO, da PB e dos NSC com o aumento da frequência de alimentação, mas não observaram efeitos na síntese e na eficiência de síntese de proteína microbiana.

A menor flutuação na concentração de N amoniacal no rúmen com maior frequência de alimentação aumenta, provavelmente, a utilização do amoníaco e diminui a

quantidade de amoníaco que é absorvido através das paredes do rúmen, o que se reflecte numa menor excreção de N na urina. Com efeito, a menor frequência de alimentação conduz a que a concentração ruminal média de N amoniacal diminua (YANG e VARGA, 1989; SHABI *et al.*, 1998), tendo sido referido que a distribuição da dieta mais frequentemente aumenta o fluxo de PB microbiana para o duodeno (CHEN *et al.*, 1987a; CECAVA *et al.*, 1990; SHABI *et al.*, 1998). Este aumento pode resultar do aumento do teor em MO fermentável, do pH mais estável e do tamponamento natural do rúmen, o que impede a diminuição do número de bactérias proteolíticas (ROBINSON, 1989), aumentando a proteólise e diminuindo a quantidade de proteína da dieta que escapa à fermentação (CHEN *et al.*, 1987a). Nestas situações, o número de protozoários tende, embora nem sempre, para aumentar (SHABI *et al.*, 1998). Note-se, aqui, que parece existir uma interacção entre o nível de energia e a frequência de alimentação em relação à eficiência aparente e verdadeira de síntese de N bacteriano, o que sugere que a eficiência de síntese de N bacteriano pode ser melhorada quando dietas com níveis moderados ou elevados de alimento concentrado são fornecidas mais frequentemente (CECAVA *et al.*, 1990).

Uma vez que os efeitos da maior frequência de alimentação se fazem sentir, sobretudo, numa fermentação ruminal mais estável, esta pode reflectir-se num aumento do teor em gordura do leite, embora as respostas positivas sejam, normalmente, verificadas, apenas, quando o teor em gordura do leite, com menor frequência de alimentação, é baixo, situações geralmente associadas ao fornecimento de dietas com elevada inclusão de alimentos concentrados ou com reduzido tamanho de partícula (GIBSON, 1984; SHABI *et al.*, 1998 e 1999). Estas respostas positivas no teor em gordura do leite podem ser mediadas, quer pela maior ingestão voluntária (GIBSON, 1984), quer pela secreção de insulina (FRENCH e KENNELLY, 1990) – que, se em níveis sanguíneos baixos, inibe a lipogénese e aumenta a lipólise no tecido adiposo e que, ao aumentar os precursores para a glândula mamária, aumenta a síntese de gordura do leite (YANG e VARGA, 1989) –, quer por um aumento da eficiência de utilização dos alimentos (JOHNSON, 1976), embora, neste caso, faltem dados sobre o efeito da possível mobilização das reservas corporais, pois a condição corporal não é, normalmente, avaliada, nos estudos de frequência de alimentação, devido ao facto da duração dos estudos não ser, no geral, suficientemente longa para gerar resultados significativos.

Decorre do exposto que serão de esperar maiores benefícios da maior frequência de alimentação com dietas com elevado teor em hidratos de carbono rapidamente

fermentáveis, uma vez que desta forma se previne a diminuição do pH do rúmen, o que reduz os efeitos negativos da fermentação intensa dos NSC e impede a diminuição do número de bactérias celulolíticas, proteolíticas e de protozoários, evitando, deste modo, a diminuição da digestibilidade da fracção NDF da dieta, bem como os riscos de ocorrência de acidose. Esta estratégia pode, ainda, aumentar a degradação das proteínas no rúmen, aspecto que será ou não vantajoso, dependendo do perfil em aminoácidos da proteína em causa.

Assim sendo, seria de esperar que estes efeitos da frequência de alimentação na fermentação no rúmen se traduzissem em efeitos positivos na resposta produtiva. No entanto, quer nos 35 trabalhos, publicados entre 1949 e 1983, revistos por GIBSON (1984), quer em estudos posteriores (NOCEK e BRAUND, 1985; KLUSMEYER *et al.*, 1990b; SHABI *et al.*, 1998; DHIMAN *et al.*, 2002), a resposta à maior frequência de alimentação, em termos de produção de leite, nem sempre foi positiva.

Mas, os resultados obtidos em condições controladas de que a maior frequência de alimentação nem sempre promove maiores produções de leite contrastam com as observações dos produtores de leite que revelam que a alimentação mais frequente é considerada crítica para atingir e manter produções elevadas. Nesta matéria, ROBINSON (1989) questiona pertinentemente: Serão as observações dos produtores incorrectas? Ou, não representará a investigação as situações práticas de produção? E a este propósito refere: (1) se ocorrem flutuações diurnas e se estas são suficientes para influenciar negativamente o crescimento microbiano, então, a sua eliminação pode ser benéfica e embora a alimentação mais frequente possa obliterar estes padrões, existem outras formas de atingir o mesmo efeito, nomeadamente dietas com elevada proporção de forragem ou alimentos concentrados com baixa taxa de fermentação no rúmen; (2) na alimentação de vacas em regime de estabulação livre com alimento completo, método muito utilizado na prática, em comparação com alimento completo fornecido *ad libitum* a vacas em regime de estabulação presa e alimentadas individualmente – o método de investigação corrente – os padrões de alimentação são, geralmente, muito menos espaçados ao longo do dia com uma elevada proporção do alimento total consumido nas primeiras duas a seis horas do ciclo de alimentação; (3) existem outras alternativas à alimentação mais frequente que permitem, também, ultrapassar as flutuações diurnas nas concentrações de metabolitos no rúmen como aumentar o espaço por vaca na manjedoura, a alimentação *ad libitum*, a redução da taxa de fermentação dos ingredientes do alimento completo e o aumento do tempo de vida

do alimento completo na manjedoura, mas, como estas estratégias são, não raro, impraticáveis nas unidades de produção comerciais, a utilização de uma maior frequência de alimentação continuará a ser uma prática corrente de maneio útil na manutenção de elevadas produções de leite.

Finalmente, no estudo da frequência de alimentação coloca-se, ainda, a questão da forma e da frequência de distribuição do alimento concentrado. Todavia, os objectivos inerentes às estratégias de alimentação do alimento concentrado residem mais na estabilização da fermentação no rúmen e na estimulação da ingestão voluntária do que na sincronização da disponibilidade de nutrientes no rúmen. Daqui decorre que este problema surge, sobretudo, nas situações de alimentação de vacas de elevada produção, isto é, quando se usam dietas com elevada inclusão de alimentos concentrados e quando é imperioso garantir elevadas ingestões voluntárias. Assim sendo, nestes casos, o aumento da frequência de alimentação do alimento concentrado é, normalmente, benéfico (GREENHALGH *et al.*, 1979; CASSEL *et al.*, 1984; CHALMERS *et al.*, 1984; PHIPPS *et al.*, 1984; REES e ROWLINSON, 1985; LITTLE *et al.*, 1987; YANG e VARGA, 1989; FRENCH e KENELLY, 1990; AGNEW *et al.*, 1996).

3.5. SERÁ, AFINAL, NECESSÁRIO, FORMULAR DIETAS SINCRONIZADAS?

A bibliografia analisada neste CAPÍTULO permite concluir que não existe evidência experimental convincente da necessidade de assegurar um estreito sincronismo entre a libertação de energia e de N no rúmen, para se alcançar uma síntese eficiente de proteína microbiana e a maximização da resposta produtiva de vacas leiteiras. Não quer isto, porém, dizer, que um severo assincronismo não possa ter efeitos detrimentais na síntese de proteína microbiana, particularmente, quando uma rápida libertação de amoníaco imediatamente após a ingestão é acompanhada por um fornecimento insuficiente de energia, derivada de substratos lentamente fermentados. Note-se que, nestas condições, o pH ruminal manter-se-á elevado (<6,8), favorecendo a absorção de quantidades substanciais de amoníaco pelas paredes do rúmen, podendo, a inclusão na dieta, de uma fonte de hidratos de carbono rapidamente fermentáveis, melhorar a eficiência de captura da amónia pelos microrganismos do rúmen. Ou seja, o estreito sincronismo entre a libertação de energia e de N trará pequenos, se alguns, benefícios na maioria das situações práticas de exploração, a não ser que o crescimento microbiano seja limitado pelo fornecimento de

hidratos de carbono fermentáveis e/ou de amoníaco (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995). Sublinhe-se, porém, que nenhuma das aproximações utilizadas para estudar a manipulação da sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen consiste numa estratégia rigorosamente adequada de avaliar unicamente os efeitos do sincronismo, sem qualquer influência de outros factores que possam mascarar os efeitos.

Na opinião de DAWSON (1999), parece que os ruminantes, por um lado, podem detectar o assincronismo na taxa de fornecimento de nutrientes ao rúmen e, por outro, desenvolveram mecanismos para ultrapassar ou minimizar os seus efeitos. Com efeito, estes animais além de alterarem o padrão de ingestão de alimentos para evitar excessiva acumulação, por exemplo, de amoníaco quando alimentados com dietas assíncronas, possuem uma população microbiana capaz de armazenar hidratos de carbono durante períodos de deficiência em N, metabolizando-os, depois, quando existem substratos que permitem a síntese proteica (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995; DAWSON, 1999). Claro que este último processo é menos eficiente quando comparado com o uso imediato de ATP para a síntese proteica, mas, apesar disso, enfatiza a capacidade das bactérias ruminais lidarem, efectivamente, com fornecimentos flutuantes de energia e de N (CHAMBERLAIN e CHOUNG, 1995; FIRKINS, 1996).

Além disso, com dietas assíncronas, os microrganismos do rúmen podem encontrar-se em situações de défice de amoníaco durante grande parte do dia, mas, nestas situações, ocorre uma maior reciclagem de N para o rúmen (SINCLAIR *et al.*, 1993; HOLDER *et al.*, 1995), podendo, mesmo, a quantidade de N que retorna ao rúmen, em animais alimentados com dietas com baixo teor em proteína, exceder a que é perdida através da absorção pelas paredes do rúmen, o que representa uma adaptação dos ruminantes para conservar N em situações de baixa disponibilidade neste nutriente (CAPÍTULO 2). Mas, isto pode não ser inteiramente verdade em situações de elevados níveis de fornecimento de N e de energia porque o N absorvido em excesso pode ser excretado na urina e, assim, a posterior reciclagem para o rúmen não ser suficiente para cobrir as necessidades impostas pela elevada disponibilidade de energia (HENNING *et al.*, 1993).

Nesta matéria, DAWSON (1999) levanta outra questão pertinente: Será que dietas sincronizadas têm algum efeito no sincronismo de fornecimento de nutrientes aos tecidos do animal? Aparentemente, a presença do rúmen, que actua como um reservatório de alimentos, pode sugerir que o fornecimento de nutrientes aos tecidos do animal hospedeiro será menos influenciado pelo padrão de alimentação do que nos animais monogástricos,

mas nos animais ruminantes o fornecimento de nutrientes energéticos e de aminoácidos ao animal hospedeiro são separados espacial e temporalmente, sendo os nutrientes energéticos (AGV) predominantemente absorvidos no rúmen e os aminoácidos no intestino. Assim sendo, a libertação de nutrientes energéticos na circulação do animal hospedeiro será consideravelmente mais influenciada pelo padrão de alimentação do que o fornecimento de aminoácidos, mas o assincronismo na taxa de libertação dos nutrientes no rúmen pode afectar, quer o fornecimento de proteína para o intestino delgado (através da redução da síntese de proteína microbiana), quer a produção de AGV – em termos de quantidade e/ou proporções molares. O fígado pode, contudo, desempenhar um papel importante actuando como tampão entre o sistema digestivo e os tecidos periféricos e, desta forma, reduzir o impacto da variação diurna da ingestão de alimento no metabolismo dos tecidos periféricos, uma vez que, por exemplo, os aminoácidos removidos pelo fígado podem ser utilizados para a síntese de proteína ou ser catabolisados para fornecerem energia ou para sintetizar glucose, ureia, glutamato e outros compostos azotados (DAWSON, 1999).

Concluindo, embora a variação na disponibilidade de nutrientes azotados e energéticos no rúmen possa resultar em desequilíbrios nutricionais passíveis de influenciar a utilização dos nutrientes e o desempenho animal, o ruminante parece ter desenvolvido numerosos mecanismos para minimizar estes efeitos. O sincronismo entre as disponibilidades de energia e de N no rúmen terá, aparentemente, importância significativa em situações práticas em que o crescimento microbiano é limitado por hidratos de carbono fermentáveis ou amoníaco. Isto porque se ambos se encontram sempre presentes em excesso, existirá, provavelmente, pouco benefício no aumento do sincronismo da dieta.

PARTE II

Trabalho Experimental

"(...) queremos destacar um dos avanços mais significativos dos novos sistemas que é a definição de um teor "óptimo" em proteína degradável da dieta em função da energia fermentável – ou potencialmente fermentável – dessa dieta no rúmen (AFRC, 1993). Este princípio reconhece o papel central da população microbiana do rúmen na regulação do processo digestivo, do fluxo de nutrientes e da ingestão voluntária mas não se identifica necessariamente com o conceito de sincronização da fermentação da energia e da degradação da proteína no rúmen." (DIAS DA SILVA, 1999).

CAPÍTULO 4

Efeitos da Suplementação Azotada de Silagens de Milho na Ingestão Voluntária e na Função Lactogénica de Vacas Leiteiras

4.1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção de leite no litoral Norte e Centro de Portugal baseiam-se em larga medida na utilização do milho-forragem. Assim, a cobertura do défice em N degradável da forragem constitui uma primeira prioridade de suplementação, o que normalmente é alcançado pela utilização de concentrados proteicos de cereais, de bagaços de oleaginosas e, por vezes, de ureia. Nestes sistemas, os produtores podem ser conduzidos a fornecer às vacas quantidades elevadas de suplementos proteicos por forma a estimular a ingestão voluntária e a produção de leite. Contudo, esta estratégia, como já foi referido, pode acarretar problemas ambientais e reprodutivos e inflacionar os custos de exploração. Importa, pois, maximizar a utilização da fracção RDP da dieta e a sua conversão em proteína microbiana, uma vez que esta estratégia permite aumentar a utilização dos nutrientes fornecidos ao animal hospedeiro e o fornecimento de aminoácidos essenciais a um custo relativamente mais baixo do que através do aumento da fracção DUP na dieta.

Os factores relacionados com a variação da disponibilidade de nutrientes azotados e energéticos passíveis de influenciar a função ruminal e, consequentemente, o fluxo de proteína microbiana para o duodeno foram apresentados e discutidos no CAPÍTULO 2 da REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. É consensual que o factor que mais influencia a função ruminal

de vacas leiteiras é, sem dúvida, o equilíbrio entre as disponibilidades de RDP e de FME no rúmen. Por isso, testámos as respostas produtivas de vacas leiteiras a este factor em condições próximas dos sistemas de exploração da vaca preta e branca no Entre-Douro e Minho e na Beira Litoral (Experiência 1).

A revisão realizada (CAPÍTULO 3) mostrou, também, que a sincronização dos ciclos diurnos das disponibilidades de RDP e de FME à população microbiana do rúmen constitui factor importante de sincronização dos fornecimentos de N e de energia ao animal ruminante. O princípio básico da sincronização é, como vimos, o da melhoria da eficiência de utilização do N e do ATP para o crescimento microbiano. Mas, como ficou referido, avaliar os efeitos da sincronização em ensaios de produção é difícil, em particular devido aos efeitos perturbadores dos diferentes ingredientes da dieta e à dificuldade em manter os índices de sincronização pretendidos. Todavia, uma abordagem interessante consiste em manipular as disponibilidades de N e de energia no rúmen, administrando a mesma dieta, mas alterando o padrão de fornecimento dos componentes energéticos e proteicos ao longo do dia. No presente trabalho, os efeitos da sincronização na resposta produtiva de vacas leiteiras foram avaliados, quer pela alteração dos ingredientes da dieta (Experiência 2), quer pela alteração do modo de administração dos seus constituintes (Experiência 3).

A relação A/c em amostras de urina foi utilizada, enquanto metodologia não invasiva, para estudar os efeitos de diferentes estratégias de suplementação azotada no fluxo de proteína microbiana para o duodeno. Optámos por este método devido à impossibilidade de recolha da totalidade da urina, mas conscientes que existe evidência experimental das suas limitações, bem como que lhe são reconhecidos alguns méritos, em particular, quando, como no nosso trabalho, se usam delineamentos experimentais que permitem que o mesmo animal receba todos os tratamentos em estudo. Dado o interesse do tema, abordam-se, de seguida, embora de forma sucinta, as metodologias comumente utilizadas para estudar o fluxo de proteína microbiana para o duodeno em ruminantes.

4.2. BREVE REFERÊNCIA A MÉTODOS DE ESTIMATIVA DO FLUXO DE PROTEÍNA MICROBIANA PARA O DUODENO

A quantificação do fluxo de proteína microbiana para o duodeno constitui, desde longos anos, uma prioridade de investigação em nutrição de ruminantes. Com efeito, o conhecimento da contribuição da proteína microbiana para a satisfação das necessidades

em aminoácidos do ruminante e, em particular, da vaca leiteira, é fundamental ao estabelecimento de regimes alimentares que optimizem a produção e a eficiência de utilização do N das dietas.

Os métodos mais utilizados para avaliação da síntese (fluxo) de proteína microbiana no rúmen baseiam-se na utilização de marcadores internos (*e.g.*, ácido diaminopimélico, d-alanina, 2-ácido aminoetilfosfórico, ATP, ácidos nucleicos, DNA, RNA, purinas e pirimidinas individuais e purinas totais) e externos (*e.g.*, ^{15}N, ^{32}P e ^{35}S). Contudo, nenhum marcador tem provado ser completamente satisfatório (BRODERICK e MERCHEN, 1992). Por outro lado, estas aproximações, requerendo animais fistulados no rúmen e no duodeno, podem alterar o normal funcionamento do animal e, por conseguinte, a produção de N microbiano, as necessidades de manutenção (JOHNSON *et al.*, 1998), a ingestão voluntária, a produção de leite (MCRAE e WILSON, 1977) e as taxas de passagem do *digesta*, bem como a qualidade das amostras a nível ruminal e duodenal (MARTIN *et al.*, 1996; PÉREZ *et al.*, 1997; OBISPO e DEHORITY, 1999; DEWHURST *et al.*, 2000a; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 2000). Estes métodos são, apenas, aplicáveis a número muito limitado de animais e de condições de estudo e, necessitando de animais fistulados, vão na direcção oposta às actuais preocupações com o bem-estar animal.

Outros métodos de estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno, como a técnica dos sacos de *nylon* (ARIELI *et al.*, 1989) e o fornecimento de dietas isentas de proteína (ARAMBEL *et al.*, 1987) não podem, também, ser utilizados em condições normais de produção.

Desde que TOPPS e ELLIOTT (1965) propuseram a excreção urinária dos derivados das purinas (DP; hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína) como índice do fluxo de proteína microbiana para o duodeno, vários autores observaram que a excreção urinária de DP está correlacionada com a quantidade de purinas que chega ao duodeno (ANTONIEWICZ *et al.*, 1980; SIBANDA *et al.*, 1982; GIESECKE *et al.*, 1984; FUJIHARA *et al.*, 1987; CHEN *et al.*, 1990a e 1990b; VERBIC *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 1992b; BALCELLS *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1997; VAGNONI *et al.*, 1997; SHEM *et al.*, 1999). Deste modo, assumindo que os ácidos nucleicos da dieta são extensamente degradados no rúmen e que os ácidos nucleicos duodenais são essencialmente de origem microbiana (MCALLAN e SMITH, 1973; MCALLAN, 1982; BALCELLS *et al.*, 1991; CALSAMIGLIA *et al.*, 1996; PÉREZ *et al.*, 1996; DJOUVINOV *et al.*, 1998), o fluxo de proteína microbiana para o duodeno pode ser estimado a partir da excreção urinária do total de DP. Nos bovinos, os DP excretados na urina são

sobretudo constituídos por alantoína e, em menor quantidade, por ácido úrico, sendo negligenciáveis, ou mesmo não detectáveis, as quantidades de xantina e de hipoxantina excretadas (CHEN *et al.*, 1990b; VERBIC *et al.*, 1990; GONDA e LINDBERG, 1994; SUSMEL *et al.*, 1994a; CHEN *et al.*, 1996; DEWHURST *et al.*, 1997; SHINGFIELD e OFFER, 1998a e 1998b).

No entanto, este método não está isento de erros, nomeadamente devido à estreita associação entre a excreção urinária de DP e o fornecimento exógeno de purinas (VERBIC *et al.*, 1990; VAGNONI *et al.*, 1997; BOERO *et al.*, 2001), à variação no teor em purinas dos próprios microrganismos, às purinas da dieta que escapam à degradação no rúmen, à excreção endógena de DP e à partição variável de DP entre as vias de excreção renal, mamária e entérica (BATES e BERGEN, 1984; CRAIG *et al.*, 1987; CECAVA *et al.*, 1990). Além disso, CHEN *et al.* (1990b) demonstraram que as perdas endógenas são inteiramente compensadas pela utilização de purinas de origem exógena quando o nível de excreção urinária de DP se situa acima de um determinado valor (0,6 mmol kg^{-1} $PV^{0,75}$ dia^{-1} para ovinos), existindo, a partir desse nível, uma relação linear entre o fornecimento de purinas exógenas e a excreção de DP.

Por outro lado, a aplicação desta metodologia em condições normais de produção, mormente em animais em pastoreio, é dificultada pela necessidade da recolha total da urina. Para se contornar esta dificuldade, tem sido proposto o recurso à utilização de amostras parciais de urina. Mas, como a quantidade de urina produzida por unidade de tempo é muito variável, dependendo, entre outros factores, da quantidade e do momento de ingestão de água, quando não se recolhe a totalidade de urina será necessário utilizar um marcador de estimativa do volume produzido.

Assim, segundo ERB *et al.* (1977), as relações entre metabolitos na urina e a creatinina urinária, em vez das suas concentrações totais, devem ser utilizadas quando a urina excretada por hora é desconhecida. Com efeito, ANTONIEWICZ *et al.* (1981), ao observarem que a relação A/c é menos afectada, do que a quantidade absoluta de alantoína, por factores que produzem alterações no desaparecimento renal diurno, sugeriram, pela primeira vez, a expressão da concentração urinária de DP como relação molar com a creatinina, para permitir o uso de amostras de urina como alternativa à recolha total.

Contudo, a utilização da creatinina como marcador interno do volume de urina produzido não se tem provado completamente satisfatória. No homem e noutros

monogástricos, a quantidade de creatinina excretada, por unidade de tempo, é praticamente constante para cada indivíduo e depende, sobretudo, da quantidade de músculo no organismo (BORSOOK e DUBNOFF, 1947 citados por DE GROOT e AAFJES, 1960). Todavia, tem sido referido que a excreção urinária de creatinina, em bovinos, é significativamente diferente entre animais (CHETAL *et al.*, 1975; VAGNONI *et al.*, 1997; SHINGFIELD e OFFER, 1998a e 1998b), dias e horas de recolha (SHINGFIELD e OFFER, 1998b), que pode existir interacção hora de recolha x tratamento (SHINGFIELD e OFFER, 1998b), que esta varia com o estádio reprodutivo dos animais (ALBIN e CLANTON, 1966), sendo (GONDA *et al.*, 1996), ou não (ALBIN e CLANTON, 1966; GONDA e LINDBERG, 1994; SUSMEL *et al.*, 1994b; SHINGFIELD e OFFER, 1998a; VALADARES *et al.*, 1999), influenciada por variações no fornecimento de nutrientes. Apesar destas limitações, outros indicadores, como a excreção de creatina e a gravidade específica, provaram ser inadequados como medida da concentração (DE GROOT e AAFJES, 1960).

Alguns autores verificaram que as relações DP/creatinina e A/c em amostras de urina são pouco afectadas pela variação diurna (CHEN *et al.*, 1992a; DANIELS *et al.*, 1994; GONDA e LINDBERG, 1994; CHEN *et al.*, 1995; DEWHURST *et al.*, 1996; NSAHLAI *et al.*, 2000), enquanto outros verificaram que existe variação (PUCHALA e KULASEK, 1992; MOORBY e DEWHURST, 1993; GONDA *et al.*, 1996; SHINGFIELD e OFFER, 1998b) tendo, mesmo, CHEN *et al.* (1997) referido que a excreção de DP em amostras de urina não tem valor, a não ser que o fornecimento exógeno de purinas seja pouco variável ao longo do dia.

Todavia, na utilização desta técnica, permanece, ainda, a questão da frequência de recolha das amostras. Em estudo efectuado por SHINGFIELD e OFFER (1998b), a recolha de várias amostras ao longo de um dia foi mais vantajosa do que a recolha de poucas amostras em vários dias, mas mesmo o regime mais intensivo de recolha de amostras (de duas em duas, durante 24 horas) não permitiu uma previsão aceitável das relações médias diárias DP/creatinina e A/c. Já DEWHURST *et al.* (1996) sugeriram que, a recolha em oito vacas, de duas amostras de urina por dia, em dois dias consecutivos, produz informação útil que permite identificar diferenças no fluxo de proteína microbiana e VALADARES *et al.* (1999) concluíram que a recolha de uma única amostra de urina por vaca e por período forneceu estimativas da excreção urinária de DP, e da produção de proteína microbiana, quase idênticas às obtidas com a recolha da totalidade da urina. Não obstante, dada a influência do sistema de alimentação na relação DP/creatinina ou A/c, é difícil estabelecer um

protocolo de recolha de amostras válido para todas as dietas e sistemas de alimentação (SHINGFIELD e OFFER, 1998b).

Como parte dos DP no sangue é excretada por vias não renais, nomeadamente pelo leite (TIEMEYER *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 1990b; VERBIC *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 1991; GIESECKE *et al.*, 1994; SUSMEL *et al.*, 1995; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1997; GONDA e LINDBERG, 1997; SURRA *et al.*, 1997; VAGNONI *et al.*, 1997; VALADARES *et al.*, 1999), para obviar a recolha total de urina tem sido, também, proposta a utilização da excreção de DP, em particular de alantoína, no leite, para estimativa do fluxo de proteína microbiana. No entanto, esta aproximação tem fornecido resultados contraditórios (KIRCHGESSNER e KAUFFMANN, 1987; GIESECKE *et al.*, 1994; DEWHURST *et al.*, 1996; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 1996; GONDA e LINDBERG, 1997; VAGNONI *et al.*, 1997; SHINGFIELD e OFFER, 1998b) devido, provavelmente: (1) à forte influência da proteína microbiana na síntese do leite e, consequentemente, na excreção de DP ou de alantoína; (2) à possibilidade da produção de leite poder ser aumentada pelo fornecimento de DUP, sem qualquer efeito no fluxo de proteína microbiana, ou sem efeito na ingestão de MS; e (3) à reduzida variação da concentração de DP ou de alantoína no leite (GIESECKE *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1995; GONDA e LINDBERG, 1997; TIMMERMANS *et al.*, 2000; SCHAGER *et al.*, 2003). Desta forma, MARTÍN-ORÚE *et al.* (1996) sugeriram que a excreção de DP no leite melhora potencialmente o rigor das estimativas do fluxo de proteína microbiana baseadas na excreção urinária de DP, embora a metodologia *per se* não constitua uma alternativa válida.

Do que ficou dito se conclui não existir consenso quanto ao real valor da utilização das relações DP/creatinina ou A/c em amostras de urina para identificar diferenças, entre dietas, no fluxo de proteína microbiana para o duodeno, sendo, porém, consensual, que a determinação da excreção total diária dos DP na urina é um método não invasivo passível de ser utilizado com este fim. A bibliografia consultada evidencia, ainda, que a determinação da excreção de DP ou de alantoína no leite tem pouco valor como método de estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

As experiências com vacas leiteiras em produção aqui descritas foram realizadas na Divisão de Leite e Lacticínios – Estação Experimental (Paços de Ferreira) da Direcção

Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho, Ministério da Agricultura. Esta unidade de produção de leite possuía, no ano de 2000, cerca de 50 vacas em lactação, com uma média de produção de leite, aos 305 dias, de aproximadamente 9000 kg (ANABLE, 2000). O estudo de incubação foi realizado nas instalações, da Universidade do Porto, no Campus Agrário de Vairão.

4.3.1. Experiência 1

Nesta experiência foram utilizadas nove vacas *Holstein*, seis multíparas (número de lactação 2,3 ± 0,82) e três primíparas, com um peso vivo inicial de 564 ± 55,8 kg. As vacas encontravam-se, inicialmente, nos 149 ± 13,0 dias de lactação e a produzir 29 ± 4,6 kg leite dia^{-1}. Os animais foram agrupados de acordo com o número de lactação, os dias em lactação e a produção inicial de leite, em três grupos de três vacas cada. As vacas foram distribuídas aleatoriamente, pelos diferentes tratamentos, segundo três quadrados latinos 3x3. A constituição dos quadrados encontra-se no ANEXO I (QUADRO 1.1.A). Cada período experimental teve uma duração de quatro semanas, sendo a recolha de dados efectuada nos últimos sete dias. Os animais foram alojados em cubículos individuais em pavilhão bem ventilado, com acesso contínuo a água e a minerais (blocos).

As dietas continham (na MS) *ca* 40% de silagem de milho, 5% de feno de azevém grosseiramente cortado (5-10 cm) e 55% de alimento concentrado. A silagem de milho foi ensilada sem aditivos, em silo trincheira, nos finais de Setembro de 1999. Antes da formulação das dietas foram recolhidas amostras representativas da silagem e do feno. No ANEXO I (QUADRO 1.2.A) apresentam-se as composições químicas respectivas. Os três tratamentos foram formulados, de acordo com o AFRC (1993), para um nível de produção diária de leite de 32 kg, com os objectivos de serem isoenergéticos, de satisfazerem as necessidades dos animais em MP e terem diferentes relações g ERDP MJ^{-1} FME, de modo a proporcionarem uma grande deficiência (RL), uma ligeira deficiência (RM) e um ligeiro excesso (RH) de ERDP em relação ao nível objectivo (11 g ERDP MJ^{-1} FME) sugerido pelo sistema britânico (AFRC, 1993) para vacas em lactação. As diferentes relações ERDP/FME foram obtidas pelo diferente desenho do alimento concentrado (QUADRO 4.1).

As dietas foram fornecidas *ad libitum*, como alimento completo, utilizando-se para o efeito uma misturadora, tendo sido repartidas equitativamente em duas refeições diárias (08.30 e 15.00 h). Para o controlo individual da ingestão, os ingredientes da dieta foram

diariamente pesados antes de cada refeição, tendo os refugos sido diariamente recolhidos e pesados antes da refeição da manhã. Durante o período de habituação dos animais à dieta foram recolhidas, em dois dias não consecutivos de cada semana, amostras representativas dos alimentos individuais e dos refugos, para determinação do teor em MS e subsequente ajuste da quantidade de alimento a fornecer diariamente a cada animal. O ajuste da dieta foi realizado de acordo com a ingestão da semana anterior e por forma a permitir um nível de refugo, na MS, de 5 a 10% e a manutenção (na MS) da relação forragem/concentrado. Na última semana de cada período experimental foram recolhidas, diariamente, amostras representativas dos alimentos individuais e dos refugos que, após determinação do teor em MS, foram acumuladas para posterior análise da composição química.

As vacas foram ordenhadas, duas vezes ao dia, às 08.00 h e às 17.30 h. A produção de leite de cada vaca foi medida diariamente, com dispositivo automático, ao longo de todo o período experimental. Em dois dias consecutivos da última semana de cada período experimental foram recolhidas amostras representativas de leite de cada vaca e em cada ordenha. As amostras, com conservante (dicromato de potássio), foram acumuladas por vaca e por dia, para determinação, em fresco, dos teores em proteína, em gordura e em lactose. Nestes dias, foram também recolhidas amostras de fezes e de urina, de cada vaca, com oito horas de intervalo, durante 48 horas (às 08.00, 16.00 e 24.00 h). As amostras de urina foram recolhidas usando uma combinação de comportamento, catéter e estimulação vulvar. Os animais foram deixados sozinhos por um período tão longo quanto possível antes da recolha, pelo que tiveram tempo para se deitarem e descansarem. As vacas quando forçadas a se levantar para a recolha tinham, normalmente, como primeiras acções urinar e defecar, tornando mais fácil a recolha de uma amostra limpa de urina e de uma amostra fresca de fezes. Às vacas que não urinaram espontaneamente durante o período de recolha era, primeiro, realizada a estimulação vulvar e, em última estância, a recolha foi realizada utilizando um catéter. As amostras de fezes foram recolhidas directamente do recto, sempre que os animais não defecaram espontaneamente durante o período de recolha. As amostras de urina e de fezes foram imediatamente armazenadas a -15 °C até posterior análise.

Nos mesmos dias de recolha das amostras de leite, de urina e de fezes, recolheram-se, ainda, amostras de sangue de cada vaca, na veia jugular, em tubos de heparina, três horas após a refeição da manhã. Após a colheita, as amostras foram de imediato centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos para separação do plasma, que foi

armazenado a -15 ºC até posterior doseamento das concentrações de glucose, de ureia, de albumina e de proteínas totais.

Os animais foram pesados à mesma hora (*ca* 11.00 h) no início da experiência e no último dia da última semana de cada período experimental. As temperaturas máxima e mínima no interior do estábulo foram registadas diariamente.

4.3.2. Experiência 2

Neste estudo foram utilizadas seis vacas multíparas (número de lactação 4,0 ± 0,89) e três vacas primíparas *Holstein* com um peso vivo inicial de 550 ± 49,7 kg. As vacas estavam, inicialmente, nos 63 ± 31,3 dias de lactação e a produzir 34 ± 5,0 kg leite dia^{-1}. Esta experiência foi, também, delineada segundo três quadrados latinos 3x3, tendo cada período experimental a duração de quatro semanas e sendo a recolha de dados realizada nos últimos sete dias.

Para uma produção diária de leite de 38 kg, foram formuladas três dietas, à base de silagem de milho, isoenergéticas, de igual relação g ERDP MJ^{-1} FME, mas com diferente relação entre os fornecimentos de QDP e de SDP ao rúmen. A relação QDP/SDP foi manipulada utilizando, nos alimentos concentrados, ureia, como fonte de QDP, em detrimento de bagaço de soja (0, 5 e 10 g ureia kg^{-1} alimento para os tratamentos U0, U5 e U10, respectivamente; QUADRO 4.1.). A silagem de milho foi ensilada sem aditivos, em silo trincheira, nos finais de Setembro de 2000. Antes da formulação das dietas foram recolhidas amostras representativas da silagem de milho e do feno de azevém, cuja composição química é apresentada no ANEXO I (QUADRO 1.2.A). A distribuição das vacas pelos tratamentos (QUADRO 1.1.A; ANEXO I) e o maneio foram tal como na Experiência 1. As dietas eram constituídas (na MS) por 35% de silagem de milho, 5% de feno de azevém grosseiramente cortado (5-10 cm) e 60% de alimento concentrado, tendo sido distribuídas como alimento completo e repartidas equitativamente em duas refeições diárias, às 08.00 e às 15.30 h. As vacas foram ordenhadas, duas vezes ao dia, às 07.00 h e às 16.30 h. Em dois dias consecutivos da última semana de cada período experimental foram recolhidas amostras de urina e de fezes de cada vaca às 06.00, 14.00 e 22.00 h. As amostras de sangue de cada vaca foram recolhidas quatro horas após a refeição da manhã.

QUADRO 4.1 – Composição ponderal dos alimentos concentrados experimentais (g kg^{-1})[1].

Matéria prima	RL[2]	RM[2]	RH[2]	U0[3]	U5[3]	U10[3]	CEn[4]	CPr[4]
Trigo grão	200	170	230	230	210	210	350	-
Corn gluten feed	141	318	55	380	450	470	400	-
Glúten de milho	70	-	-	-	-	-	-	-
Polpa de citrinos	330	55	44	40	45	60	135	-
Bagaço de colza	40	180	250	-	-	-	-	-
Bagaço de soja, 44% PB	75	50	125	250	190	150	-	380
Bagaço de girassol	75	130	190	-	-	-	-	570
Melaço de cana	30	30	30	30	30	30	30	30
Gordura hidrogenada[5]	6	30	40	30	30	30	30	-
Ureia	-	-	-	-	5	10	-	20
Carbonato de cálcio	-	15	14	15	15	15	17	-
Fosfato bicálcico	11	-	-	3	3	3	8	-
Sal	5	5	5	5	5	5	7	-
Bicarbonato de sódio	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	12	-
Óxido de magnésio	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	8	-
Suplemento mineral e vitamínico[6]	2	2	2	2	2	2	3	-

[1]Os alimentos concentrados foram, para cada experiência, produzidos de uma só vez, na fábrica de alimentos compostos SODOL, Sociedade Descascadora Ovarense, Lda., Ovar, Portugal.
[2]Alimentos concentrados denominados de acordo com a relação g ERDP MJ^{-1} FME da dieta em que foram incluídos: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, uma ligeira deficiência e um ligeiro excesso.
[3]Alimentos concentrados denominados de acordo com o seu teor em ureia, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para os alimentos U0, U5 e U10.
[4]Alimentos concentrados denominados de acordo com o tipo maioritário de nutrientes que veiculam, respectivamente, energético e proteico para CEn e CPr.
[5]Ácidos gordos de palma hidrogenados (Vetagrialimentar SA, Cantanhede, Portugal).
[6]Composição, de acordo com o fabricante: 7500000 IU kg^{-1} de vitamina A, 1250000 IU kg^{-1} de vitamina D_3, 20000 mg kg^{-1} de vitamina E, 200 mg kg^{-1} de Co, 1000 mg kg^{-1} de Cu, 25000 mg kg^{-1} de Fe, 385 mg kg^{-1} de I, 50000 mg kg^{-1} de Mg, 30000 mg kg^{-1} de Mn, 65 mg kg^{-1} de Se e 20000 mg kg^{-1} de Zn.

4.3.3. Experiência 3

Esta experiência foi realizada em simultâneo com a Experiência 2, pelo que as forragens utilizadas foram as mesmas. Foi, também, delineada de acordo com três quadrados latinos 3x3 com períodos de quatro semanas. Foram utilizadas seis vacas primíparas e três vacas multíparas *Holstein* (número de lactação 3,3 ± 0,58) com um peso vivo inicial de 542 ± 37,4 kg. As vacas encontravam-se, inicialmente, nos 127 ± 31,0 dias de lactação e a produzir 29 ± 5,9 kg leite dia^{-1}.

Com vista a evitar efeitos perturbadores dos ingredientes da dieta no estudo da sincronização da disponibilidade de nutrientes no rúmen, todos os tratamentos se basearam

numa única dieta, formulada para uma produção diária de leite de 32 kg, constituída (na MS) por 45% de silagem de milho, 5% de feno de azevém grosseiramente cortado (5-10 cm), 35% de alimento concentrado energético (CEn) e 15% de alimento concentrado proteico (CPr; QUADRO 4.1). A dieta base (silagem de milho+feno de azevém+CEn) foi fornecida tal como na Experiência 2. A sincronização das disponibilidades de ERDP e de FME no rúmen foi manipulada pela alteração do modo de administração do suplemento proteico, tendo este sido distribuído uma vez ao dia, antes da distribuição da dieta de base na refeição da manhã (D1), duas vezes ao dia, em duas refeições iguais antes da distribuição da dieta de base (D2) ou, como alimento completo, juntamente com a dieta de base (DU). A distribuição das vacas pelos tratamentos (QUADRO 1.1.A; ANEXO I) e o maneio foram tal como descrito para a Experiência 2. Nesta experiência, as amostras de sangue foram recolhidas imediatamente antes e quatro horas após a refeição da manhã.

4.3.4. Degradabilidade *in sacco* dos alimentos experimentais

Duas vacas *Holstein* (peso vivo 480 e 575 kg) não lactantes e não gestantes, fistuladas no rúmen (cânula com 10 cm de diâmetro; BAR DIAMOND INC., Parma, Idaho, USA) foram utilizadas para medir a degradabilidade dos alimentos no rúmen. As vacas foram alimentadas a 1,2x o nível da conservação (AFRC, 1993) com uma dieta constituída por (na MS) 45% de silagem de milho, 5% de feno de azevém e 50% de alimento concentrado comercial (QUADRO 4.2). As vacas foram alojadas em cubículos individuais, em pavilhão bem ventilado, e tiveram acesso contínuo a água e a blocos de minerais. A dieta foi oferecida, como alimento completo, repartida equitativamente em duas refeições (09.30 e 17.30 h), tendo sido ingerida na totalidade.

Após 15 dias de adaptação dos animais à dieta, a técnica dos sacos de *nylon*

QUADRO 4.2 – Composição química (g kg^{-1} MS) dos alimentos utilizados no estudo de incubação.

Alimento	MS[1]	pH	Cinza	PB	GB	NDF[2]	Amido	Ureia
Silagem de milho	279,3	3,6	37,7	85,2	24,9	532,9	239,4	ND
Feno de azevém	837,0	ND	84,3	76,5	11,1	575,0	ND	ND
Concentrado comercial[3]	932,8	ND	90,3	235,8	33,5	246,2	215,2	8,6

[1] g kg^{-1}.
[2] NDF (isento de cinza). Determinado sem sulfito de sódio. α-amilase não foi utilizada no feno de azevém.
[3] 15000 UI kg^{-1} de vitamina A, 2500 UI kg^{-1} de vitamina D_3 e 40 mg kg^{-1} de vitamina E (de acordo com o declarado pelo fabricante).
ND = não determinado.

(ØRSKOV *et al.*, 1980) foi utilizada para medir a degradabilidade da MS e do N dos alimentos no rúmen. Sacos de *nylon* (10 x 20 cm; BAR DIAMOND INC., Parma, Idaho, USA) contendo *ca* 4 g de amostra de forragem moída com crivo de 4 mm ou de amostra de concentrados tal qual, foram incubados no rúmen de cada vaca, durante 12 horas em dois dias não consecutivos, tendo sido introduzidos imediatamente antes da refeição da manhã. No total, foram incubados oito sacos de *nylon* para cada amostra de alimento (2 vacas x 2 dias x 2 sacos). Imediatamente após a sua remoção do rúmen, os sacos foram lavados em água corrente e congelados a –15 °C. No final das incubações, os sacos foram descongelados e lavados juntamente com os sacos das 0 horas (não incubados no rúmen) em máquina de lavar roupa, durante 40 minutos a 40 °C, sendo de seguida secos em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C durante 24 horas. Os resíduos permitiram o cálculo da degradabilidade da MS. Para o cálculo da degradabilidade do N foi doseado o teor em N nas amostras de alimentos e de resíduos acumulados por vaca e por alimento (AOAC, 1990). Entre as duas séries de incubação procedeu-se à recolha de fluído ruminal (*ca* 50 ml), para determinação do pH, imediatamente antes da refeição da manhã (0 h) e 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas após.

4.3.5. Análises químicas

O pH das amostras de silagem de milho foi determinado, em fresco, com um eléctrodo de contacto (INGOLD, Nº 209811250). As amostras dos alimentos, refugos e fezes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C, durante 48 horas, para determinação da MS.

Para as determinações analíticas a seguir referidas, as amostras dos alimentos, dos refugos e das fezes foram moídas com crivo de 1 mm. Os teores em cinza e em N KJELDAHL foram determinados de acordo com as recomendações da AOAC (1990). O teor em PB foi calculado como sendo N KJELDAHL x 6,25 (AOAC, 1990). As fracções NDF, fibra de detergente ácido (ADF) e lenhina de detergente ácido (ADL) foram determinadas conforme descrevem ROBERTSON e VAN SOEST (1981). A gordura bruta (GB) foi doseada por extracção com éter de petróleo utilizando um sistema GERHARDT SOXTEC 2000 AUTOMATIC (AOAC, 1990). Os açúcares totais, o fósforo (P), o cálcio (Ca) e o teor em ureia dos alimentos concentrados foram doseados segundo as NORMAS PORTUGUESAS (NP – 1785, 1986; NP – 873, 1997; NP – 1786, 1985; e NP – 3255, 1986, respectivamente). O

teor em fibra de detergente ácido modificada (MADF) das silagens de milho e dos fenos de azevém foi determinado segundo o método descrito pelo MAFF (1986). O teor em EM das silagens de milho e dos fenos de azevém foi estimado a partir do teor em MADF, respectivamente, de acordo com GIVENS (1990) e MOSS e GIVENS (1990). O teor em EM dos alimentos concentrados foi estimado de acordo com a equação E3 de THOMAS *et al.* (1988). As cinzas insolúveis no ácido clorídrico foram determinadas como descreve a NORMA PORTUGUESA (NP – 2971, 1985). O amido foi doseado nas amostras moídas a 0,5 mm pelo método enzimático descrito por SOLOMONSSON *et al.* (1984).

As concentrações urinárias de alantoína e de creatinina foram determinadas em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) como descrito por DEWHURST *et al.* (1996). Os teores em proteína, em gordura e em lactose das amostras de leite frescas foram determinados em MILKOSCAN 133 (AOAC, 1990; FOSS ELECTRIC, Hillerϕd, Dinamarca). As concentrações plasmáticas de proteínas totais, albumina, glucose e ureia foram determinadas automaticamente (AUTOMATED CHEMISTRY ANALYZER, OLYMPUS, AU640, Melville, New York), respectivamente, pelos métodos colorimétricos do biureto e do verde de bromocresol e pelos métodos enzimáticos da glucose-oxidase e da urease, descritos por BAUER (1982).

4.3.6. Análise estatística

Na Experiência 1, uma vaca apresentou uma deslocação do abomaso e foi excluída da análise. Na Experiência 2, uma vaca apresentou diarreia durante o primeiro período experimental e outra fracturou uma rótula na última semana do terceiro período experimental, pelo que os dados referentes a estas vacas durante os períodos referidos não foram utilizados na análise. Já na Experiência 3, devido a uma mamite crónica, uma vaca foi excluída da análise e os dados referentes a duas vacas com mamite, respectivamente, no primeiro e no terceiro períodos, e a uma outra vaca que ingeriu alimento não correspondente ao ensaio durante o terceiro período foram, também, excluídos da análise.

Os dados foram sujeitos a análise de variância para um delineamento em três quadrados latinos 3x3 (STEEL e TORRIE, 1980) utilizando o procedimento *General Linear Model* do programa SAS (SAS System for Windows, version 8e, 1999-2001, SAS INSTITUTE INC., Cary, NC, USA) segundo o modelo linear:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + V_j(Q_i) + P_k(Q_i) + T_l + E_{ijkl},$$

onde,

Y = variável dependente

μ = média global

Q_i = efeito médio do quadrado i

$V_j(Q_i)$ = efeito médio da vaca j dentro do quadrado i

$P_k(Q_i)$ = efeito médio do período k dentro do quadrado i

T_l = efeito médio do tratamento l

E_{ijkl} = erro residual não explicado, com distribuição assumida normal e independente.

Para a análise das concentrações urinárias de alantoína e de creatinina de todas as experiências e dos metabolitos plasmáticos da Experiência 3, o modelo incluiu, também, a hora de recolha e a interacção tratamento x hora de recolha. Para os parâmetros urinários, esta interacção nunca foi significativa (P>0,05), pelo que foi removida do modelo. Quando ocorreram diferenças significativas, o teste da diferença mínima significativa (STEEL e TORRIE, 1980) foi utilizado para comparar as médias.

4.4. RESULTADOS

As temperaturas médias mínima e máxima observadas no estábulo foram, respectivamente, de 14,1±2,38 e 27,1±5,41 °C durante o período em que decorreu a Experiência 1 (Julho, Agosto, Setembro e Outubro de 2000) e 9,3±1,88 e 13,7±2,10 °C durante o período em que decorreram as experiências 2 e 3 (Novembro e Dezembro de 2000 e Janeiro e Fevereiro de 2001).

4.4.1. Alimentos experimentais

A composição química, o teor em EM e a degradabilidade *in sacco* da MS e do N, às 0 e às 12 horas, dos alimentos utilizados neste estudo encontram-se no QUADRO 4.3. A silagem de milho usada nas experiências 2 e 3 apresentou um teor em NDF inferior (426,7 *versus* 464,6 g kg^{-1} MS) e um teor em amido superior (338,0 *versus* 282,9 g kg^{-1} MS) à utilizada na Experiência 1. Os valores da degradabilidade da MS e do N desta silagem foram, também, superiores aos da silagem utilizada na Experiência 1.

QUADRO 4.3 – Composição química (g kg^{-1} MS), teor em energia metabolizável (EM; MJ kg^{-1} MS) e degradabilidade *in sacco* da MS (deg MS; %) e do N (Deg N; %) às 0 e às 12 horas dos alimentos utilizados nas experiências 1, 2 e 3.

	MS[1]	Cinza	PB	GB	NDF[2]	ADF	ADL	AT[3]	Amido	Ureia	P	Ca	EM	Deg MS		DegN	
														0h	12h	0h	12h
SM[4]	326,7	43,2	71,7	34,1	464,6	265,1	38,7	7,7	282,9	ND	2,0	2,1	10,4	46,7	49,8	55,6	56,6
FA[5]	885,5	46,8	65,1	12,1	700,3	393,1	73,8	83,6	ND	ND	1,4	3,2	7,7	16,0	28,0	20,8	28,1
RL[6]	890,6	85,7	195,2	34,4	247,1	110,0	42,3	136,4	160,0	ND	6,7	14,1	12,6	54,6	73,9	43,9	58,4
RM[6]	898,8	99,8	222,8	43,1	298,8	127,8	47,8	87,8	154,4	ND	7,4	14,5	12,1	55,8	72,3	57,8	78,8
RH[6]	898,4	96,5	252,8	43,8	261,3	138,7	51,8	93,7	142,5	ND	7,2	14,8	12,1	57,7	72,0	57,4	78,2
SM[4]	325,6	36,4	74,2	31,5	426,7	231,8	33,7	8,8	338,0	ND	2,5	2,1	10,7	48,2	53,9	55,0	60,5
FA[5]	837,0	60,1	59,6	13,8	663,5	407,7	63,1	137,7	ND	ND	1,8	3,9	8,4	24,2	37,0	25,0	21,8
U0[7]	905,3	93,9	230,3	44,5	214,8	88,1	25,1	74,2	242,7	ND	7,4	11,8	12,9	60,7	77,4	57,8	75,8
U5[7]	907,4	97,5	227,9	46,1	234,9	83,6	22,5	74,5	231,4	5,4	7,9	12,8	12,7	61,2	78,3	61,5	75,1
U10[7]	909,1	99,2	241,5	45,3	233,3	89,0	27,8	67,4	242,7	10,3	7,6	12,4	12,7	62,6	79,3	65,0	82,6
CEn[8]	907,5	99,9	151,0	48,5	224,7	91,2	23,9	83,1	262,4	ND	7,1	15,9	12,7	66,8	80,5	69,4	81,2
CPr[8]	906,2	77,3	377,4	104,1	299,6	203,5	59,4	94,5	42,5	20,4	8,1	6,2	11,4	53,3	71,3	63,2	81,6

[1] g kg^{-1}.
[2] NDF (isento de cinza). Determinado sem sulfito de sódio. α-amilase não foi utilizada nos fenos de azevém.
[3] Açúcares totais.
[4] Silagem de milho.
[5] Feno de azevém.
[6] Alimentos concentrados denominados de acordo com a relação g ERDP MJ^{-1} FME da dieta em que foram incluídos: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, uma ligeira deficiência e um ligeiro excesso.
[7] Alimentos concentrados denominados de acordo com o seu teor em ureia, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.
[8] Alimentos concentrados denominados de acordo com o principal tipo de nutrientes que veiculam, respectivamente, energéticos e proteicos para CEn e CPr.
ND = não determinado.

Como seria de esperar, os constituintes da parede celular representaram a fracção quantitativamente mais importante dos fenos de azevém. Os alimentos concentrados utilizados como suplemento da dieta base na Experiência 1 dosearam os teores em PB pretendidos, acompanhando o aumento da relação ERDP/FME da dieta. O teor mais elevado em açúcares totais do alimento concentrado RL traduz a maior inclusão de polpa de citrinos. Os alimentos concentrados U0, U5 e U10, utilizados na Experiência 2, apresentaram teores em PB, respectivamente, de 230,3, de 227,9 e de 241,5 g kg^{-1} MS e dosearam o nível de ureia pretendido (0, 5,4 e 10,3 g kg^{-1} MS, respectivamente, para os alimentos U0, U5 e U10). O CEn e o CPr, utilizados na Experiência 3, dosearam, respectivamente, 151,0 e 377,4 g kg^{-1} MS de PB e 262,4 e 42,5 g kg^{-1} MS de amido. O teor em ureia do CPr foi de 20,4 g kg^{-1} MS.

A degradabilidade do N, às 12 horas, do alimento concentrado RL foi inferior à dos alimentos concentrados RM e RH. A degradabilidade do N, às 12 horas, do concentrado U10 foi superior à dos concentrados U0 e U5, que foram muito semelhantes. Os alimentos concentrados da Experiência 3 apresentaram valores de degradabilidade da MS e do N, às 12 horas, respectivamente, de 80,5% e de 81,2% para o CEn e de 71,3% e de 81,6% para o CPr. O pH do fluído ruminal recolhido nas duas vacas fistuladas, utilizadas no estudo de incubação, diminuiu, como seria de esperar, após as refeições, tendo atingido o valor mínimo de 5,8, quatro horas após a refeição da manhã (FIGURA 4.1).

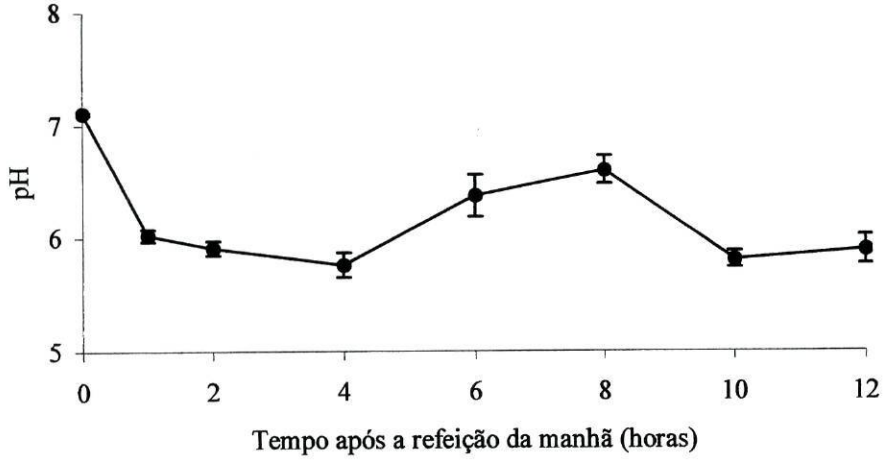


FIGURA 4.1 – Variação diária do pH do fluído ruminal recolhido nas duas vacas fistuladas utilizadas no estudo de incubação (valores indicados são médias ± erros padrão).

4.4.2. Dietas

No QUADRO 4.4 apresentam-se os teores calculados em EM, FME, ERDP e UDP e a relação ERDP/FME das dietas utilizadas nas experiências 1, 2 e 3. As relações ERDP/FME, calculadas de acordo com o AFRC (1993) e baseadas nos valores de degradabilidade *in sacco* do N dos alimentos, foram, para a Experiência 1, de 6,7, 10,1 e 11,2 g ERDP MJ^{-1} FME, respectivamente, para as dietas RL, RM e RH; e para a Experiência 2 de 10,0, 10,1 e 11,1 g ERDP MJ^{-1} FME, respectivamente, para as dietas U0, U5 e U10. A relação ERDP/FME na Experiência 3 foi de 9,3 g MJ^{-1}.

A composição química média das dietas experimentais ingeridas, após correcção para os refugos, foi muito próxima dos objectivos fixados inicialmente, como se constata pela análise do QUADRO 4.5. A composição química média dos refugos encontra-se no ANEXO I. O teor em PB das dietas da Experiência 1 aumentou com o aumento da relação ERDP/FME. A composição química das dietas utilizadas na Experiência 2 foi muito semelhante. Estas dietas e, também, as utilizadas na Experiência 3 apresentaram um teor

QUADRO 4.4 – Teores calculados em energia metabolizável (EM; MJ kg^{-1} MS), em energia metabolizável potencialmente fermentável (FME; MJ kg^{-1} MS), em proteína efectivamente degradável no rúmen (ERDP; g kg^{-1} MS) e em proteína não degradável no rúmen (UDP; g kg^{-1} MS) e relação ERDP/FME (g MJ^{-1}) das dietas utilizadas nas experiências 1, 2 e 3.

	EM	FME[1]	ERDP[2]	UDP[3]	ERDP/FME
Experiência 1					
RL[4]	11,4	9,9	66,3	59,2	6,7
RM[4]	11,2	9,4	95,1	40,9	10,1
RH[4]	11,2	9,4	105,3	45,2	11,2
Experiência 2					
U0[5]	11,9	10,1	101,2	45,4	10,0
U5[5]	11,8	10,0	101,3	43,2	10,1
U10[5]	11,7	10,0	111,3	39,5	11,1
Experiência 3	11,3	9,6	88,9	35,7	9,3

[1]Calculada de acordo com o AFRC (1993).
[2]De acordo com o AFRC (1993), assumindo que a proteína rapidamente degradável no rúmen (QDP) igualou a degradabilidade da proteína bruta (PB) às 0 horas x teor em PB e a proteína lentamente degradável no rúmen (SDP) igualou (degradabilidade da PB às 12 horas – degradabilidade da PB às 0 horas) x teor em PB; calculada como 0,8 x QDP + SDP.
[3]Calculada como PB – (QDP + SDP).
[4]Tratamentos denominados de acordo com a relação ERDP/FME: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso.
[5]Tratamentos denominados de acordo com o teor em ureia dos alimentos concentrados, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.

QUADRO 4.5 – Composição química média das dietas ingeridas, após correcção para os refugos, (g kg^{-1} MS), das experiências 1, 2 e 3 (Desvio padrão entre parêntesis).

	n	Cinza	PB	NDF[1]	ADF	ADL	Amido
Experiência 1							
RL[2]	8	66,2 (2,04)	140,4 (4,64)	347,0 (15,47)	180,9 (4,79)	43,1 (2,60)	208,1 (19,03)
RM[2]	8	74,6 (1,53)	157,0 (3,68)	379,5 (7,09)	191,3 (4,44)	45,5 (1,34)	199,8 (15,84)
RH[2]	8	72,3 (1,65)	174,5 (1,23)	355,3 (11,30)	195,5 (3,17)	48,2 (2,31)	196,2 (17,17)
Experiência 2							
U0[3]	9	71,8 (0,44)	167,6 (4,38)	309,9 (2,36)	152,7 (9,85)	29,7 (6,40)	266,6 (2,52)
U5[3]	9	74,5 (1,22)	167,3 (3,32)	319,9 (5,03)	148,3 (6,21)	28,0 (2,98)	263,1 (5,57)
U10[3]	7	75,2 (1,70)	175,5 (6,37)	318,7 (5,61)	151,6 (5,17)	31,3 (2,93)	266,9 (4,05)
Experiência 3							
DU[4]	7	65,0 (1,59)	145,3 (3,80)	341,5 (9,61)	181,5 (8,19)	34,1 (2,25)	258,5 (3,33)
D2[4]	7	64,9 (1,52)	143,6 (3,39)	344,4 (7,86)	183,4 (7,54)	34,8 (1,57)	257,5 (4,73)
D1[4]	7	71,9 (15,6)	144,5 (4,74)	342,4 (10,4)	180,4 (10,86)	34,2 (1,88)	261,1 (4,94)

[1]NDF (isento de cinza). Determinado sem sulfito de sódio. α-amilase não foi utilizada nos fenos de azevém.
[2]Tratamentos denominados de acordo com a relação ERDP/FME: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso.
[3]Tratamentos denominados de acordo com o teor em ureia dos alimentos concentrados, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.
[4]Tratamentos denominados de acordo com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.

em amido superior às utilizadas na Experiência 1.

A digestibilidade da MS, da MO e da fracção NDF das dietas utilizadas nas experiências 1, 2 e 3 foi estimada utilizando como indicador interno as cinzas insolúveis no ácido clorídrico e foi calculada após correcção para o teor em cinzas insolúveis no ácido clorídrico dos refugos. Os valores encontram-se no QUADRO 4.6. A diferente estratégia de suplementação azotada não afectou significativamente (P>0,05), em nenhuma das experiências, a digestibilidade da MS, da MO e da fracção NDF.

4.4.3. Ingestão voluntária, produção e composição do leite

O QUADRO 4.7 apresenta os valores médios relativos à ingestão de MS, à produção e composição do leite e ao peso vivo dos animais nas experiências 1, 2 e 3. Os respectivos quadros de análise de variância encontram-se no ANEXO I. A dieta RL promoveu significativamente (P<0,05) menores ingestão de MS e produção de leite do que as dietas RM e RH. A diferente relação ERDP/FME das dietas não afectou significativamente

QUADRO 4.6 – Digestibilidade da matéria seca (DMS; kg kg^{-1}), da matéria orgânica (DMO; kg kg^{-1}) e da fracção fibra de detergente neutro (DNDF; kg kg^{-1}) das dietas das experiências 1, 2 e 3.

	n	DMS	DMO	DNDF
Experiência 1				
RL[1]	8	0,791	0,805	0,651
RM[1]	8	0,780	0,793	0,737
RH[1]	8	0,721	0,737	0,525
EPM‡		0,0221	0,0212	0,0408
P		NS	NS	†
Experiência 2				
U0[2]	9	0,785	0,797	0,591
U5[2]	9	0,762	0,775	0,565
U10[2]	7	0,779	0,791	0,591
EPM		0,0180	0,0172	0,0335
P		NS	NS	NS
Experiência 3				
DU[3]	7	0,777	0,786	0,600
D2[3]	7	0,782	0,821	0,661
D1[3]	7	0,741	0,788	0,598
EPM		0,0177	0,0160	0,0263
P		NS	NS	NS

[1]Tratamentos denominados de acordo com a relação ERDP/FME: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso.
[2]Tratamentos denominados de acordo com o teor em ureia dos alimentos concentrados, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.
[3]Tratamentos denominados de acordo com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.
‡Erro padrão da média.
†$P<0,10$.

($P>0,05$) a produção de leite corrigida para 4% de gordura, a composição do leite, a eficiência bruta da produção de leite e o peso vivo. A eficiência de utilização da PB da dieta, medida como a relação entre a produção de proteína do leite e a ingestão de PB foi significativamente superior ($P<0,01$) com a dieta RL, não se tendo detectado diferenças significativas entre as dietas RM e RH. As vacas primíparas, como seria de esperar, ingeriram menor quantidade de alimento (primíparas, 19,0 kg MS dia^{-1}; multíparas, 21,2 kg MS dia^{-1}; $P<0,001$) e produziram, em média, menor quantidade de leite (primíparas, 26,7 kg dia^{-1}; multíparas, 30,1 kg dia^{-1}; $P<0,001$) do que as vacas multíparas.

O aumento da relação QDP/SDP da dieta não teve efeito significativo ($P<0,05$) em

QUADRO 4.7 – Ingestão de matéria seca (IMS), produção e composição do leite e peso vivo das experiências 1, 2 e 3.

	Experiência 1			EPM‡	P	*Experiência 2*			EPM	P	*Experiência 3*			EPM	P
	RL[1]	RM[1]	RH[1]			U0[2]	U5[2]	U10[2]			DU[3]	D2[3]	D1[3]		
n	8	8	8			9	9	7			7	7	7		
IMS, kg dia^{-1}	19,3^{a}	21,3^{b}	20,7^{b}	0,28	**	23,7	24,3	24,1	0,27	NS	20,3	20,7	20,2	0,23	NS
Leite, kg dia^{-1}	27,6^{a}	30,1^{b}	29,2^{b}	0,46	*	37,3	36,9	36,3	0,71	NS	29,2^{a}	29,3^{a}	27,9^{b}	0,31	*
FCM[4], kg dia^{-1}	26,4	27,5	28,6	0,65	NS	34,6	35,4	35,0	0,97	NS	27,1	27,5	25,6	0,53	NS
Gordura, %	3,72	3,46	3,88	0,140	NS	3,49	3,72	3,73	0,135	NS	3,43	3,58	3,43	0,123	NS
Proteína, %	3,34	3,27	3,34	0,043	NS	3,21	3,24	3,23	0,019	NS	3,51	3,43	3,45	0,052	NS
Lactose, %	5,16	5,05	5,05	0,038	NS	5,20	5,22	5,17	0,026	NS	5,18	5,15	5,18	0,032	NS
Gordura, kg dia^{-1}	1,02	1,03	1,13	0,039	NS	1,31	1,38	1,37	0,055	NS	1,024	1,052	0,963	0,035	NS
Proteína, kg dia^{-1}	0,92	0,98	0,97	0,017	†	1,20	1,19	1,17	0,023	NS	1,013	1,002	0,952	0,016	†
Lactose, kg dia^{-1}	1,42^{a}	1,52^{b}	1,47^{ab}	0,017	*	1,94	1,93	1,89	0,042	NS	1,508	1,501	1,438	0,017	†
Leite/IMS	1,43	1,42	1,41	0,039	NS	1,58	1,54	1,52	0,030	NS	1,45	1,42	1,39	0,025	NS
FCM/IMS	1,36	1,29	1,37	0,045	NS	1,45	1,46	1,45	0,037	NS	1,32	1,32	1,27	0,018	NS
PL/IPB[5]	0,34^{a}	0,29^{b}	0,27^{b}	0,010	**	0,30^{a}	0,30^{a}	0,28^{b}	0,005	*	0,35	0,34	0,33	0,008	NS
Peso vivo, kg	596	588	587	3,1	NS	630	623	623	4,7	NS	604	618	608	5,7	NS

[a, b, c]Na mesma linha valores com diferentes notações são significativamente diferentes (P<0,05).

[1]Tratamentos denominados de acordo com a relação ERDP/FME: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso.

[2]Tratamentos denominados de acordo com o teor em ureia dos alimentos concentrados, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.

[3]Tratamentos denominados de acordo com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.

[4]Produção de leite corrigida para 4% de gordura.

[5]Proteína do leite/Ingestão de proteína bruta.

‡Erro padrão da média.

* P<0,05; ** P<0,01; † P<0,10.

nenhum dos parâmetros medidos, com excepção da eficiência de utilização da PB da dieta para a síntese de proteína do leite, que foi significativamente inferior (P<0,05) na dieta U10. As vacas primíparas apresentaram menor ingestão de MS (primíparas, 21,0 kg MS dia^{-1}; multíparas, 25,6 kg MS dia^{-1}; P<0,001), menor produção de leite (primíparas, 32,2 kg dia^{-1}; multíparas, 39,2 kg dia^{-1}; P<0,001) e menor teor butiroso do leite (primíparas, 3,18 %; multíparas, 3,88 %; P<0,01) do que as vacas multíparas.

A estratégia de distribuição do alimento CPr afectou, apenas, significativamente (P<0,05), a produção diária de leite não corrigida para o teor em gordura, tendo a distribuição uma vez ao dia (D1) promovido menor produção de leite (27,9 kg leite dia^{-1}), não se observando diferenças quando o CPr foi distribuído como alimento completo (DU) ou repartido em duas refeições (D2). Tal como observado nas experiências anteriores, as vacas primíparas ingeriram menor quantidade de alimento (primíparas, 18,5 kg MS dia^{-1}; multíparas, 24,3 kg MS dia^{-1}; P<0,001) e apresentaram menor produção de leite (primíparas, 26,1 kg dia^{-1}; multíparas, 34,2 kg dia^{-1}; P<0,001) do que as vacas multíparas.

4.4.4. Excreção urinária de alantoína e de creatinina

Os resultados relativos às concentrações de alantoína e de creatinina, à relação A/c nas amostras de urina e ao fluxo de proteína microbiana para o duodeno, estimado de acordo com o AFRC (1993), para as experiências 1, 2 e 3, estão apresentados no QUADRO 4.8. Os respectivos quadros de análise de variância encontram-se no ANEXO I.

As concentrações urinárias de alantoína e de creatinina na Experiência 1 foram significativamente (P<0,05) superiores na dieta com a menor relação ERDP/FME. Contudo, a relação A/c, qualquer que seja o modo de expressão da concentração de creatinina, não foi significativamente (P>0,05) afectada pelo tratamento. A hora de recolha das amostras de urina não afectou (P>0,05) nenhum dos parâmetros medidos na Experiência 1. Na Experiência 2, a concentração urinária de alantoína (P<0,01) e a relação A/c (P<0,001) foram significativamente inferiores na dieta U5, não tendo sido a concentração urinária de creatinina afectada significativamente (P>0,05). A hora de recolha das amostras de urina afectou (P<0,05) todos os parâmetros medidos, com excepção da concentração urinária de alantoína, nas experiências 2 e 3. Na Experiência 3, apenas a concentração urinária de creatinina foi afectada significativamente (P<0,05) pelo tratamento, tendo aumentado com a sincronização do fornecimento de nutrientes ao rúmen.

QUADRO 4.8 – Efeito do tratamento e da hora de recolha nas concentrações de alantoína e de creatinina e na relação alantoína/creatinina (A/c) nas amostras de urina e estimativa do fluxo de proteína bruta microbiana para o duodeno (MCP).

	Tratamento			EPM†	P	Hora de recolha			EPM	P
Experiência 1	RL[1]	RM[1]	RH[1]			8	16	24		
n	23	24	24			24	23	24		
Alantoína (mmol l^{-1})	58,1[a]	41,0[b]	44,4[b]	4,42	*	42,2	47,9	53,4	4,33	NS
Creatinina (mmol l^{-1})	14,8[a]	11,0[b]	11,5[b]	0,97	*	11,4	12,4	13,5	0,96	NS
Creatinina (mmol l^{-1} $PV^{-0,75}$)	0,13[a]	0,09[b]	0,10[b]	0,008	*	0,10	0,10	0,11	0,008	NS
A/c (mmol $mmol^{-1}$)	3,83	3,69	3,93	0,130	NS	3,79	3,81	3,85	0,128	NS
A/c (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$)	463	442	466	15,2	NS	453	456	461	14,9	NS
MCP (g dia^{-1})[2]	1294[a]	2020[b]	2167[c]	27,8	***					
Experiência 2	U0[3]	U5[3]	U10[3]			6	14	22		
n	27	27	21			25	25	25		
Alantoína (mmol l^{-1})	47,9[a]	38,6[b]	49,4[a]	2,53	**	43,6	48,2	44,1	2,47	NS
Creatinina (mmol l^{-1})	11,4	10,5	11,2	0,50	NS	10,0[a]	12,4[b]	10,6[a]	0,49	**
Creatinina (mmol l^{-1} $PV^{-0,75}$)	0,09	0,09	0,09	0,004	NS	0,08[a]	0,10[b]	0,09[a]	0,004	**
A/c (mmol $mmol^{-1}$)	4,14[a]	3,70[b]	4,40[a]	0,118	***	4,28[a]	3,84[b]	4,12[ab]	0,116	*
A/c (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$)	521[a]	462[b]	549[a]	14,7	***	535[a]	480[b]	517[ab]	14,4	*
MCP (g dia^{-1})[2]	2403[a]	2459[a]	2690[b]	30,5	***					
Experiência 3	DU[4]	D2[4]	D1[4]			6	14	22		
n	21	21	21			21	21	21		
Alantoína (mmol l^{-1})	69,0	59,2	53,3	5,77	NS	54,7	64,8	62,1	5,11	NS
Creatinina (mmol l^{-1})	18,7[a]	14,6[ab]	13,8[b]	1,37	*	12,2[a]	17,7[b]	17,2[b]	1,21	**
Creatinina (mmol l^{-1} $PV^{-0,75}$)	0,15[a]	0,12[ab]	0,11[b]	0,011	*	0,10[a]	0,14[b]	0,14[b]	0,010	**
A/c (mmol $mmol^{-1}$)	3,98	4,00	3,91	0,213	NS	4,37[a]	3,80[b]	3,72[b]	0,189	*
A/c (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$)	487	494	479	25,7	NS	487[a]	494[b]	479[b]	25,7	*
MCP (g dia^{-1})[2]	1804	1838	1793	20,0	NS					

[a, b, c]Na mesma linha valores com diferentes notações são significativamente diferentes (P<0,05).
[1]Tratamentos denominados de acordo com a relação ERDP/FME: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso.
[2]Calculado com base na ingestão de matéria seca, de acordo com o AFRC (1993), para um tempo médio de retenção no rúmen de 12 horas.
[3]Tratamentos denominados de acordo com o teor em ureia dos alimentos concentrados, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.
[4]Tratamentos denominados de acordo com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.
†Erro padrão da média.
* P<0,05.
** P<0,01.
*** P<0,001.

4.4.5. Parâmetros sanguíneos

No QUADRO 4.9 estão apresentadas as concentrações plasmáticas de glucose, de ureia, de albumina e de proteínas totais observadas nas experiências 1, 2 e 3. O efeito da hora de recolha da amostra de sangue nos parâmetros sanguíneos medidos na Experiência 3 está, também, apresentado no QUADRO 4.9. Os respectivos quadros de análise de variância apresentam-se no ANEXO I. Todos os parâmetros medidos encontravam-se dentro da gama de valores considerada normal para vacas adultas (ROSENBERGER, 1993). Apenas a concentração plasmática de ureia foi afectada significativamente ($P<0,001$) pela diferente relação ERDP/FME da dieta, tendo acompanhado o aumento dessa relação. Os tratamentos efectuados na Experiência 2 não tiveram efeito significativo ($P>0,05$) em nenhum dos parâmetros medidos. A estratégia de distribuição do alimento CPr não afectou significativamente ($P>0,05$) nenhum dos parâmetros sanguíneos avaliados. Como seria de esperar, as concentrações plasmáticas de ureia e de glucose foram significativamente diferentes ($P<0,001$) antes e após a refeição da manhã, tendo a primeira aumentado e a segunda diminuído *ca* quatro horas após a distribuição da dieta. A interacção entre o tratamento e a hora de recolha para a concentração plasmática de ureia foi significativa ($P<0,001$).

4.5. DISCUSSÃO

Nas três experiências o ajuste semanal da quantidade de alimento a fornecer a cada animal e em cada dia permitiu que o nível de refugo objectivo (5-10% na MS) fosse alcançado.

A adaptação dos animais às dietas nas experiências 1 e 2 decorreu com normalidade. Já na Experiência 3 algumas vacas manifestaram, inicialmente, dificuldade em ingerir a totalidade do alimento CPr, quando este foi oferecido, apenas, numa refeição. A estratégia seguida, nestes casos, para que as vacas se habituassem a ingerir este alimento passou por misturar o CPr com uma pequena quantidade de silagem de milho, o que levou os animais, ao fim de alguns dias, a ingerirem rapidamente (5-15 min) e na totalidade todo o suplemento proteico fornecido. Quando as vacas receberam o alimento CPr repartido em duas refeições ingeriram-no com rapidez e na totalidade.

Apesar das dietas terem sido oferecidas como alimento completo e do feno de azevém ter sido cortado antes de ser oferecido, o comportamento selectivo dos animais não

QUADRO 4.9 – Concentrações plasmáticas de glucose, de ureia, de albumina e de proteínas totais nas experiências 1, 2 e 3 e efeito da hora de recolha das amostras de sangue na Experiência 3.

	n		Glucose	Ureia	Albumina	Proteínas totais
			mg dl^{-1}	mg dl^{-1}	g dl^{-1}	g dl^{-1}
Experiência 1						
RL[1]	8		53,5	23,3[a]	3,20	8,13
RM[1]	8		51,7	30,0[b]	3,28	7,80
RH[1]	8		55,1	36,5[c]	3,22	8,05
EPM‡			1,20	1,06	0,073	0,118
P			NS	***	NS	NS
Experiencia 2						
U0[2]	9		62,3	37,9	3,59	7,70
U5[2]	9		64,6	37,6	3,87	7,45
U10[2]	7		63,1	39,1	3,75	7,46
EPM			1,47	1,26	0,105	0,156
P			NS	NS	NS	NS
Experiência 3[3]		Hora de recolha				
DU[4]	7	Antes	68,0	28,6[a]	3,69	7,47
	7	Após	59,4	31,5[ab]	3,61	7,27
D2[4]	7	Antes	68,8	25,1[c]	3,65	7,35
	7	Após	57,8	33,5[bd]	3,62	7,30
D1[4]	7	Antes	65,5	23,4[c]	3,67	7,58
	7	Após	61,3	35,3[d]	3,64	7,51
EPM			2,24	1,09	0,034	0,086
Efeitos						
Tratamento			NS	NS	NS	†
Hora de recolha			***	***	†	NS
Tratamento × Hora de recolha			NS	***	NS	NS

[a, b, c, d]Na mesma coluna valores com diferentes notações são significativamente diferentes (P<0,05).
[1]Tratamentos denominados de acordo com a relação ERDP/FME: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso.
[2]Tratamentos denominados de acordo com o teor em ureia dos alimentos concentrados, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.
[3]Interacção tratamento x hora de recolha para a concentração plasmática de ureia (P<0,001).
[4]Tratamentos denominados de acordo com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.
‡Erro padrão da média.
*** P<0,001.
† P<0,10.

foi completamente evitado, como se constata pela análise da composição química dos refugos (QUADRO 1.3.A; ANEXO I). Com efeito, os animais deverão ter seleccionado o

alimento concentrado e a fracção mais digestível ou de menor tamanho de partícula da silagem de milho, em detrimento, quer das fracções mais fibrosas da silagem de milho, quer do feno de azevém, pois os teores médios em PB e em amido dos refugos foram sempre inferiores aos das dietas oferecidas, sendo, pelo contrário, os teores, médios, em NDF, em ADF e em ADL sempre superiores.

Os valores de ingestão voluntária observados na Experiência 2 foram superiores aos registados nas experiências 1 e 3. Cabe, porém, realçar que as temperaturas mais elevadas registadas durante o período experimental em que decorreu a Experiência 1 poderão ter limitado a ingestão voluntária dos animais no decurso desta experiência e que na Experiência 3, dos nove animais locados a esta experiência, seis vacas eram primíparas. Por outro lado, na Experiência 2 foram utilizadas vacas no primeiro terço da lactação e, consequentemente, com necessidades mais elevadas.

Nas três experiências optou-se por formular dietas que permitissem produções de leite acima dos valores apresentados pelos animais antes do início dos ensaios de modo a não limitar, por incapacidade de ingestão, a produção de leite, em particular das vacas primíparas.

4.5.1. Avaliação das dietas

Na Experiência 1 pretendeu-se formular dietas isoenergéticas, que satisfizessem as necessidades dos animais em MP, mas que diferissem na relação ERDP/FME. Com efeito, a estimativa do teor em EM, através da aplicação das equações britânicas aos resultados das análises químicas dos alimentos, validou a hipótese de que as dietas eram, de facto, isoenergéticas, tal como era pretendido. O objectivo em termos de relação ERDP/FME era que as dietas proporcionassem uma grande deficiência, uma ligeira deficiência e um ligeiro excesso de ERDP em relação ao nível objectivo de 11 g ERDP MJ^{-1} FME indicado pelo AFRC (1993) para vacas leiteiras, respectivamente, 8, 10 e 12 g ERDP MJ^{-1} FME. No entanto, os resultados obtidos *in sacco* mostraram que, embora este objectivo não tenha sido inteiramente cumprido, se pode continuar a considerar que as dietas proporcionaram uma grande e uma ligeira deficiência e um ligeiro excesso de ERDP, sendo a maior deficiência utilmente maior do que o previsto com base em valores tabelados. As estimativas das relações ERDP/FME foram, também, confirmadas pelos valores de concentração plasmática de ureia que aumentaram com o aumento da relação ERDP/FME

das dietas. Apesar das grandes diferenças no teor em ERDP das dietas, todas elas satisfaziam ou mesmo excediam as necessidades em MP das vacas (AFRC, 1993). Com a dieta RL isto foi conseguido graças à baixa degradabilidade da PB do alimento concentrado RL (QUADRO 4.3).

Na Experiência 2, embora o objectivo de dietas isoenergéticas tenha sido quase atingido, a relação ERDP/FME, calculada para um tempo médio de retenção no rúmen de 12 horas, para a dieta U10 foi superior do que para as dietas U0 e U5. Contudo, esta discrepância aparente não foi confirmada por diferenças nas concentrações plasmáticas de ureia. Além disso, a concentração plasmática de ureia relativamente elevada nesta experiência sugere que a síntese de PB microbiana foi limitada pelo fornecimento de FME. A relação ERDP/FME relativamente baixa da dieta utilizada na Experiência 3 foi ao encontro dos objectivos de formulação.

Embora alguns estudos apontem maior digestibilidade da dieta com o maior fornecimento de PB (VAN HORN *et al.*, 1979; HA e KENELLY, 1984; JANICKI *et al.*, 1985; WEIGEL *et al.*, 1997), provavelmente devido à maior disponibilidade de amoníaco, aminoácidos ou de péptidos para o crescimento dos microrganismos do rúmen (OLDHAM, 1984; CHENOST e DULPHY, 1987), a digestibilidade estimada, utilizando o marcador interno cinzas insolúveis no ácido clorídrico, da MS, da MO e da fracção NDF das dietas utilizadas em cada experiência não foi afectada significativamente pelos tratamentos, indo ao encontro dos resultados obtidos por outros autores (LEONARD e BLOCK, 1988; KLUSMEYER *et al.*, 1990a; MABJEESH *et al.*, 1997). Sublinhe-se, porém, que são conhecidas várias fontes de erro inerentes à estimativa da digestibilidade dos alimentos ou da dieta pela utilização deste marcador, tais como o desconhecimento da origem e da natureza dos compostos siliciosos (VAN SOEST, 1994), a absorção e a excreção na urina de substâncias siliciosas solúveis, as baixas concentrações em sílica de alguns alimentos (VAN KEULEN e YOUNG, 1977) e as contaminações das amostras de alimentos (VAN SOEST, 1994) e de fezes (VAN KEULEN e YOUNG, 1977) por terra.

Apesar das limitações, optou-se, neste estudo, pela utilização deste marcador. Esta escolha deveu-se à elevada recuperação nas fezes das cinzas insolúveis no ácido clorídrico (OHAJURUKA e PALMQUIST, 1991; MAYES e DOVE, 2000), à ausência, em vários estudos, de efeito do dia e da hora de recolha das fezes na estimativa da digestibilidade (VAN KEULEN e YOUNG, 1977; THONNEY *et al.*, 1985; FERREIRA, 2002), ao fornecimento de estimativas precisas da digestibilidade, quando comparadas com os valores obtidos com

recolha total de fezes (VAN KEULEN e YOUNG, 1977; THONNEY *et al.*, 1979; BLOCK *et al.*, 1981), ao facto de 15 dias de habituação dos animais à dieta serem suficientes para a determinação de concentrações fecais relativamente constantes deste marcador (FERREIRA, 2002) e à sua determinação analítica mais simples e, consequentemente, de menor custo.

As concentrações médias de cinzas insolúveis no ácido clorídrico nas amostras de alimentos foram, neste estudo, superiores ao teor de 7,5 g kg^{-1} MS apontado por THONNNEY *et al.* (1985) como limite mínimo necessário para a obtenção de estimativas precisas da digestibilidade.

4.5.2. Ingestão voluntária

O efeito do teor em PB da dieta na ingestão voluntária de vacas leiteiras não é consistente. Com efeito, como se pode observar no QUADRO 4.10, alguns autores observaram que a ingestão voluntária não foi afectada significativamente para dietas com teores em PB (g kg^{-1} MS) superiores a 110 (KLUSMEYER *et al.*, 1990a), a 120 (CRESSMAN *et al.*, 1980; BARNEY *et al.*, 1981b; POLAN *et al.*, 1985; WOHLT *et al.*, 1991; METCALF *et al.*, 1994), a 135 (JANICKI *et al.*, 1985; GRINGS *et al.*, 1992b), a 140-160 (HA e KENNELLY, 1984; HENDERSON *et al.*, 1985; HOWARD *et al.*, 1987; LEONARD e BLOCK, 1988; MCGUFFEY *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 1991; ZIMMERMAN *et al.*, 1991 e 1992; CHRISTENSEN *et al.*, 1993; KOMARAGIRI e ERDMAN, 1997; BACH *et al.*, 2000) e a 170-175 (BRUCKENTAL *et al.*, 1989; ATWELL *et al.*, 1991; GRINGS *et al.*, 1991; ROBINSON *et al.*, 1991). Todavia, noutros trabalhos foram observados aumentos na ingestão voluntária quando o teor em PB (g kg^{-1} MS) da dieta aumentou até 180 (LUNDQUIST *et al.*, 1986; WEIGEL *et al.*, 1997), 190 (CLAYPOOL *et al.*, 1980; CANFIELD *et al.*, 1990; CUNNINGHAM *et al.*, 1996) e 238 (DHIMAN e SATTER, 1993).

Mas, a interpretação dos efeitos da suplementação azotada na resposta produtiva de vacas leiteiras é dificultada pelo facto de a qualquer alteração do teor em PB da dieta estarem, geralmente, associadas, simultaneamente, alterações nos teores em energia, em RDP ou em DUP, podendo, ainda, a alteração do teor em RDP das dietas obrigar, se o objectivo for garantir a cobertura das necessidades em MP dos animais, a que o teor em DUP, também, varie.

O objectivo da Experiência 1 consistiu no estudo do efeito da relação ERDP/FME das dietas na resposta produtiva dos animais. Para que os efeitos observados pudessem ser

QUADRO 4.10 – Efeito do teor em proteína bruta (PB, g kg^{-1} MS) da dieta na ingestão de matéria seca (IMS, kg dia^{-1}), na produção de leite (PLeite, kg dia^{-1}), na produção de leite corrigida para o teor em gordura (FCM, kg dia^{-1}), no teor (T, %) e na produção (PR, kg dia^{-1}) de gordura (G) e de proteína (P) do leite.

Ref.	Forragem base	PB	Efeito do aumento do teor em PB da dieta						
			IMS	PLeite	FCM	G		P	
						T	PR	T	PR
[1]	SM	127							
		163							
		193	+		NS	NS		NS	NS
[2][1,2]	SM	124							
		151		+				+	
		177	NS		NS	NS			
[2][3]		124							
		151							
		177	NS	+	NS	NS		NS	
[2][2,4]		124							
		151						+	
		177	NS	NS	NS	NS			
[2][3]		124							
		151							
		177	NS	NS	NS	NS		NS	
[3]	SM	122							
		141							
		156							
		178	NS	NS		NS		+	
[4]	FL	130							
		150							
		170						-	
		190	NS	NS		NS	NS		NS
[5]	SS	145							
		147							
		157							
		227	NS	NS		NS	NS	+	NS
[6]	SM	136							
		153		-					

[1] CLAYPOOL *et al.*, 1980; [2] CRESSMAN *et al.*, 1980; [3] BARNEY *et al.*, 1981b; [4] HA e KENNELLY, 1984; [5] HENDERSON *et al.*, 1985; [6] JANICKI *et al.*, 1985.
FL = feno de luzerna; SM = silagem de milho; SS = silagem de sorgo;
[1]Multíparas; [2]5 a 6 semanas pós-parto; [3]12 a 13 semanas pós-parto; [4]Primíparas.
Efeitos: (NS) não significativo; (-) negativo; (+) positivo.

QUADRO 4.10 – Efeito do teor em proteína bruta (PB, g kg^{-1} MS) da dieta na ingestão de matéria seca (IMS, kg dia^{-1}), na produção de leite (PLeite, kg dia^{-1}), na produção de leite corrigida para o teor em gordura (FCM, kg dia^{-1}), no teor (T, %) e na produção (PR, kg dia^{-1}) de gordura (G) e de proteína (P) do leite (continuação).

Ref.	Forragem base	PB	Efeito do aumento do teor em PB da dieta						
			IMS	PLeite	FCM	G		P	
						T	PR	T	PR
[7]	SM	144							
		159							
		174	NS	+		NS	NS	NS	NS
		154							
		170							
		184	NS	+		NS	NS	NS	NS
		145							
		161							
		183	NS	+		NS	NS	NS	NS
[8]	SM	125							
		180	+	+	+	NS	+	NS	+
[9]	SS	150							
		200	NS	+		NS		NS	
[10]	SM	154							
		207	NS	NS	+	+	+	NS	+
[11][1]	SM/ST	170							
		210		NS	NS		NS		NS
[11][2]		170							
		210		NS	NS		NS		NS
[12]	SM	165							
		192	+	+					
[13]	SM	140							
		170	NS	NS	NS	NS		NS	
[14]	SM	110							
		145	NS	+	+	NS	+	NS	+
[15]	PTT	129							
		136							
		175	+						
		225							

[7] POLAN *et al.*, 1985; [8] LUNDQUIST *et al.*, 1986; [9] HOWARD *et al.*, 1987; [10] LEONARD e BLOCK, 1988; [11] BRUCKENTAL *et al.*, 1989; [12] CANFIELD *et al.*, 1990; [13] MCGUFFEY *et al.*, 1990; [14] KLUSMEYER *et al.*, 1990a; [15] ATWELL *et al.*, 1991.

PTT = palha de trigo tratada com peróxido de hidrogénio; SM = silagem de milho; SS = silagem de sorgo; ST = silagem de trigo;

[1]Multíparas; [2]Primíparas.

Efeitos: (NS) não significativo; (-) negativo; (+) positivo.

QUADRO 4.10 – Efeito do teor em proteína bruta (PB, g kg^{-1} MS) da dieta na ingestão de matéria seca (IMS, kg dia^{-1}), na produção de leite (PLeite, kg dia^{-1}), na produção de leite corrigida para o teor em gordura (FCM, kg dia^{-1}), no teor (T, %) e na produção (PR, kg dia^{-1}) de gordura (G) e de proteína (P) do leite (continuação).

Ref.	Forragem base	PB	Efeito do aumento do teor em PB da dieta						
			IMS	PLeite	FCM	G		P	
						T	PR	T	PR
[16]	FL	138							
		175	+	+		NS	+	NS	+
		204							
		239							
[17]	SM/FL	160							
		180	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
[18]	SL	171							
		236	NS						
[19]	SM	120							
		160	NS	+	+	NS	+	NS	+
[20]	FG	140							
		180		+	+	+	+	NS	+
		220	NS						
[21]	FL	139							
		160							
		181		+					
		203	NS					+	+
[22]	FL	144							
		187	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
[23]	SM/HL	164							
		194	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
[24]	SL	187							
		238	+	+	+	NS	+	NS	+
		192							
		223	NS	+	+	NS	+	+	+
[25]	SE	124							
		172		NS					NS
[26]	SM	145							
		165						+	
		185	+	NS	+	+	+		+

[16] GRINGS *et al.*, 1991; [17] KIM *et al.*, 1991; [18] ROBINSON *et al.*, 1991; [19] WOHLT *et al.*, 1991; [20] ZIMMERMAN *et al.*, 1991; [21] GRINGS *et al.*, 1992b; [22] ZIMMERMAN *et al.*, 1992; [23] CHRISTENSEN *et al.*, 1993; [24] DHIMAN e SATTER, 1993; [25] METCALF *et al.*, 1994; [26] CUNNINGHAM *et al.*, 1996.
FG = feno de gramíneas; FL = feno de luzerna; HL = feno-silagem de luzerna; SE = silagem de erva; SL = silagem de luzerna; SM = silagem de milho.
Efeitos: (NS) não significativo; (-) negativo; (+) positivo.

QUADRO 4.10 – Efeito do teor em proteína bruta (PB, g kg^{-1} MS) da dieta na ingestão de matéria seca (IMS, kg dia^{-1}), na produção de leite (Pleite, kg dia^{-1}), na produção de leite corrigida para o teor em gordura (FCM, kg dia^{-1}), no teor (T, %) e na produção (PR, kg dia^{-1}) de gordura (G) e de proteína (P) do leite (conclusão).

Ref.	Forragem base	PB	Efeito do aumento do teor em PB da dieta						
			IMS	PLeite	FCM	G		P	
						T	PR	T	PR
[27]	SM	160							
		190	NS	NS	NS	NS	NS	+	NS
[28]	HL	150							
		180	+	NS	NS	NS	NS	NS	NS
[29][1]	SM	152							
		174	NS	+	+	NS	+	NS	+
[29][2]	SM	133							
		153	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
[29][3]	SM	126							
		142	+	NS	NS	NS	NS	NS	NS
[30]	SM	150							
		180	NS	NS		NS	NS	NS	NS

[27] KOMARAGIRI e ERDMAN, 1997; [28] WEIGEL *et al.*, 1997; [29] KALSCHEUR *et al.*, 1999; [30] BACH *et al.*, 2000.
HL = feno-silagem de luzerna; SM = silagem de milho;
[1]Início da lactação: 4ª – 14ª semana; [2]meio da lactação: 19ª– 29ª semana; [3]final da lactação: 34ª – 44ª semana.
Efeitos: (NS) não significativo; (-) negativo; (+) positivo.

imputados sobretudo à fermentação no rúmen, as dietas foram delineadas com diferentes ingredientes e de modo a satisfazerem as necessidades em MP dos animais e a proporcionarem diferentes relações ERDP/FME. As dietas apresentaram diferente teor em PB, que aumentou com o aumento da relação ERDP/FME, mas este aumento no teor em PB resultou, sobretudo, do aumento do teor em RDP por forma a se evitar a dificuldade de interpretação dos resultados quando é difícil distinguir se as vacas respondem ao aumento do teor em RDP ou a ambos os teores em RDP e em UDP. A dieta com 10,1 g ERDP MJ^{-1} FME foi suficiente para impedir a depressão na ingestão voluntária. Este nível de ERDP situa-se abaixo do nível (11 g ERDP MJ^{-1} FME) sugerido pelo sistema britânico da proteína metabolizável (AFRC, 1993) para vacas leiteiras em lactação. Já a diminuição marcada da ingestão voluntária com a dieta RL sugere que os microrganismos do rúmen estavam perante um défice em RDP, indo ao encontro dos resultados obtidos em vários estudos (CHENOST e DULPHY, 1987; DHIMAN e SATTER, 1993; WEIGEL *et al.*, 1997).

O efeito estimulante da fracção RDP parece envolver um ciclo de melhor eficiência

de síntese de proteína microbiana, aumento da digestibilidade da MS, aumento da taxa de diluição, aumento da ingestão voluntária e, finalmente, aumento da ingestão de energia. Os resultados de VAN HORN *et al.* (1985) suportam o princípio de que o aumento da proteína da dieta pode conduzir ao aumento da ingestão de energia. Estes autores, quando fizeram variar a relação energia/proteína (TDN/PB) da dieta, observaram uma tendência para maiores respostas produtivas ao aumento da proteína quando a energia foi restringida. Pelo contrário, MACLEOD *et al.* (1984) demonstraram a existência de resposta produtiva à proteína em dietas com baixo ou elevado teor em energia; contudo, nesse estudo, foram utilizadas vacas na primeira lactação, que têm maiores necessidades em energia para o crescimento.

Mas, os efeitos do teor em proteína da dieta na ingestão voluntária podem ser, também, atribuídos a outros factores (FIGURA 4.2). Neste contexto, FAVERDIN *et al.* (2003) consideram ser possível enumerar três grandes mecanismos de acção das proteínas na ingestão: (1) o equilíbrio em aminoácidos, teoria já proposta para os animais monogástricos, mas passível de regular a ingestão de animais ruminantes, na medida em que é sabido que certos aminoácidos são precursores de neuropéptidos implicados na regulação da ingestão voluntária, sendo, também, possível que os aminoácidos "informem" directamente o cérebro dos desequilíbrios em aminoácidos e provoquem modificações na ingestão, embora isto não tenha sido, ainda, demonstrado em animais ruminantes (GIETZEN, 1993); (2) a síntese proteica na glândula mamária requer quantidades elevadas de energia, pelo que o aumento da quantidade de aminoácidos disponíveis para a síntese do leite pode conduzir a uma maior taxa de utilização de outros metabolitos do sangue, podendo aumentar o metabolismo energético; e (3) acções indirectas dos alimentos proteicos na ingestão, uma vez que a incorporação de matérias primas ricas em proteína é geralmente feita em detrimento de outras matérias primas, sobretudo energéticas, o que conduz, em geral, à diminuição da proporção de glúcidos rapidamente degradáveis no rúmen, que pode diminuir a produção de certos produtos finais da digestão e que as proteínas podem actuar na regulação do pH do rúmen e do sangue, o que contribui para explicar as maiores respostas na ingestão voluntária ao aumento do teor em proteína em dietas sem substâncias tampão ou alcalinizantes (RICO-GOMEZ e FAVERDIN, 2001).

O facto de a ingestão voluntária não ter aumentado quando a relação ERDP/FME da dieta aumentou, da dieta RM para a dieta RH, sugere que as necessidades em N dos microrganismos do rúmen, provavelmente, já estariam asseguradas. Nestas situações, é

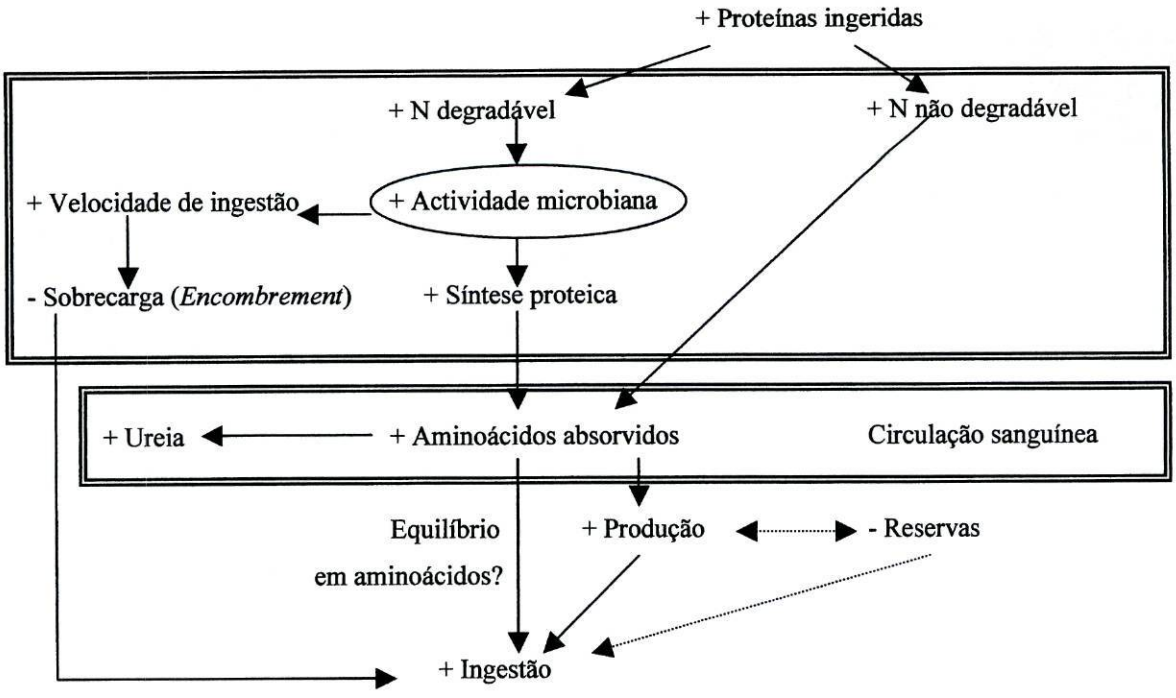


FIGURA 4.2 – Representação esquemática dos mecanismos de acção das proteínas na regulação da ingestão. **ADAPTADO DE** FAVERDIN *et al.* (2003).

conhecido que todo o fornecimento suplementar de N solúvel ao rúmen, de natureza proteica ou não, não terá, no geral, qualquer efeito sobre a ingestão voluntária (KNIGHT, 1973; POLAN *et al.*, 1976; WOHLT e CLARK, 1978; REDMAN *et al.*, 1980; KERTZ *et al.*, 1982; ROOKE *et al.*, 1987; CHOUNG e CHAMBERLAIN, 1995). Além disso, mesmo que o défice em N degradável tenha sido ligeiro, a reciclagem de N para o rúmen pode ter coberto as necessidades em N dos microrganismos e, neste caso, a suplementação com RDP não traz qualquer benefício (RICO-GOMEZ e FAVERDIN, 2001; FAVERDIN *et al.*, 2003). Contrariamente, quando o fornecimento de RDP na dieta é excessivo, alguns autores verificaram que a maior produção de amoníaco provoca uma paragem da motricidade ruminal e uma importante diminuição da actividade microbiana, bem como uma diminuição significativa do apetite (KERTZ *et al.*, 1983; CHOUNG *et al.*, 1990).

Nesta experiência (Experiência 1), apesar de o objectivo ter sido estudar a função ruminal, as dietas apresentaram teores em UDP diferentes, pelo que este efeito não deve ser totalmente ignorado. Com efeito, recentemente, um ensaio de infusão de proteínas hidrolisadas de soja, no rúmen e no duodeno de vacas leiteiras, mostrou claramente a acção das proteínas digestíveis no intestino, na ingestão voluntária (FAVERDIN *et al.*, 2003), bem como os efeitos indirectos das proteínas infundidas via reciclagem de N no rúmen. As

vacas receberam uma dieta completa, distribuída *ad libitum*, constituída por 60% de silagem de milho e 40% de alimento concentrado. O teor em proteína da dieta era baixo (88 g PDIME unidade forrageira "leite"$^{-1}$ (UFL)), mas esta era equilibrada em N degradável. Cada tratamento teve uma duração de quatro semanas. A ingestão voluntária aumentou significativamente cerca de 2 kg MS dia^{-1} com as infusões duodenais de proteína, não tendo sido afectada pelas infusões no rúmen. O fornecimento de proteínas intestinais modificou, também, o comportamento alimentar dos animais, tendo aumentado a velocidade de ingestão e diminuído o número de refeições. Esta resposta na ingestão voluntária depende, contudo, da duração do tratamento, sendo menor e independente das quantidades fornecidas em ensaios de duração inferior a um mês por tratamento, e, em média, duas vezes superior e, provavelmente, dependente da dose de proteína fornecida, em ensaios de duração mais longa (FAVERDIN *et al.*, 1998; VÉRITÉ e DELABY, 1998; FAVERDIN *et al.*, 2002 e 2003). Daqui decorre que o maior teor em UDP da dieta RL pode ter permitido que a depressão observada na ingestão voluntária não fosse tão extensa e que seja passível de ser atribuída maioritariamente ao défice em ERDP.

A albumina do soro tem sido utilizada como indicador da quantidade suficiente de proteína na dieta. A concentração de albumina diminui com ingestões inadequadas de PB, mas não aumenta acima dos valores normais com elevadas ingestões de PB (BLAUWIEKEL e KINCAID, 1986). Neste estudo (Experiência 1), a dieta não afectou significativamente a concentração plasmática de albumina, indo ao encontro dos resultados de outros estudos (ERFLE *et al.*, 1974; MANSTON *et al.*, 1975; JORDAN *et al.*, 1983; BLAUWIEKEL e KINCAID, 1986). Igualmente, a concentração plasmática de proteínas totais, também um indicador da quantidade de PB ingerida, não foi afectada de forma significativa pelo aumento do teor em PB da dieta, tal como verificado por JORDAN *et al.* (1983) quando o teor em PB aumentou de 12 para 23%. Ao contrário do observado por CANDFIELD *et al.* (1990), a concentração plasmática de glucose não foi maior nas vacas primíparas, mas os resultados vão de encontro aos obtidos por BACH *et al.* (2000), de que o teor em PB da dieta não afecta a concentração plasmática de glucose.

O tipo e a quantidade de energia disponível para a fermentação microbiana, bem como o tipo de proteína e a sincronização das disponibilidades de energia e de N no rúmen devem, também, ser considerados na interpretação das respostas ao teor em PB da dieta. A alteração do fornecimento de energia e de N aos micróbios do rúmen pela alteração dos ingredientes da dieta (alteração da relação QDP/SDP; Experiência 2) ou pela alteração dos

padrões de alimentação do CPr (Experiência 3) não afectou a ingestão de MS. Isto pode ter resultado dos níveis elevados de NSC nestas dietas, que poderão ter permitido uma maior eficiência de utilização da fracção RDP (STERN *et al.*, 1978; MACGREGOR *et al.*, 1983; CASPER e SCHINGOETHE, 1986; JAQUETTE *et al.*, 1987; CAMERON *et al.*, 1991).

Mas, na interpretação dos resultados da Experiência 2, deve considerar-se, não só o efeito da alteração QDP/SDP da dieta na sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen, mas, também, que essa relação foi alterada pela substituição do tipo de substrato azotado que, como já discutido no CAPÍTULO 2, pode afectar a função ruminal. Na literatura, o efeito da substituição, na dieta, de fontes de proteína verdadeira por fontes de N não proteico, na ingestão voluntária de vacas leiteiras é contraditório. Alguns autores referem que suplementos de proteína verdadeira, especialmente com baixo teor em N solúvel, estimulam a ingestão voluntária em maior extensão do que dietas com ureia ou com fontes de N mais solúveis (JONES *et al.*, 1975; SATTER e ROFFLER, 1975; POLAN *et al.*, 1976; MAJDOUB *et al.*, 1978; WOHLT e CLARK, 1978; CLARK e DAVIS, 1980), enquanto outros não verificaram qualquer efeito na ingestão voluntária (HUBER e KUNG, 1981; KUNG e HUBER, 1983; CASPER e SCHINGOETHE, 1989; CASPER *et al.*, 1990; SANNES *et al.*, 2002). SANTOS *et al.* (1998) procederam a comparações de ensaios a partir de 12 trabalhos publicados nos quais foi adicionada ureia entre 0,4 e 1,8% da MS da dieta, tendo a ureia substituído parcial ou totalmente bagaço de soja, drêches de cevada, bagaço de soja expandido, bagaço de soja + farinha de peixe ou subprodutos de origem animal. Estes autores verificaram que a ingestão de MS não foi afectada significativamente em 17 comparações, tendo aumentado em duas e diminuído em cinco.

Por outro lado, o grande volume de investigação que tem sido levado a cabo sobre a utilização de ureia na dieta da vaca leiteira, não permite, ainda, porque a variação na resposta é elevada, saber, com precisão, que quantidade de ureia pode ser utilizada sem perdas de eficiência. Provavelmente, alguma da variação pode ser atribuída a diferentes condições experimentais, pois muitos estudos foram de curta duração, conduzidos com vacas de baixa produção; nalguns estudos as vacas foram alimentadas *ad libitum*, com forragem de elevado teor em N, pelo que pouco ou nenhum N adicional era necessário para cobrir as necessidades para produção e manutenção; e, em muitos estudos, a ingestão de energia era baixa, o que, tornando as necessidades em N degradável também baixas, não mostra as possíveis diferenças entre fontes de N (WARD *et al.*, 1955; LOOSLI e WARNER, 1958; HUBER *et al.*, 1967; VAN HORN *et al.*, 1967; BRODERICK *et al.*, 1993).

Mas, no estudo do efeito do nível de inclusão de ureia no desempenho produtivo dos animais temos, também, de ter em consideração a fraca palatabilidade dos alimentos concentrados com ureia, observada por vários autores (WARD *et al.*, 1955; LOOSLI e WARNER, 1958; HUBER *et al.*, 1967; HOLTER *et al.*, 1968b; KERTZ *et al.*, 1982). Este problema parece ser maior em vacas leiteiras do que noutros ruminantes e tende a aumentar com o nível de produção de leite, talvez devido ao maior consumo de alimentos concentrados com elevados teores em proteína (HELMER e BARTLEY, 1971). De facto, alimentos com ureia promovem uma taxa de consumo mais lenta quando os níveis de ureia atingem os 2% (LOOSLI e WARNER, 1958; HUBER *et al.*, 1967), não se observando qualquer efeito para níveis entre 1,5 e 2% (LOOSLI e WARNER, 1958). A fraca palatabilidade da ureia pode trazer problemas adicionais se o alimento concentrado for fornecido na sala de ordenha (HOLTER *et al.*, 1968b), sendo a silagem de milho efectiva em mascarar esse efeito (HUBER *et al.*, 1967 e 1973). A utilização de ureia em dietas completas dilui a ureia total na dieta e diminui os problemas com a palatabilidade (BARTLEY e DEYOE, 1981). Na Experiência 2, as vacas não apresentaram dificuldade de ingestão das dietas com ureia, mas saliente-se que, neste caso, as dietas eram completas, à base de silagem de milho e o nível máximo de ureia no alimento concentrado foi de 1%.

Na Experiência 3 manipulámos a sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen alterando o modo de distribuição do suplemento proteico. Teoricamente, seria de esperar que o maior sincronismo no rúmen maximizasse o crescimento microbiano que, por sua vez, poderia promover maior digestão dos alimentos no rúmen e, consequentemente, maior ingestão voluntária e produção de leite. Contudo, no CAPÍTULO 3 verificámos que a evidência experimental no que respeita ao aumento da síntese e da eficiência de síntese de proteína microbiana com dietas sincronizadas é contraditória. Alguns ensaios produtivos com vacas leiteiras demonstram, também, que dietas sincronizadas, em termos de disponibilidade de N e de energia no rúmen, não afectam, ou mesmo diminuem, a ingestão voluntária (BILODEAU *et al.*, 1989; CASPER e SCHINGOETHE, 1989; MCCARTHY *et al.*, 1989; CASPER *et al.*, 1990; ALDRICH *et al.*, 1993; PETIT e TREMBLAY, 1995b; CASPER *et al.*, 1999). Contudo, dado que na maioria dos estudos a sincronização foi alterada pela substituição de fontes de NSC menos fermentáveis por outras fontes de NSC mais fermentáveis, sendo a cevada a fonte de NSC rapidamente fermentável mais utilizada, pode questionar-se se a diminuição observada na ingestão voluntária é devida à diminuição do pH do rúmen ou à palatabilidade da fonte de NSC

(cevada; BILODEAU *et al.*, 1989; CASPER e SCHINGOETHE, 1989; MCCARTHY *et al.*, 1989; CASPER *et al.*, 1999), embora a redução na ingestão de dietas à base de cevada, observada por CASPER *et al.* (1990), não estivesse associada com redução no pH do rúmen. Contrariamente, HERRERA-SALDANA *et al.* (1990) não observaram diferenças na ingestão quando a cevada substituiu o sorgo em dietas para vacas leiteiras. Segundo HOOVER e STOKES (1991), com base em resultados de estudos *in vitro* e *in vivo*, a taxa de digestão dos hidratos de carbono é o principal factor que controla a energia disponível para o crescimento microbiano.

DAWSON (1999) refere que os animais ruminantes podem detectar o assincronismo da disponibilização de nutrientes no rúmen. Especula, ainda, que as vacas desenvolveram mecanismos para ultrapassar ou minimizar os seus efeitos, quer alterando o seu padrão de ingestão de alimentos, para evitar excessiva concentração de amoníaco, quer pelo armazenamento de hidratos de carbono pelos micróbios do rúmen em períodos de défice em N, quer pela maior reciclagem de ureia para o rúmen. A interacção significativa entre o tratamento e a hora de recolha de sangue na concentração plasmática de ureia confirma o alcançar do nosso objectivo inicial de gerar padrões diferentes de ingestão de N entre os três tratamentos na Experiência 3, sugerindo, também, que as vacas não conseguiram ultrapassar completamente as manipulações impostas de sincronismo.

A dieta D1 representa um grau de assincronismo muito superior ao usualmente observado na prática, pelo menos com dietas à base de silagem de milho. Todavia, o teor relativamente baixo em PB das dietas utilizadas na Experiência 3 permitiu-nos identificar os efeitos da sincronização, uma vez que os efeitos no rúmen não terão sido mascarados por excesso de RDP, nem de UDP. Apesar da natureza extrema da dieta D1, apenas se observou uma pequena e não significativa redução da eficiência de utilização do N.

4.5.3. Excreção urinária de alantoína e de creatinina

Na impossibilidade de se proceder à recolha da totalidade da urina, porque os animais, para serem ordenhados, tiveram de se deslocar à sala de ordenha, e porque a maior parte dos dispositivos ensaiados, para a recolha total de urina, se têm revelado insatisfatórios (por caírem, não permitirem detectar o estro, causarem irritações na pele, reduzirem a ingestão voluntária e interferirem, geralmente, com outros aspectos do desempenho animal; R.T. EVANS, 2000, c. p.), foi decidido, neste estudo, fazer a recolha

de amostras de urina e, utilizando a creatinina como marcador interno de estimativa do volume, utilizar a relação A/c como método não invasivo de estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno. Deste modo, foi imposto menor desconforto às vacas, eliminou-se a necessidade de ordenha no estábulo e a utilização de conservantes na urina e simplificou-se a preparação da amostra. Contrariamente, não foi possível calcular, diariamente, o total de alantoína excretado na urina. A experiência por nós adquirida mostrou que a forma mais prática de obter uma amostra limpa de urina de uma vaca leiteira consiste em recolhê-la nos momentos em que esta urina voluntariamente.

Vários estudos mostram que a ingestão de água (SILANOKOVE *et al.*, 1997; DINN *et al.*, 1998) e a excreção de urina (HOLTER e URBAN, 1992; DELAQUIS e BLOCK, 1995a; MOSCARDINI *et al.*, 1998) aumentam, à medida que aumenta a quantidade de N a excretar. O efeito da proteína na ingestão de água e no volume de urina resulta, provavelmente, do efeito diurético da ingestão de proteína (BRODERICK *et al.*, 1974) e de um aumento progressivo de N que excede a capacidade dos rins em concentrar ureia que é mediado por alterações na taxa de filtração glomerular (ERIKSSON e VALTONEN, 1982). Contudo, a falta de efeitos claros da variação da ingestão de N na renovação da água corporal pode ser devida, entre outros, ao nível de ingestão de água (KRÖBER *et al.*, 2000), ao estádio de lactação (DELAQUIS e BLOCK, 1995b), à ingestão de MS (MURPHY, 1992; WOODFORD *et al.*, 1984; DELAQUIS e BLOCK, 1995b; SILANIKOVE *et al.*, 1997), ao padrão de ingestão, à natureza da dieta, à produção de leite, à temperatura ambiente e à humidade relativa do ar (MURPHY, 1992).

No nosso trabalho, as concentrações superiores de alantoína e de creatinina foram observadas nas dietas com menor teor em PB (RL, DU, D2 e D1). Por outro lado, as concentrações urinárias de alantoína e de creatinina relacionaram-se significativa e negativamente com o teor em PB das dietas ($r = -0,346$; $P<0,01$ e $r = -0,441$; $P<0,001$, respectivamente, para as concentrações de alantoína e de creatinina). O facto de as concentrações de alantoína e de creatinina terem aumentado (efeito significativo, apenas, para a concentração de creatinina) com a sincronização das disponbilidades de energia e de N no rúmen na Experiência 3, resultou, provavelmente, da menor necessidade em eliminar ureia. Os efeitos do fornecimento de proteína e da sincronização na ingestão de água e nas consequentes taxas de passagem do rúmen, complicam a interpretação dos factores que afectam a utilização do N. Os resultados obtidos na Experiência 2 vão ao encontro dos obtidos por HAIGH *et al.* (2002). Estes autores verificaram que, embora o aumento do teor

em proteína solúvel, alcançado pela adição de ureia, da dieta com o mesmo teor em PB (18% na MS) não tenha afectado a produção e a composição do leite, a ingestão de MS e a concentração de ureia no leite, afectou de forma quadrática a excreção urinária de DP e a quantidade de urina excretada.

VAGNONI *et al.* (1997) referem que a expressão da concentração de creatinina em relação ao peso vivo pode ser útil para remoção do efeito do animal, mas DE GROOT e AAFJES (1960) defendem que, quando os animais não variam muito em termos de peso vivo, não é necessário fazer a correcção, podendo mesmo não ser desejável, porque as vacas mais pesadas excretam mais creatinina, mas, também, têm uma maior capacidade metabólica e, por isso, excretam uma maior quantidade de diferentes metabolitos. De qualquer modo, neste estudo, a forma de expressão da concentração de creatinina (*i.e.*, mmol l^{-1} ou mmol l^{-1} $PV^{-0,75}$) não alterou o efeito dos tratamentos na relação A/c.

As relações A/c, superiores na Experiência 3 do que na Experiência 1, podem ter resultado do maior teor em amido desta dieta (20 e 26%, respectivamente, para as experiências 1 e 3) (PALMQUIST *et al.*, 1993; OLDICK *et al.*, 1999). Com efeito, a menor produção e eficiência de passagem de proteína microbiana para o duodeno passível de ocorrer com dietas ricas em fibra pode ser atribuída a uma deficiência em energia fermentável disponível (NSC) que, atrasando o crescimento dos micróbios, pode causar maior lise de células microbianas no rúmen e, consequentemente, aumentar a reciclagem de energia e de N no rúmen. Sublinhe-se que estas condições no rúmen aumentam as quantidades de energia e de N que são utilizadas para a manutenção da população microbiana (CLARK *et al.*, 1992).

A relação A/c, em amostras de urina, não identificou *in vivo* qualquer diferença consistente no fluxo de proteína microbiana para o duodeno, previsível entre os diversos tratamentos, através, quer das estimativas de acordo com o AFRC (1993; QUADRO 4.8), quer das diferenças observadas na ingestão de MS e na produção de leite. Isto embora as experiências tenham sido realizadas em quadrado latino e a urina de cada vaca tenha sido recolhida três vezes ao dia, em dois dias consecutivos. Com efeito, os resultados obtidos por JOHNSON *et al.* (1988) indicam que o fluxo de N microbiano tem de ser alterado em aproximadamente 84 g dia^{-1} para que a quantidade de alantoína excretada na urina reflicta alterações no fluxo de N microbiano e existem numerosas razões possíveis para a imprecisão da metodologia em estudo, incluindo efeitos no catabolismo dos tecidos (NSAHLAI *et al.*, 2000), variação na excreção de creatinina com a dieta e entre vacas, e

variações diurnas na excreção de alantoína e de creatinina (PUCHALA e KULASEK, 1992; MOORBY e DEWHURST, 1993; GONDA *et al.*, 1996; SHINGFIELD e OFFER, 1998b).

Nas três experiências, observou-se, também, significativa variação diurna na concentração urinária de creatinina (QUADRO 4.8) e, provavelmente, a dieta pode ter tido um efeito significativo na excreção urinária de creatinina. Assim, os resultados aqui apresentados vão ao encontro da afirmação de SHINGFIELD e OFFER (1998b) de que a recolha total de urina parece ser necessária para determinar com rigor a excreção de DP na urina em vacas leiteiras e, consequentemente, o fluxo de proteína microbiana para o duodeno. Saliente-se que, no estudo referido, mesmo um regime intensivo de recolha de amostras de urina (de duas em duas, durante 24 horas) não permitiu uma previsão aceitável da relação média diária de A/c.

Finalmente, é bem conhecido que a taxa de passagem afecta o fluxo de proteína microbiana para o duodeno e a eficiência de síntese de proteína microbiana (ROBINSON *et al.*, 1985; CHEN *et al.*, 1992b; PUCHALA e KUSALEK, 1992; DJOUVINOV e TODOROV, 1994; GOMES *et al.*, 1994; DJOUVINOV e TODOROV, 1995; OLDICK *et al.*, 1999), efeitos que se traduzem na excreção urinária de alantoína (DEWHURST e WEBSTER, 1992a and 1992b) e de DP (CHEN *et al.*, 1992b). Neste trabalho não medimos as taxas de passagem da fase sólida nem da fase líquida, apesar das diferenças na ingestão voluntária fazerem crer que estas terão variado entre vacas e entre dietas. Assim sendo, é-nos difícil utilizar esta variável como argumento explicativo na discussão.

4.5.4. Produção e composição do leite

Como esperado, a menor ingestão voluntária observada com a dieta RL na Experiência 1 afectou negativamente a produção de leite. Já o aumento do teor em PB da dieta RM para a dieta RH não aumentou a produção. Como também se pode observar no QUADRO 4.10 (SECÇÃO 4.5.3), a resposta produtiva ao aumento do teor em PB da dieta não é consistente. Vários estudos (ROFFLER *et al.*, 1978; CLAYPOOL *et al.*, 1980; CRESSMAN *et al.*, 1980; EDWARDS *et al.*, 1980; MURDOCK *et al.*, 1981) sugerem que o aumento da PB da dieta melhora a produção de leite através do aumento da ingestão de energia, pois em estudos (FOLDAGER e HUBER, 1979; CRESSMAN *et al.*, 1980; ROFFLER e THACKER, 1983) em que o aumento da ingestão de PB não aumentou a ingestão de energia, foi observada ligeira ou nenhuma resposta na produção de leite. GORDON e FORBES (1970) forneceram, a

vacas leiteiras, dietas com teores em energia e em proteína a 80 e 120% das necessidades e verificaram que a utilização da EM para o leite foi superior nas situações de excesso de proteína (63 *versus* 50%), tendo sido a resposta à energia adicional, também, superior com elevada ingestão de proteína. PAQUAY *et al.* (1973) observaram que a relação óptima entre o N digestível e a ingestão de EM era influenciada pelo estádio de lactação, concluindo que uma maior fermentação dos hidratos de carbono, provavelmente estimula a utilização do N digestível para a produção de leite, independentemente da ingestão total de energia, através do fornecimento de mais hidratos de carbono aos microrganismos do rúmen e, finalmente, mais EM à vaca.

Mais recentemente, o NRC (2001) com base em 393 médias de 82 estudos estabeleceu a seguinte equação de avaliação da resposta em termos de produção de leite ao aumento do teor em PB da dieta: Produção de leite (kg dia^{-1}) = 0,8 x ingestão de MS (kg dia^{-1}) + 2,3 x PB (% na MS) – 0,05 x PB^2 – 9,8 (r^2 = 0,29). Segundo esta equação e assumindo uma ingestão de MS fixa (uma vez que não existiu correlação entre a ingestão de MS e o teor em PB da dieta), a máxima produção de leite é obtida com 23% de PB; o aumento numa unidade percentual do teor em PB da dieta de 15 para 16% aumenta a produção de leite, em média, 0,75 kg dia^{-1} e o aumento de 19 para 20% provoca um aumento de 0,35 kg leite dia^{-1}, mostrando que os acréscimos na produção de leite com o aumento do teor em PB da dieta vão sendo cada vez menores. No entanto, esta equação, quando aplicada aos dados da Experiência 1, sobrestima a produção de leite (28,0, 31,0 e 31,7 kg leite dia^{-1} para, respectivamente, as dietas RL, RM e RH).

A PB da dieta em excesso em relação às necessidades dos micróbios, dependendo da natureza da proteína, pode ser degradada a amoníaco e excretada como ureia, aumentando os níveis circulantes deste metabolito, ou pode escapar à degradação no rúmen e ser digerida no intestino delgado. Neste estudo, o aumento da relação ERDP/FME da dieta provocou um aumento significativo da concentração plasmática de ureia, indo ao encontro dos resultados obtidos em numerosos estudos (*e.g.*, BARNEY *et al.*, 1981a; JORDAN *et al.*, 1983; HA e KENNELLY, 1984; JANICKI *et al.*, 1985; CANFIELD *et al.*, 1990; MCGUFFEY *et al.*, 1990; GRINGS *et al.*, 1991; KIM *et al.*, 1991; GRINGS *et al.*, 1992b; ZIMMERMAN *et al.*, 1992; CHRISTENSEN *et al.*, 1993; WEIGEL *et al.*, 1997; MCCORMICK *et al.*, 1999; BACH *et al.*, 2000).

Mas, tal como referido para a ingestão voluntária, apesar do objectivo da Experiência 1 ter sido avaliar o efeito da relação ERDP/FME das dietas na função ruminal,

através das respostas produtivas de vacas leiteiras, o teor em UDP das dietas foi, também, diferente, de modo a não limitar a produção de leite por défice em aminoácidos absorvidos. Segundo o NRC (2001) a produção de leite varia com os teores em RDP e em UDP de acordo com a equação: Produção de leite (kg dia^{-1}) = – 55,61 + 1,15 x ingestão de MS (kg dia^{-1}) + 8,79 x RDP (% na MS) – 0,36 x RDP^2 + 1,85 x UDP (% na MS) (n = 206; r^2 = 0,52), segundo a qual a máxima produção de leite ocorre, assumindo que a ingestão de MS e o teor em UDP se mantém constantes, quando o teor em RDP iguala 12,2% (na MS). Aplicando os resultados obtidos na Experiência 1 a esta equação, assumindo que a fracção RDP iguala o somatório das fracções QDP e SDP obtidas de acordo com o AFRC (1993), obtêm-se valores de produção de leite (25,7, 30,1 e 29,9 kg dia^{-1}, respectivamente, para as dietas RL, RM e RH) inferiores aos obtidos com a equação anterior, mas, com excepção da dieta RL, mais semelhantes aos observados, o que demonstra a importância da consideração de ambas as fracções RDP e UDP, aquando da estimativa da produção de leite. O maior teor em UDP da dieta RL pode não ter permitido maior diminuição da produção de leite, por ter assegurado uma maior quantidade de aminoácidos absorvidos com origem na proteína que escapou à fermentação no rúmen.

Contudo, a quantidade de UDP necessária para maximizar o desempenho produtivo não está, ainda, claramente definida e pode variar com numerosos factores. Embora muitos estudos indiquem aumentos na produção de leite com o aumento da quantidade de UDP (OLDHAM *et al.*, 1979; FORSTER *et al.*, 1983; KUNG e HUBER, 1983; SAHLU *et al.*, 1984; SATTER, 1986; VOSS *et al.*, 1988; HIGGINBOTHAM *et al.*, 1989; BRODERICK *et al.*, 1990; MCGUFFEY *et al.*, 1990; NIANOGO *et al.*, 1991; BRODERICK, 1992; HOLTER *et al.*, 1992; GRUMMER *et al.*, 1996; SCHINGOETHE, 1996; VAGNONI e BRODERICK, 1997; WRIGHT *et al.*, 1998; KALSCHEUR *et al.*, 1999; MCCORMICK *et al.*, 1999; O'MARA *et al.*, 2000), outros estudos não observaram nenhuma melhoria (HENDERSON *et al.*, 1985; ROBINSON e KENNELLY, 1988; MÄNTYSAARI *et al.*, 1989; HOFFMAN *et al.*, 1991; ROBINSON *et al.*, 1991; CHRISTENSEN *et al.*, 1993; KEERY e AMOS, 1993; WATTIAUX *et al.*, 1994; BRODERICK, 1996; HENSON *et al.*, 1997; KOMARAGIRI e ERDMAN, 1997; MCCORMICK *et al.*, 1999; BRUCKENTAL *et al.*, 2000; DUNLAP *et al.*, 2000).

SANTOS *et al.* (1998), ao procederem à análise de 108 estudos publicados entre 1985 e 1997, concluíram que o aumento do teor em UDP não melhora consistentemente o desempenho produtivo de vacas leiteiras. Esta discrepância pode ser devida a vários factores: (1) a fracção UDP pode aumentar à custa da diminuição da síntese de proteína

microbiana, seja através da diminuição da MO fermentável ou da fracção RDP, o que não causará nenhuma alteração na proteína disponível para a vaca (ROBINSON e KENNELLY, 1988; MÄNTYSAARI *et al.*, 1989; MCGUFFEY *et al.*, 1990; GRINGS *et al.*, 1991; BRODERICK, 1992; HOLTER *et al.*, 1992; CHRISTENSEN *et al.*, 1993; KEERY e AMOS, 1993; GRUMMER *et al.*, 1994; WATTIAUX *et al.*, 1994; KHORASANI *et al.*, 1996; HENSON *et al.*, 1997; KALSCHEUR *et al.*, 1999); (2) as proteínas que não são degradadas no rúmen podem, também, não ser digeridas no intestino delgado; (3) a qualidade da proteína (*i.e.*, perfil em aminoácidos absorvidos) pode não conter quantidades suficientes de aminoácidos limitantes, sendo, de facto, o perfil em aminoácidos mais importante do que a quantidade de UDP (CHEN *et al.*, 1993; WU *et al.*, 1997), podendo uma dieta com 15% de PB e adequado perfil em aminoácidos para a produção de leite promover igual produção à de uma dieta com 18% de PB, mas com perfil desequilibrado em aminoácidos (BACH *et al.*, 2000); (4) a incorporação na dieta de fontes proteicas suplementares ricas em UDP estimula a produção de leite quando a ingestão de PB é baixa (<14%), mas não quando esta excede os 16% (NOCEK e RUSSELL, 1988); (5) o nível de ingestão pode, *per se*, permitir que uma maior quantidade de proteína escape à fermentação no rúmen nas dietas com baixa quantidade de UDP (WATTIAUX *et al.*, 1994); e (6) à utilização de vacas de baixo potencial genético, de diferente número de lactação (MÄNTYSAARI *et al.*, 1989; HOLTER *et al.*, 1992; KHORASANI *et al.*, 1996) e em diferentes estádios de lactação (PAQUAY *et al.*, 1973; ROBINSON e KENNELLY, 1988; ROBINSON *et al.*, 1991; HOLTER *et al.*, 1992; ARIELI *et al.*, 1996; KALSCHEUR *et al.*, 1999; MCCORMICK *et al.*, 1999). No entanto, como as necessidades em proteína são determinadas pela produção de leite, mesmo vacas no meio da lactação, mas de elevada produção (superior a 33 kg leite dia^{-1}) podem responder à suplementação com UDP (NOCEK e RUSSELL, 1988), permitindo, pelo menos teoricamente, diminuir o teor em PB da dieta, o que representaria uma importante vantagem em termos económicos (BOWMAN *et al.*, 1988).

Com a dieta RL (Experiência 1) a eficiência de conversão da PB da dieta em proteína do leite foi superior e, apesar de o teor em PB da dieta RM (15,7% na MS) ser mais baixo do que o normalmente utilizado na prática, o fornecimento de proteína adicional (RH) não resultou no aumento da produção de leite, pelo que a eficiência de utilização do N da dieta diminuiu, o que é consistente com numerosos estudos (*e.g.*, CRESSMAN *et al.*, 1980; BARNEY *et al.*, 1981a; FORSTER *et al.*, 1983; HA e KENNELLY, 1984; HENDERSON *et al.*, 1985; POLAN *et al.*, 1985; LEONARD e BLOCK, 1988; KALSCHEUR

et al., 1999; BACH *et al.*, 2000; WU e SATTER, 2000) e demonstra o princípio dos acréscimos decrescentes quando a proteína da dieta aumenta acima da quantidade necessária para uma eficiente fermentação ruminal (SATTER e ROFFLER, 1975; CHALUPA, 1984).

A baixa eficiência de conversão da proteína suplementar em proteína do leite parece relacionar-se com a incapacidade da glândula mamária em utilizar aminoácidos adicionais (METCALF *et al.*, 1994). Quando são fornecidas dietas com menor teor em PB a reciclagem de N, para o rúmen, via saliva, aumenta a eficiência de utilização do N e diminui a quantidade de N excretado na urina, ajudando a compensar o défice em proteína, especialmente quando estão disponíveis hidratos de carbono degradáveis para os micróbios do rúmen (SULTAN *et al.*, 1992). Além disso, a interacção bacteriana pode assegurar o fornecimento de substratos por um período longo do ciclo de alimentação (MCALLISTER *et al.*, 1994), o que pode, também, explicar a ausência de interacção entre os NSC e a degradação das proteínas, observada em vários estudos *in vivo* e *in vitro* (HENNING *et al.*, 1991; NEWBOLD e RUST, 1992; MANSFIELD *et al.*, 1994; STERN *et al.*, 1994).

Os resultados obtidos nesta experiência (Experiência 1) demonstram potencial para desenvolver estratégias de alimentação que reduzam a excreção de N nas fezes e na urina, sem comprometer a produção de leite. De facto, os resultados de BARNEY *et al.* (1981a) e de KALSCHEUR *et al.* (1999) (QUADRO 4.10) sugerem que a redução do teor em PB da dieta de vacas no meio ou no final da lactação pode reduzir o custo da dieta e a quantidade de N excretado e HENDERSON *et al.* (1985) referem que, desde que a PB suplementar tenha menor degradabilidade no rúmen, o teor em PB da dieta pode ser diminuído. Além disso, se for atingido um nível de ingestão elevado com menos proteína, como nesta experiência, parece não haver vantagem produtiva em aumentar mais o teor em PB da dieta, indo ao encontro dos resultados obtidos por GORDON (1977) e por SLOAN *et al.* (1988). Não esquecer, ainda, que este ensaio foi de curta duração, logo pode ser insensível para estimar as necessidades em proteína de vacas leiteiras, dada a capacidade destas em mobilizar reservas proteicas (REID *et al.*, 1967).

As dietas utilizadas na Experiência 2 continham um elevado teor em PB, uma vez que as vacas encontravam-se no início da lactação. Neste período as vacas podem necessitar de dietas com um teor em PB superior a 16/18%, uma vez que a ingestão voluntária não é, geralmente, máxima, e a energia mobilizada das reservas corporais juntamente com a proteína extra da dieta podem permitir que a vaca expresse melhor o seu

potencial para a produção de leite (SATTER e ROFFLER, 1975; CLAYPOOL *et al.*, 1980; BRUCKENTAL *et al.*, 1989; PALMQUIST e WEISS, 1994).

Na Experiência 2, as dietas apresentaram diferente degradabilidade da proteína e diferente substrato azotado. A diferente degradabilidade da proteína da dieta não afectou a produção de leite. Estes resultados são consistentes com os obtidos por CHRISTENSEN *et al.* (1993) que forneceram às vacas um alimento completo com 16,4 ou 19,4% de PB com uma degradabilidade da PB no rúmen de 55 ou 70%. Pelo contrário, FORSTER *et al.* (1983) referem um aumento na produção de leite, uma diminuição na percentagem de proteína do leite e um efeito quadrático na percentagem de gordura do leite pela diminuição da degradabilidade da PB de 54 para 43% (dietas com 14% de PB) quando a ingestão de hidratos de carbono disponíveis no rúmen foi similar entre dietas. Todavia, as diferenças observadas no desempenho produtivo podem ser atribuídas, quer a alterações na degradabilidade da PB, quer na taxa de fermentação da MO, bem como ao equilíbrio entre ambas. A degradabilidade da fracção PB pode, ainda, afectar o desempenho através de alterações no fornecimento de aminoácidos específicos (CLARK *et al.*, 1992), enquanto os efeitos da diminuição da degradabilidade da MO podem ser mediados pela variação na partição dos nutrientes energéticos entre o rúmen e o intestino (NOCEK e TAMMINGA, 1991).

Nesta experiência (Experiência 2), a diferente relação QDP/SDP das dietas foi atingida pela substituição, no alimento concentrado, de parte do bagaço de soja por ureia. A utilização de ureia em dietas de vacas leiteiras é justificável pelo facto de o amoníaco ser um nutriente essencial para alguns microrganismos do rúmen (CAPÍTULO 2) e de ser uma fonte de N de menor custo do que as fontes de proteína verdadeira. Embora alguns estudos (WARD *et al.*, 1955; KNOTT *et al.*, 1967; VAN HORN *et al.*, 1967; HOLTER *et al.*, 1968a; VAN HORN *et al.*, 1969; JONES *et al.*, 1975; AITCHISON *et al.*, 1976; KWAN *et al.*, 1977; MAJDOUB *et al.*, 1978; ROFFLER *et al.*, 1978; KUNG e HUBER, 1983; BLAUWIEKEL e KINCAID, 1986; JAQUETTE *et al.*, 1987; CASPER e SCHINGOETHE, 1989; CASPER *et al.*, 1990; OWEN e LARSON, 1991; STOKES *et al.*, 1991; BAKER *et al.*, 1995; CUNNINGHAM *et al.*, 1996; SANNES *et al.*, 2002) sugiram que fontes de N não proteico, altamente solúveis, podem suportar adequada produção de leite, vacas de elevada produção, sobretudo no início da lactação, normalmente, produzem menos leite do que se forem alimentadas apenas com proteína verdadeira (HUBER e SANDY, 1965; VAN HORN *et al.*, 1967; KNOTT *et al.*, 1972; SATTER e ROFFLER, 1975; WOHLT e CLARK, 1978; AHRAR e SCHINGOETHE,

1979; CLARK e DAVIS, 1980; FOLMAN *et al.*, 1981; CASPER e SCHINGOETHE, 1986; DE GRACIA *et al.*, 1989; ROBINSON *et al.*, 1997). Após o pico de produção de leite e de ingestão de MS, a fonte de N parece ser menos crítica (CLARK e DAVIS, 1980; CASPER e SCHINGOETHE, 1986). Contudo, nesta experiência, apesar das vacas se encontrarem no início da lactação, não foram detectadas diferenças na produção de leite.

Como a ureia é uma fonte de N unicamente para os microrganismos do rúmen é de esperar maior utilização da ureia quando as necessidades em N dos microrganismos do rúmen não estão satisfeitas, o que depende da concentração em N amoniacal no rúmen. Com efeito, vários estudos mostraram que a adição de fontes de proteína verdadeira e de N não proteico são equivalentes, apenas, para baixas ingestões de N (*e.g.*, ROFFLER e SATTER, 1975; WOHLT e CLARK, 1978; CLAY e SATTER, 1979; CLARK e DAVIS, 1980; MERRY *et al.*, 1984; TELLER e GODEAU, 1984a e 1984b). Além disso, para uma eficiente utilização do N da ureia pelos microrganismos do rúmen, a dieta deve veicular hidratos de carbono rapidamente fermentáveis diferindo, ainda, o efeito da natureza do N fornecido de acordo com a produção de leite, a ingestão de MS e a forragem de base (MERCHEN e SATTER, 1983; BRODERICK *et al.*, 1993). No trabalho de JAQUETTE *et al.* (1987), quando 20% do N da dieta era ureia, a fonte de N não teve efeito nas vacas multíparas, mas nas primíparas diminuiu a produção de leite. No nosso estudo, os valores de concentração plasmática de ureia observados não diferiram entre dietas, o que sugere que o N da ureia foi eficientemente utilizado pelos microrganismos do rúmen para o seu crescimento.

A composição do leite na Experiência 2 não foi afectada pelo tratamento. CASPER e SCHINGOETHE (1989) observaram um aumento na percentagem de proteína do leite devida ao aumento da fracção de N não proteico em vacas alimentadas com dietas com ureia, enquanto outros não observaram qualquer alteração (HUBER e KUNG, 1981; KUNG e HUBER, 1983; CASPER e SCHINGOETHE, 1986), tendo HUBER e KUNG (1981) observado uma diminuição. Nas comparações, realizadas por SANTOS *et al.* (1998), de trabalhos publicados nos quais foi adicionada ureia entre 0,4 e 1,8% da MS da dieta, tendo a ureia substituído parcial ou totalmente bagaço de soja, drêches de cevada, bagaço de soja expandido, bagaço de soja + farinha de peixe ou subprodutos de origem animal, a produção de leite não foi afectada significativamente em 20 e diminuiu em três; a produção de leite corrigida para o teor em gordura não foi afectada em 14, mas diminuiu em seis; e a percentagem de proteína do leite não foi afectada em 17, aumentou em cinco e diminuiu num. A eficiência de conversão da PB ingerida em proteína do leite foi significativamente

afectada pela dieta, tendo sido o menor valor observado com a dieta U10, reflectindo o seu maior teor em PB. BRODERICK e SATTER (1990; citados por CHRISTENSEN *et al.*, 1993) sugeriram que a produção e a percentagem de proteína do leite podem ser usadas como indicadores do défice em aminoácidos para vacas leiteiras. Nesta experiência não foram observadas alterações nestes parâmetros, o que sugere que a síntese de proteína do leite não foi limitada por défice em aminoácidos ou foi limitada em igual extensão por um ou mais aminoácidos em todas as dietas.

Alguns estudos mostram que dietas formuladas para um fornecimento mais sincronizado de N e de energia ao rúmen aumentam significativamente a síntese de proteína microbiana e a eficiência de síntese de proteína microbiana, enquanto outros não revelam qualquer benefício (CAPÍTULO 3). De modo a evitar os efeitos confusos de diferentes ingredientes da dieta, apenas o padrão de alimentação do CPr foi alterado na Experiência 3 e, embora os tratamentos não tenham afectado a ingestão de MS, a produção de leite foi significativamente inferior com a dieta menos sincronizada. Uma resposta positiva de vacas leiteiras à sincronização das disponibilidades de energia e de N no rúmen foi referida em alguns estudos (BLAUWIEKEL e KINCAID, 1986; CASPER e SCHINGOETHE, 1986; HERRERA-SALDANA *et al.*, 1990), mas não em outros (CASPER e SCHINGOETHE, 1989; MCCARTHY et al., 1989; CASPER *et al.*, 1990; DEPETERS e CANT, 1992; ROBINSON e MCQUEEN, 1994; CASPER *et al.*, 1999). Este efeito contraditório pode dever-se ao estádio de lactação das vacas, na medida em que este determina as suas necessidades em aminoácidos (CASPER *et al.*, 1999), e ao facto das dietas mais sincronizadas poderem aumentar o fluxo de N microbiano para o duodeno, devido à maior extensão da fermentação dos alimentos no rúmen, mas as menos sincronizadas, sobretudo se promovem maior ingestão voluntária, poderem aumentar o fluxo de N proteico para o duodeno e desviar a digestão do amido do rúmen para o duodeno (MCCARTHY *et al.*, 1989).

Ao contrário do observado na Experiência 3, KOLVER *et al.* (1998), ao alterarem simplesmente o momento de distribuição do alimento concentrado, demonstraram que a dieta sincronizada promoveu consistentemente menores concentrações de amoníaco no rúmen, mas não teve efeito significativo na produção de leite. Contudo, se a frequência de alimentação de toda a dieta ou dos hidratos de carbono rapidamente fermentáveis é alterada, provoca, em geral, efeitos pronunciados no pH do rúmen e na composição molar de AGV. Como estes factores podem influenciar o crescimento microbiano, é sugerido que

a alteração do padrão de alimentação da componente proteica das dietas, é o melhor método para testar a hipótese da sincronização das disponibilidades de nutrientes no rúmen, segundo CHAMBERLAIN e CHOUNG (1995). ROBINSON *et al.* (1997 e 2002) observaram maior digestão ruminal da MO, menor quantidade de proteína da dieta que escapou à degradação no rúmen, concentrações mais estáveis de AGV totais e de amoníaco e maior teor em gordura e energia no leite quando o suplemento proteico (47,4% PB) foi fornecido durante a noite do que durante o dia, não observando diferenças na produção de leite e nas proporções de aminoácidos na proteína duodenal.

Os resultados aqui obtidos vão ao encontro da afirmação de CHAMBERLAIN e CHOUNG (1995), ou seja, parece que a estreita sincronização de libertação de energia e de N só traz, apenas, pequenos, se alguns, benefícios na maioria das condições práticas, a não ser que o crescimento microbiano seja limitado pelas disponibilidades de hidratos de carbono fermentáveis ou de amoníaco. Neste caso, a reciclagem de ureia para o rúmen e a interacção bacteriana, já referidos anteriormente, podem atenuar o efeito de dietas assíncronas.

4.6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que dietas com baixa relação ERDP/FME, mas que satisfaçam as necessidades em MP, promovem menores ingestão de MS e produção de leite, pelo que podem desempenhar um papel importante no quadro actual de restrição da produção de leite por défice de quota, ao permitir controlar a produção de leite das vacas sem fazer com que estas engordem em demasia. Mas, pelo contrário, o fornecimento de RDP em excesso em relação à quantidade de FME fornecida pela dieta e utilizável pelos microrganismos do rúmen não aumentou a ingestão de MS, nem a produção de leite, em vacas no meio da lactação e aumentou a concentração plasmática de ureia, levando a um desperdício de RDP e contribuindo para problemas de poluição ambiental. Ficou, também, uma vez mais, demonstrado, que parte da proteína de origem vegetal da dieta pode ser substituída por N não proteico (ureia), sem acarretar efeitos adversos na produtividade de vacas no início da lactação, desde que seja garantido o fornecimento de hidratos de carbono rapidamente fermentáveis na dieta. A sincronização das disponibilidades de N e de energia para os microrganismos do rúmen, de vacas no meio da lactação, aumentou a produção de leite, provavelmente, via um aumento da síntese de proteína microbiana.

Contudo, estes efeitos foram, apenas, observados com dietas e estratégias de alimentação extremas, pelo que se conclui que a tentativa de conciliar a libertação de N e de energia no rúmen pode não produzir grandes benefícios em condições práticas de alimentação.

As maiores concentrações urinárias de alantoína e de creatinina nas amostras de urina recolhidas nas vacas alimentadas com dietas com menor teor em proteína (RL, DU, D2 e D1), bem como a diminuição destes parâmetros à medida que aumentou a frequência de distribuição do CPr na Experiência 3, sugerem que o volume de urina produzido aumenta, quer com a ingestão de N, quer com o aumento do assincronismo entre as disponibilidades de energia e de N no rúmen.

A relação A/c em amostras de urina não permitiu, neste trabalho, identificar diferenças antecipadas no fluxo de proteína microbiana para o duodeno, tendo, também, sido observada variação diurna na excreção urinária de creatinina. Assim sendo, os resultados obtidos sugerem que para se estimar o fluxo de proteína microbiana para o duodeno através da excreção de DP na urina, em vacas leiteiras, a recolha da totalidade de urina excretada não pode ser evitada, sendo, portanto, necessário desenvolver sistemas que o permitam fazer com rigor e facilidade.

"Recent interest in less-invasive techniques has been fuelled by welfare concerns about the use of fistulated animals in developed countries as well as the ease of application of these techniques in developing countries. Less invasive experimental approaches also offer potential for the development of novel diagnostics that could predict microbial synthesis in an individual feeding situation." (DEWHURST *et al.*, 2000a).

CAPÍTULO 5

A Utilização do Perfil em Ácidos Gordos do Leite como Técnica Não Invasiva de Diagnóstico da Função Ruminal

5.1. INTRODUÇÃO

Nos capítulos anteriores ficou patente a importância da função ruminal na eficiência de utilização dos alimentos ingeridos e na produtividade da vaca leiteira, o que torna essencial o seu diagnóstico. Neste contexto, as crescentes preocupações com o bem-estar animal e o facto dos resultados obtidos em condições experimentais não serem sempre transponíveis para as situações da prática corrente, impõem a necessidade de desenvolvimento de técnicas menos invasivas e, sobretudo, não invasivas passíveis de serem aplicadas em animais não modificados cirurgicamente e em condições normais de exploração. Ou seja, metodologias que possam servir de base ao desenvolvimento de testes rápidos de diagnóstico do maneio alimentar, nas explorações leiteiras.

Nos últimos anos, os estudos sobre o metabolismo dos lípidos no rúmen têm-se centrado, sobretudo, em dois grandes objectivos: (1) utilização de suplementos de gordura que evitem efeitos adversos na função ruminal (*e.g.*, GRUMMER, 1991; HOFFMAN *et al.*, 1991; JENKINS, 1993; CHILLIARD *et al.*, 2001a e 2001b; WARD *et al.*, 2002); e (2) maximização do fluxo de ácidos gordos poli-insaturados (PUFA) para o duodeno, tais como o ácido linoleico conjugado (CLA), que se crêem benéficos para a saúde humana (*e.g.*, MCGUIRE *et al.*, 1997; PARODI, 1997; BAUMAN *et al.*, 1998; KELLY *et al.*, 1998a e 1998b; LOOR e HERBEIN, 1998; CHOUINARD *et al.*, 1999; DHIMAN *et al.*, 1999; BESSA *et*

al., 2000; KIM *et al.*, 2000; BOLAND *et al.*, 2001; LOOR e HERBEIN, 2001; WHITE *et al.*, 2001; BEAULIEU *et al.*, 2002; LOOR *et al.*, 2002; MARTIN e JENKINS, 2002; WARD *et al.*, 2002; LOOR e HERBEIN, 2003).

Embora os efeitos da produção de AGV no rúmen na síntese *de novo* de ácidos gordos de cadeia curta e média (C_4 a C_{14}) no leite de vaca sejam bem conhecidos (*e.g.*, MCCARTHY e SMITH, 1969; SMITH e MCCARTHY, 1969; PALMQUIST, 1976; DAVIS e COLLIER, 1985; GRUMMER, 1991; FREDEEN, 1996; NEVILLE e PICCIANO, 1997; CHILLIARD *et al.*, 2000), outras relações entre a função ruminal e os ácidos gordos do leite não foram, ainda, suficientemente elucidadas. No CAPÍTULO 4 mostrámos que a relação A/c, em amostras de urina, não permitiu identificar diferenças no fluxo de proteína microbiana para o duodeno, tendo, também, ficado claro que a excreção de alantoína no leite não é passível de ser utilizada com este objectivo. Consequentemente, será necessário mais trabalho que permita desenvolver um teste de diagnóstico da função ruminal baseado em amostras de leite. Recentemente, VLAEMINK *et al.* (2003) verificaram existir uma tendência para que o fluxo de N microbiano, estimado através da excreção diária de alantoína na urina, se relacionasse com a excreção de ácidos gordos de cadeia ímpar no leite de vaca ($r = 0,434$, $P = 0,093$), tendo esta correlação atingido a significância quando corrigida para diferenças no teor em gordura das dietas ($r = 0,599$, $P = 0,018$).

A aproximação por nós aqui seguida consistiu em avaliar o potencial de utilização do perfil em ácidos gordos do leite: (1) como metodologia não invasiva de descrição da função ruminal (em termos de populações microbianas, de substratos e de interacções); e (2) que servisse de guia de estratégias de alimentação azotada ao nível da exploração. Conquanto o nosso enfoque inicial tenha sido o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite, ácidos gordos que se crêem de origem microbiana, não deixámos de considerar, na avaliação que fizémos, o perfil dos de cadeia par. Assim, utilizando amostras recolhidas nas três experiências descritas no CAPÍTULO 4, avaliámos os efeitos de diferentes estratégias de suplementação azotada de silagens de milho no perfil em ácidos gordos do leite de vaca. A análise de factores (*principal component factor analysis*) e a análise discriminativa canónica foram utilizadas como ferramentas de auxílio no estudo e na avaliação do potencial desta técnica.

5.2. SITUAÇÃO DOS CONHECIMENTOS

Os ácidos gordos do leite têm duas origens principais: os ácidos gordos com 12 ou menos átomos de carbono, a maior parte do ácido mirístico ($C_{14:0}$) e 50% do ácido palmítico ($C_{16:0}$) são sintetizados na glândula mamária; e uma pequena parte do ácido mirístico ($C_{14:0}$), 50% do ácido palmítico ($C_{16:0}$) e todos os ácidos gordos com 18 ou mais átomos de carbono são extraídos do sangue arterial (*ca* 60%) (*e.g.*, JENKINS, 1993; ENJALBERT *et al.*, 1998; CHILLIARD *et al.*, 2000 e 2001a; CLEGG *et al.*, 2001; FIGURA 5.1). Os ácidos gordos sintetizados na glândula mamária ou extraídos do sangue são, depois, incorporados nos triglicéridos do leite (ENJALBERT *et al.*, 1998).

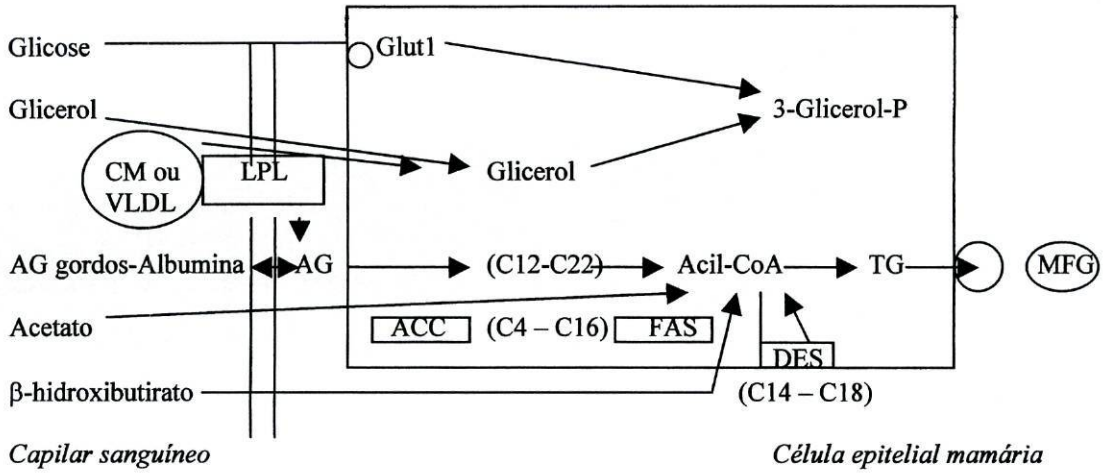


FIGURA 5.1 – Representação esquemática da síntese e da secreção da gordura do leite em animais ruminantes.
ACC = Acetil-CoA carboxilase; CM = Quilomicron; DES = Δ^9-desaturase; AG = Ácido gordo; Glut1 = Transportador de glucose 1; LPL = Lipoproteína lipase; MFG = Glóbulo de gordura do leite; TG = Triglicérido; VLDL = Lipoproteína de muito baixa densidade.
ADAPTADO DE CHILLIARD *et al.* (2000).

Deste modo, sendo a síntese *de novo*, na glândula mamária, limitada a ácidos gordos de cadeia curta e média, a taxa de síntese de ácidos gordos nesta glândula está dependente do fornecimento simultâneo de ácidos gordos exógenos (DEMEYER e DOREAU, 1999). Os precursores dos ácidos gordos de cadeia curta e média permaneceram duvidosos até POPJAK *et al.* (1951a e 1951b) mostrarem que o acetato é o precursor de todos os ácidos gordos de cadeia curta e média e de cerca de metade do ácido palmítico ($C_{16:0}$), sendo a síntese *de novo* dos ácidos gordos feita a partir do acetato e, em menor extensão, do β-hidroxibutirato (PALMQUIST *et al.*, 1969; GRUMMER, 1991; CHILLIARD, 1993; JENKINS, 1993; CHILLIARD *et al.*, 2000). O acetato sanguíneo, para além de provir da fermentação

microbiana no tubo digestivo, pode, também, derivar de fontes endógenas, em particular do metabolismo dos ácidos gordos no fígado (BAIRD *et al.*, 1974; COSTA *et al.*, 1976).

A glândula mamária remove acetato do sangue, sendo 29 a 47% do acetato removido oxidado (BICKERSTAFFE *et al.*, 1974) e o restante utilizado na síntese de ácidos gordos com comprimento de cadeia até 16 átomos de carbono (MOORE e CHRISTIE, 1981). O β-hidroxibutirato do sangue deriva, sobretudo, da transformação do butirato durante a sua absorção através da parede do rúmen (LENG e WEST, 1969), podendo a produção endógena ser substancial em situações de cetose (DAVIS e COLLIER, 1985). A síntese de aproximadamente metade dos ácidos gordos com quatro a 12 átomos de carbono sintetizada na glândula mamária pode ser iniciada com o β-hidroxibutirato (PALMQUIST *et al.*, 1969; PALMQUIST, 1976), embora grande parte deste composto capturado pela glândula mamária seja dividida em duas unidades de carbono, antes de ser incorporada nos ácidos gordos (BINES e BROWN, 1968; PALMQUIST *et al.*, 1969) ou oxidada (DAVIS e COLLIER, 1985).

A principal via metabólica da síntese *de novo* de ácidos gordos na glândula mamária (FIGURA 5.1) envolve duas enzimas-chave: a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido gordo sintase (FAS). A ACC catalisa a formação de malonil-CoA a partir do acetato e a FAS catalisa os ciclos de condensação do malonil-CoA com o acetil-CoA ou com o butiril-CoA, os quais têm origem, respectivamente, no metabolismo do acetato e do β-hidroxibutirato. A reacção de terminação da cadeia produz ácido mirístico ($C_{14:0}$) e, predominantemente, ácido palmítico ($C_{16:0}$) e é catalisada na maioria dos tecidos e das espécies pela actividade tiosterase intrínseca da FAS (tiosterase I). A FAS da glândula mamária dos ruminantes exibe transacilase com actividade de adição e de libertação das cadeias acil de dois ou 12 carbonos de comprimento de cadeia (CHILLIARD *et al.*, 2000 e 2001a). A expressão da FAS diminui até níveis não detectáveis durante o jejum, sendo regulada pela insulina e mediada pela via do fosfatidilinositol (PI) – quinase (SUL *et al.*, 2000).

Os ésteres gordos acil-CoA inibem a ACC no tecido adiposo e na glândula mamária e tem sido demonstrado, com células epiteliais de glândula mamária de vaca e de cabra, que os ácidos gordos sintetizados a partir do acetato (C4-C16) são incorporados nos triglicéridos do leite dependendo do tipo e da quantidade de ácidos gordos exógenos. Por exemplo, o ácido palmítico ($C_{16:0}$) estimula a síntese e a incorporação dos ácidos gordos sintetizados, enquanto os ácidos esteárico ($C_{18:0}$) e linoleico ($C_{18:2}$) são inibidores (HANSEN

e KNUDSEN, 1987). A ACC é a enzima limitante para a síntese *de novo* de ácidos gordos na glândula mamária (MELLENBERGER *et al.*, 1973). Os PUFA da dieta suprimem o teor hepático de FAS e as proteínas ACC (TOUSSANT *et al.*, 1981), mas, provavelmente, os PUFA da dieta não são suficientes, *per se*, para induzir a depressão da gordura do leite sendo necessárias, para que esta ocorra, alterações no ambiente ruminal (KALSCHEUR *et al.*, 1997a e 1997b). A maior parte dos ácidos gordos sintetizados *de novo* são saturados ($C_{4:0}$ a $C_{16:0}$) porque a actividade da Δ^9-desaturase para ácidos gordos de comprimento de cadeia inferior a 18 carbonos é baixa, embora uma pequena proporção de ácido mirístico ($C_{14:0}$) e de ácido palmítico ($C_{16:0}$) seja insaturada a ácido miristoleico ($C_{14:1}$) e a ácido palmitoleico ($C_{16:1}$; MASSART-LEËN *et al.*, 1974). Contudo, a actividade desaturase no intestino e na glândula mamária compensa a extensa biohidrogenação que ocorre no rúmen e, provavelmente, assegura a fluidez suficiente da gordura do leite para a secreção eficiente da célula mamária (GRUMMER, 1991).

Os lípidos sanguíneos podem provir da digestão da gordura da dieta ou da mobilização dos ácidos gordos do tecido adiposo (GRUMMER, 1991; BAUCHART, 1993; CHILLIARD, 1993). Cerca de três quartos dos ácidos gordos absorvidos são capturados pela glândula mamária (PALMQUIST e MATTOS, 1978), sendo a hidrólise dos triglicéridos, dos *quilomicrons* e das lipoproteínas plasmáticas catalisada pela lipoproteína lipase (LPL) no endotélio capilar da glândula mamária (DAVIS e COLLIER, 1985; GRUMMER, 1991; CHILLIARD *et al.*, 2000; CLEGG *et al.*, 2001), cuja actividade é elevada nos animais ruminantes em lactação (CHILLIARD *et al.*, 2000). Os ácidos gordos mobilizados do tecido adiposo são inicialmente complexados com a albumina e podem ser utilizados em vários tecidos, incluindo a glândula mamária. Contudo, o seu maior destino é a captura hepática. Os ácidos gordos que entram no fígado podem ser oxidados ou esterificados, sobretudo, com o glicerol para formar triglicéridos que podem ser armazenados ou exportados como parte de lipoproteínas de muito baixa densidade (GRUMMER, 1991), tendo sido sugerido ser este o principal mecanismo de transporte dos ácidos gordos mobilizados para a glândula mamária no início da lactação (PUPPIONE *et al.*, 1973).

Ao contrário dos outros tecidos dos ruminantes, a glândula mamária do animal em lactação não é capaz de converter o ácido palmítico ($C_{16:0}$) em ácido esteárico ($C_{18:0}$) por alongamento da cadeia (CHILLIARD *et al.*, 2001a). Contudo, células secretoras diferenciadas da glândula mamária exprimem elevada actividade Δ^9-desaturase que converte o ácido esteárico ($C_{18:0}$) em ácido oleico (*cis* 9 $C_{18:1}$) (KINSELLA, 1972; COLLOMB

et al., 1999; CHILLIARD *et al.*, 2001a), o que reflecte um mecanismo adaptativo que permite que os ruminantes utilizem predominantemente ácidos gordos saturados que são absorvidos no intestino (CHILLIARD, 1993). Cerca de 40% do ácido esteárico ($C_{18:0}$) capturado é insaturado na glândula mamária, contribuindo com mais de 50% do ácido oleico ($C_{18:1}$) que é secretado na gordura do leite (ENJALBERT *et al.*, 1998).

Como os ácidos gordos de cadeia longa podem ser directamente incorporados na gordura do leite, aumentando a eficiência metabólica, e, tendo importantes implicações para vacas leiteiras sujeitas a temperaturas elevadas, uma vez que será produzido menos calor metabólico do que seria se os ácidos gordos fossem sintetizados *de novo* a partir do acetato (COPPOCK e WILKS, 1991), é possível alterar a relação entre os ácidos gordos de cadeia curta e longa, bem como o grau de saturação da gordura do leite. No entanto, na prática, a capacidade de alterar o perfil em ácidos gordos do leite é limitada, não só pela capacidade sintética da glândula mamária, mas, também, pelo desafio de conseguir uma protecção efectiva dos ácidos gordos da dieta insaturados da biohidrogenação no rúmen, bem como de manter o nível de PUFA dentro de limites em que a qualidade organoléptica e a conservação do leite e dos produtos lácteos não fiquem comprometidas (KENNELLY, 1996).

Com efeito, as lipases extracelulares dos microrganismos degradam os glicolípidos, fosfolípidos e triglicéridos da dieta originando ácidos gordos que são extensamente hidrogenados (FIGURA 5.2; JENKINS, 1993; HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997; DEMEYER e DOREAU, 1999; CHILLIARD *et al.*, 2000; SAUVANT e BAS, 2001). O glicerol libertado é fermentado a AGV, sobretudo a ácido propiónico (GARTON *et al.*, 1961). Os ácidos gordos livres não são oxidados no rúmen dadas as condições de anaerobiose neste compartimento (CHILLIARD *et al.*, 2000; SAUVANT e BAS, 2001). As estirpes bacterianas *Anaerovibrio lipolytica* (HENDERSON e HODGKISS, 1973) e *Butyrivibrio fibrisolvens* são estirpes lipolíticas bem conhecidas (JENKINS, 1993), sendo o *Butyrivibrio fibrisolvens* o microrganismo mais numeroso responsável pela biohidrogenação (KEPLER *et al.*, 1966; KEPLER e TOVE, 1967; LATHAM *et al.*, 1972). A biohidrogenação tem sido, também, atribuída a *Fusocillus* sp. e a *Ruminococcus* sp. (KEMP *et al.*, 1975). Os protozoários não possuem, provavelmente, actividade lipolítica (GIRARD e HAWKE, 1978), mas, aparentemente, são os principais microrganismos do rúmen que fazem a biohidrogenação do ácido oleico ($C_{18:1}$) a ácido esteárico ($C_{18:0}$; GUTIERREZ *et al.*, 1962). Embora o processo evolutivo seja ainda debatido, não há dúvida de que a ocorrência de biohidrogenação

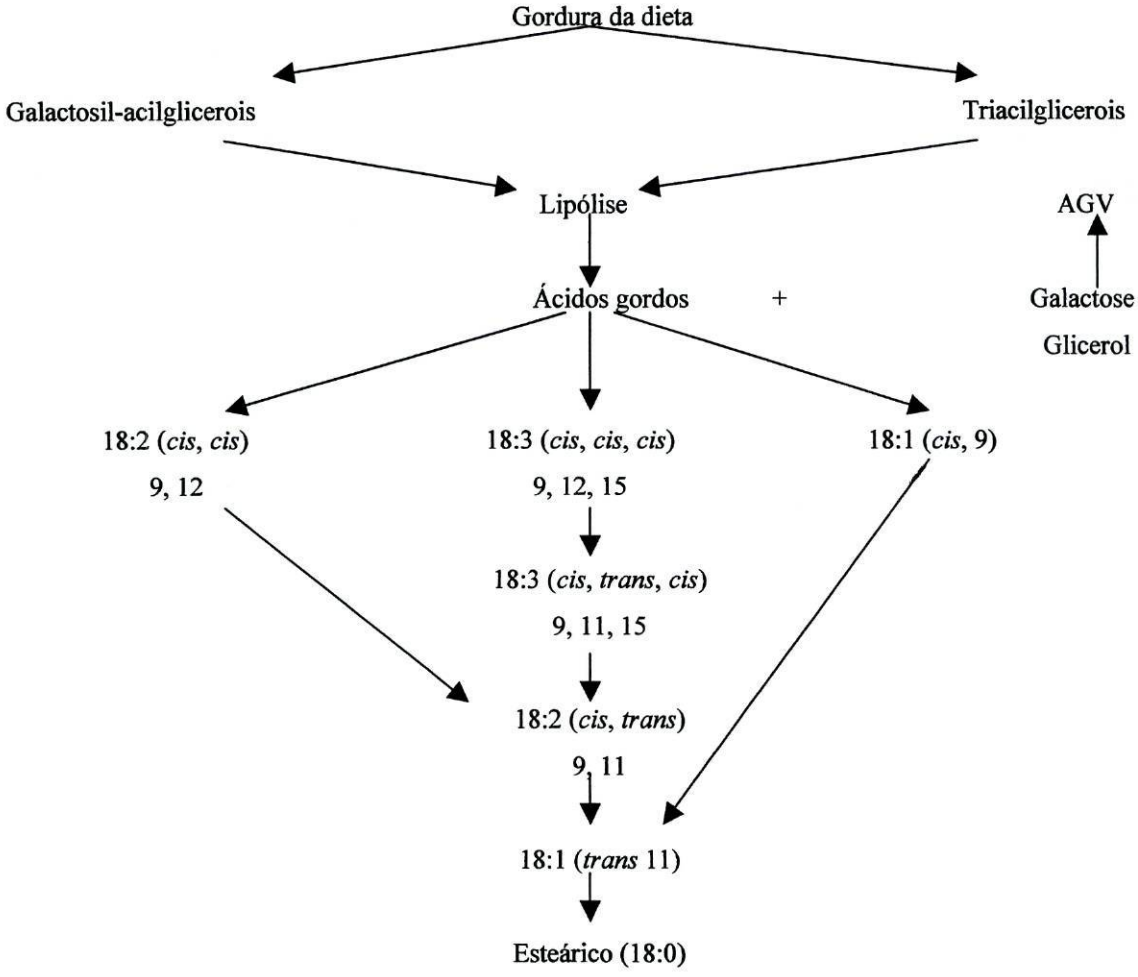


FIGURA 5.2 – Representação esquemática da lipólise e da biohidrogenação da gordura da dieta pelos microrganismos do rúmen.
ADAPTADO DE SCOTT e ASHES (1993).

permite proteger os micróbios dos efeitos tóxicos dos ácidos gordos insaturados (JENKINS, 1993), sendo a actividade lipolítica inibida a valores de pH inferiores a 6 (VAN NEVEL e DEMEYER, 1996).

Os ácidos gordos libertados pela lipólise são adsorvidos às partículas onde são hidrogenados e/ou incorporados na fracção lipídica das bactérias (DEMEYER e DOREAU, 1999). O equilíbrio entre estes dois processos é um dos factores que determina a extensão da biohidrogenação dos ácidos gordos no rúmen (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997). A hidrólise dos lípidos complexos da dieta é necessária antes de ocorrer a isomerização, pois esta depende de um grupo carboxilo livre (HAWKE e SILCOOK, 1970; JENKINS, 1993 e 1994). Os PUFA são primeiro isomerizados e depois hidrogenados. As isomerases transformam as ligações etilénicas *cis* em ligações *trans* (CHILLIARD *et al.*, 2000; SAUVANT

e BAS, 2001) e as redutases saturam essas ligações (SAUVANT e BAS, 2001). A biohidrogenação no rúmen dos ácidos linoleico ($C_{18:2}$) e linolénico ($C_{18:3}$) é, em muitos casos, extensa (CHILLIARD *et al.*, 2000), sendo, em média de 80 e 92%, respectivamente, podendo a menor biohidrogenação do ácido linoleico ($C_{18:2}$) explicar-se por uma incorporação parcial nas bactérias (BAUCHART *et al.*, 1990), mas, também, pelo facto das vias bioquímicas serem diferentes (HARFFOT e HAZLEWOOD, 1997). Aparentemente, nenhuma espécie de microrganismo leva a cabo toda a sequência de biohidrogenação (KELLY *et al.*, 1998a). A redução do *trans* $C_{18:1}$ é, geralmente, uma etapa limitante à biohidrogenação completa dos ácidos gordos insaturados com 18 átomos de carbono, induzindo uma acumulação dos *trans* $C_{18:1}$ no rúmen (CHILLIARD *et al.*, 2001a). A etapa final de conversão dos ácidos octadecenóicos em ácido esteárico ($C_{18:0}$) não é catalisada pelas enzimas microbianas, mas sim pelas enzimas do próprio animal (LEDOUX *et al.*, 2000).

Ao contrário do que inicialmente era aceite, a biohidrogenação ocorre, também, nos ácidos gordos com 20 e 22 átomos de carbono (ASHES *et al.*, 1992; DOREAU e CHILLIARD, 1997; VAN NEVEL *et al.*, 1999; CHILLIARD *et al.*, 2000). O desaparecimento do ácido eicosapentanóico ($C_{20:5}$) e do ácido docosahexanóico ($C_{22:6}$) é extensa, mas, geralmente, estes ácidos gordos não se tornam completamente saturados (CHILLIARD *et al.*, 2000).

A biohidrogenação dos ácidos gordos libertados pela população microbiana leva a uma redução de 70 a 90% dos PUFA e a sua transformação em ácidos gordos saturados, sobretudo ácido esteárico ($C_{18:0}$), ou a isomeros *trans* de ácidos gordos mono-insaturados (PALMQUIST e JENKINS, 1980; FERLAY *et al.*, 1992). Embora os produtos finais da biohidrogenação sejam diversos, os predominantes são o ácido esteárico ($C_{18:0}$; 80%) e o ácido *trans* 11 octadecenóico (*trans* 11 $C_{18:1}$; 12%) (BICKERSTAFFE *et al.*, 1972).

A biohidrogenação é reduzida com dietas com baixo teor em N (GERSON *et al.*, 1982 e 1983) e elevado teor em amido, processo relacionado com a diminuição do pH do rúmen que diminui o número de bactérias lipolíticas, limitando a biohidrogenação e, também, em primeiro lugar, a lipólise (LATHAM *et al.*, 1972; GERSON *et al.*, 1985; PALMQUIST e SCHANBACHER, 1991; KOBAYASHI *et al.*, 1992; JENKINS, 1993; DOREAU e FERLAY, 1994; CHILLIARD *et al.*, 2001a; SAUVANT e BAS, 2001). LATHAM *et al.* (1972) referiram que a biohidrogenação do 18:3 (n-3) e do 18:2 (n-6) nas dietas pobres em fibra foi 59 e 63%, respectivamente, das dietas ricas em fibra e atribuíram esta alteração a redução de *ca* 90% do número de *Butyrivibrio fibrisolvens*. O número reduzido de

bactérias lipolíticas com dietas com elevada percentagem de amido (situação de pH baixo) parece explicar a menor capacidade de biohidrogenação, uma vez que, como já referido, é necessário um grupo carboxilo livre nos ácidos gordos para a etapa inicial da biohidrogenação.

Nas dietas com elevada inclusão de alimentos concentrados outros factores, além do pH, provavelmente relacionados com a população microbiana devem afectar a biohidrogenação no rúmen (GERSON *et al.*, 1985), nomeadamente o tamanho de partícula. A influência do tamanho de partícula, de acordo com GERSON *et al.* (1988), não é causada pela diminuição do pH, como sugerido para as dietas ricas em alimentos concentrados, ou pela concentração de AGV ou disponibilidade de N, mas sim pelo número reduzido de bactérias aderentes a pequenas partículas de alimento. Também reduções no número de protozoários ciliados (CHALUPA *et al.*, 1967) e a maior maturidade da forragem (GERSON *et al.*, 1986) se têm associado com a diminuição da biohidrogenação. SAUVANT e BAS (2001) referem que a eficiência de biohidrogenação está significativa e positivamente relacionada com a relação acetato/propionato no rúmen e negativamente relacionada com a eficiência de crescimento microbiano e a proporção de alimentos concentrados nas dietas. Assim, a biohidrogenação de ácidos gordos da dieta parece ser menos eficiente em dietas ricas em alimentos concentrados, promovendo um crescimento microbiano mais intenso e uma fermentação ruminal mais favorável ao ácido propiónico. É possível que a fermentação propiónica, que utiliza hidrogénio, entre em competição com a biohidrogenação dos lípidos no rúmen (SAUVANT e BAS, 2001). Apesar de alguns estudos apontarem para que a percentagem de biohidrogenação não dependa da natureza e da quantidade de ácidos gordos ingeridos, mas, sim, da percentagem de alimento concentrado na dieta, o estudo efectuado por NOBLE *et al.* (1974) demonstra que existem diferenças na biohidrogenação consoante os ácidos gordos administrados estejam na forma livre ou esterificados. Nesse estudo, quando o conteúdo ruminal foi incubado *in vitro* com trilinoleína a biohidrogenação foi sempre superior do que quando quantidades aproximadamente iguais de ácido linoleico ($C_{18:2}$) foram adicionadas.

O leite de vaca contém, também, quantidades significativas de ácido pentadecanóico ($C_{15:0}$), ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) e ácido heptadecenóico ($C_{17:1}$), bem como isomeros de cadeia ramificada *iso* $C_{15:0}$ (ácido 13-metil-tetradecanóico), *anteiso* $C_{15:0}$ (ácido 12-metil-tetradecanóico), *iso* $C_{17:0}$ (ácido 15-metil-hexadecanóico) e *anteiso* $C_{17:0}$ (ácido 14-metil-hexadecanóico) (DEWHURST *et al.*, 2000b). Tem sido proposto que os

ácidos gordos de cadeia ímpar do leite derivam dos ácidos gordos dos microrganismos do rúmen (MASSART-LEËN *et al.*, 1983; O'KELLY e SPIERS, 1991; JENKINS, 1993; BARREFORS *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1999), embora o $C_{17:1}$ não tenha sido detectado em culturas puras de bactérias do rúmen (BAE *et al.*, 2000). Com efeito, os ácidos gordos de cadeia ramificada representam mais de 5% do total de ácidos gordos das bactérias (MASSART-LEËN *et al.*, 1983; O'KELLY e SPIERS, 1991; JENKINS, 1993; LEE *et al.*, 1999; BAS *et al.*, 2003) e os distintos perfis em ácidos gordos nos lípidos microbianos têm sido utilizados para identificar classes particulares de bactérias (*e.g.*, tipo Gram; BASILE *et al.*, 1995) ou para avaliar o grau de homogeneidade de diferentes estirpes de bactérias (DZIERZEWICZ *et al.*, 1996). Os ácidos gordos individuais têm, também, sido utilizados como marcadores de bactérias e de fungos no solo (BARDGETT e HOBBS, 1996).

A origem microbiana dos ácidos gordos de cadeia ímpar e o teor significativo desses ácidos gordos no leite, juntamente com o facto dos ácidos gordos de cadeia ímpar não terem sido detectados nas plantas (DIEDRICH e HENSCHEL, 1990), levaram DEWHURST *et al.* (2000a) a propor que a sua determinação no leite pode fornecer, pelo menos, uma descrição qualitativa da síntese microbiana no rúmen. Além disso, como se pode observar no QUADRO 5.1, o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada dos micróbios do rúmen é distinto, suportando a hipótese de estes ácidos gordos poderem ser utilizados como marcadores biológicos da população microbiana do rúmen. Note-se que estes ácidos gordos têm sido utilizados como marcadores para a ingestão de gordura de animais ruminantes, quer por animais (ROJAS *et al.*, 1994), quer por humanos (WOLK *et al.*, 1998; SMEDMAN *et al.*, 1999). Nesta matéria, SAUVANT e BAS (2001) colocaram, também, a hipótese de níveis elevados de ingestão de proteína verdadeira degradável no rúmen poderem aumentar o teor em ácidos gordos de cadeia ramificada (*iso* $C_{15:0}$, *anteiso* $C_{15:0}$,

QUADRO 5.1 – Teores em ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada de algumas bactérias do rúmen.

	$C_{15:0}$	*anteiso* $C_{15:0}$	*iso* $C_{15:0}$	$C_{17:0}$	*iso* $C_{17:0}$
Selenomonas ruminantium HD4	9,23	3,63	7,32	1,83	1,97
Streptococcus bovis 26	8,88	5,02	3,79	3,98	0,97
Ruminococcus flavefaciens 17	8,16	9,04	19,01	3,07	8,44
Ruminococcus albus J6	6,18	4,96	10,81	3,32	2,00
Prevotella ruminocola brevis B14	13,4	14,80	10,77	1,92	3,95
Prevotella albensis M384	8,29	23,18	11,55	0,88	3,38
P	NS	<0,001	<0,05	<0,05	<0,001

ADAPTADO DE BAE *et al.* (2000).

iso $C_{17:0}$ e *anteiso* $C_{17:0}$) do leite através do fornecimento de maiores quantidades de precursores de cadeia ramificada (*i.e.*, aminoácidos) aos microrganismos do rúmen. Além disso, foi demonstrado que o perfil em ácidos gordos das bactérias do rúmen e, consequentemente, o perfil em ácidos gordos do leite são afectados pelo teor em NDF e pelo nível de forragem na dieta (DEWHURST *et al.*, 2000b e 2002; VLAEMINK *et al.*, 2002; BAS *et al.*, 2003). Finalmente, uma razão adicional para o interesse, *per se*, nos ácidos gordos de cadeia ímpar do leite foi fornecida por trabalho recente que sugeriu possíveis efeitos anticancerígenos do ácido 13-metil-tetradecanóico (*iso* $C_{15:0}$; YANG *et al.*, 2000).

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite de cada vaca e em cada ordenha foram recolhidas, sem conservante, em dois dias consecutivos da última semana de cada período experimental (os mesmos dias utilizados para a recolha de amostras compostas de leite, de fezes, de urina e de sangue) e de imediato armazenadas a -15 °C, nas experiências com vacas leiteiras descritas no CAPÍTULO 4 (c.f. 4.3).

Os lípidos e os compostos lipossolúveis das amostras de alimentos e de leite foram extraídos como descrito, respectivamente, pela NORMALISATION FRANÇAISE V 03-030 (AFNOR, 1991) e pela NORMA ISO 14156:2001 (ISO, 2001). A metilação foi realizada de acordo com a NORMA ISO 15884:2002 (ISO, 2002a) e a composição em ácidos gordos foi determinada por cromatografia gás-líquido de acordo com a NORMA ISO 15885:2002 (ISO, 2002b). As amostras (0,3 µl de esters de metil em n-heptano) foram injectadas com uma relação de *split* de 20:1 num cromatógrafo (HEWLETT-PACKARD 6890) equipado com um detector de chama (HEWLETT-PACKARD, SUNNYVALE, CA). Os ésteres de metil dos ácidos gordos nas fracções lipídicas foram separados utilizando uma coluna capilar (60 m x 0,25 mm i.d. *fused silica*; SP-2380, SUPELCO, Inc., BELLEFONTE, PA). As temperaturas do injector e do detector foram mantidas, respectivamente, a 260 °C e a 290 °C. A temperatura inicial do forno foi mantida a 60 °C durante 0,10 minutos, aumentando, de seguida, 17 °C por minuto até aos 168 °C, mantida a esta temperatura durante 27 minutos, aumentando, depois, 4 °C por minuto até aos 235 °C, temperatura que se manteve durante 5 minutos. O hélio foi utilizado como gás de arrasto. Os ácidos gordos foram expressos em percentagem do total de ácidos gordos.

Os dados, para cada experiência, foram sujeitos a análise de variância para um

delineamento em três quadrados latinos 3x3 (STEEL e TORRIE, 1980) utilizando o procedimento *General Linear Model* do programa SAS (SAS System for Windows, version 8e, 1999-2001, SAS INSTITUTE INC., Cary, NC, USA) segundo o modelo linear:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + V_j(Q_i) + P_k(Q_i) + T_l + O_m + E_{ijklm},$$

onde,

Y = variável dependente

μ = média global

Q_i = efeito médio do quadrado i

$V_j(Q_i)$ = efeito médio da vaca j dentro do quadrado i

$P_k(Q_i)$ = efeito médio do período k dentro do quadrado i

T_l = efeito médio do tratamento l

O_m = efeito médio da ordenha m

E_{ijklm} = erro residual não explicado, com distribuição assumida normal e independente.

O modelo continha, também, inicialmente, a interacção tratamento x ordenha, mas, como esta nunca foi significativa (P>0,05), foi removida do modelo. Quando ocorreram diferenças significativas, o teste da diferença mínima significativa (STEEL e TORRIE, 1980) foi utilizado para comparar as médias. O perfil em ácidos gordos do leite, calculado por vaca e por tratamento, foi sujeito a análise de factores (*principal component factor analysis*) e a análise discriminativa canónica utilizando, respectivamente, os procedimentos *Factor analysis* e *Discriminant analysis* do programa SAS (SAS System for Windows, version 8e, 1999-2001, SAS INSTITUTE INC., Cary, NC, USA).

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Alimentos experimentais

A composição química média das dietas foi descrita no CAPÍTULO 4 (QUADRO 4.5). As principais diferenças em termos de composição química das dietas entre experiências foram o maior teor em PB na Experiência 2 e o menor teor em amido na Experiência 1. Na Experiência 1, o teor em PB variou entre 140,4 e 174,5 g kg^{-1} MS, tendo a dieta RL um

maior teor em açúcares totais, devido à maior inclusão de polpa de citrinos. O teor em proteína verdadeira das dietas da Experiência 2 variou de forma decrescente da dieta U0 para as dietas U5 e U10, enquanto os outros nutrientes se mantiveram similares. Na Experiência 3, a composição da dieta foi a mesma em todos os tratamentos, sendo a única diferença o modo de distribuição do CPr.

A composição dos ingredientes das dietas em ácidos gordos está apresentada no QUADRO 5.2. A maior diferença na composição em ácidos gordos das dietas foi o aumento do teor em ácido esteárico ($C_{18:0}$) e a diminuição dos teores em ácidos linoleico ($C_{18:2}$) e linolénico ($C_{18:3}$) entre as dietas RL e RH na Experiência 1, associados à utilização de um suplemento de gordura hidrogenada. Os níveis de quatro ácidos gordos de cadeia ímpar (*iso* $C_{15:0}$, *anteiso* $C_{15:0}$, *iso* $C_{17:0}$ e $C_{17:1}$) encontraram-se, em geral, abaixo do nível de detecção (0,05% do total de ácidos gordos). Os alimentos continham apenas vestígios de ácido pentadecanóico ($C_{15:0}$), de ácido 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) e de ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$), não se tendo encontrado qualquer relação entre os níveis destes ácidos gordos nos alimentos e no leite (resultados não apresentados).

5.4.2. Perfil em ácidos gordos do leite

O perfil em ácidos gordos do leite para as experiências 1, 2 e 3 está apresentado, respectivamente, nos QUADROS 5.3, 5.4 e 5.5. Em termos gerais, a gordura do leite destas três experiências era rica em ácidos mirístico ($C_{14:0}$; 9,28 – 11,19%), palmítico ($C_{16:0}$; 32,0 – 37,8%), esteárico ($C_{18:0}$; 7,75 – 11,76%) e oleico ($C_{18:1}$; 24,4 – 29,0%), contendo teores reduzidos em ácidos linoleico ($C_{18:2}$; 2,1 – 3,1%) e linolénico ($C_{18:3}$; 0 – 0,25%). Estes teores são típicos de leite produzido por vacas alimentadas com dietas com elevada percentagem de silagem de milho (ABU-GAHZALEH *et al.*, 2001; CHILLIARD *et al.*, 2001b). Isto porque, a silagem de milho é mais rica em ácido linoleico ($C_{18:2}$) do que a silagem de erva, uma vez que a gordura do grão de milho é constituída por *ca* 60% de ácido linoleico ($C_{18:2}$); e porque a silagem de milho favorece a produção de C6 a C12 e de ácido palmitoleico ($C_{16:1}$; CHILLIARD *et al.*, 2001b).

Na Experiência 1, a dieta RL aumentou significativamente os ácidos gordos sintetizados *de novo* ($C_{8:0}$, $C_{12:0}$ e $C_{14:0}$), quando comparada com as dietas RM e RH. Isto resultou, provavelmente, quer dos níveis superiores de açúcares e de pectinas (da maior inclusão de polpa de citrinos), quer do menor nível de inclusão de gordura nesta dieta.

QUADRO 5.2. – Perfil em ácidos gordos dos alimentos utilizados nas experiências 1, 2 e 3.

	Experiência 1					*Experiência 2*					*Experiência 3*	
	SM[1]	FA[2]	RL[3]	RM[3]	RH[3]	SM[1, 4]	FA[2, 4]	U0[5]	U5[5]	U10[5]	CEn[6]	CPr[6]
$C_{12:0}$	0,08	1,26	0,41	0,53	0,28	0,11	0,96	0,16	0,15	0,14	0,24	0,12
$C_{14:0}$	0,14	2,17	0,47	0,63	0,62	0,21	1,72	0,42	0,37	0,36	0,53	0,30
$C_{14:1}$	ND[7]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
iso $C_{15:0}$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,16	ND	ND	ND	ND	ND
anteiso $C_{15:0}$	ND	1,17	ND	ND	ND	ND	0,47	ND	ND	ND	ND	ND
$C_{15:0}$	0,07	0,92	0,14	0,09	0,18	0,05	0,53	0,08	0,10	0,15	0,12	0,08
$C_{16:0}$	10,31	41,47	15,93	16,83	16,54	9,98	41,43	18,45	18,36	18,32	22,14	9,86
$C_{16:1}$	0,14	0,92	0,41	0,35	0,43	0,12	1,40	0,16	0,16	0,18	0,27	0,18
iso $C_{17:0}$	ND	0,46	ND	0,08	ND	ND	0,13	ND	ND	ND	ND	ND
anteiso $C_{17:0}$	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	ND	0,07	0,05	0,06	0,08	0,07	ND
$C_{17:0}$	0,18	0,60	0,10	0,09	0,10	0,25	0,33	0,11	0,13	0,12	0,14	0,09
$C_{17:1}$	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$C_{18:0}$	1,80	8,31	4,18	7,73	8,79	1,69	11,80	8,85	9,39	8,89	9,24	4,79
$C_{18:1}$	26,07	11,25	23,41	23,25	21,63	22,61	14,65	18,49	20,27	20,53	20,74	24,23
$C_{18:2}$	51,89	14,69	42,07	34,21	26,58	58,85	12,08	38,25	40,40	39,57	39,12	54,13
$C_{18:3}$	4,06	7,40	3,00	2,51	2,21	3,75	8,19	2,82	2,75	2,64	2,51	2,20
$C_{20:0}$	0,44	1,69	0,42	0,45	0,42	0,43	1,28	0,38	0,42	0,43	0,37	0,73
$C_{20:1}$	0,33	0,31	0,60	0,90	1,02	0,38	0,21	0,36	0,32	0,33	0,33	0,31
$C_{22:0}$	0,38	2,75	0,27	0,37	0,56	0,33	1,88	0,56	0,28	0,41	0,19	0,82
$C_{24:0}$	0,36	2,77	0,28	0,42	0,85	0,65	1,76	0,79	0,34	0,26	0,22	0,49

$C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$ e $C_{11:0}$ não detectados. [1]Silagem de milho. [2]Feno de azevém. [3]Alimentos concentrados denominados de acordo com a relação g ERDP MJ^{-1} FME da dieta em que foram incluídos: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, uma ligeira deficiência e um ligeiro excesso. [4]Utilizados nas Experiências 2 e 3. [5]Alimentos concentrados denominados de acordo com o seu teor em ureia, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10. [6]Alimentos concentrados denominados de acordo com o principal tipo de nutrientes que forneceram, respectivamente, energético e proteico para CEn e CPr. [7]Não detectado.

QUADRO 5.3 – Perfil em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) das amostras de leite recolhidas na Experiência 1.

Ácidos gordos (%)	RL[1]	RM[1]	RH[1]	EPM‡	P
n	16	16	16		
$C_{4:0}$	0,70	0,58	0,62	0,071	NS
$C_{6:0}$	0,68	0,52	0,57	0,050	NS
$C_{8:0}$	0,65[a]	0,49[b]	0,51[b]	0,033	**
$C_{10:0}$	2,15	1,51	1,89	0,177	†
$C_{11:0}$	0,24[a]	0,19[b]	0,20[b]	0,011	*
$C_{12:0}$	2,90[a]	2,43[b]	2,37[b]	0,119	**
$C_{14:0}$	10,81[a]	9,66[b]	9,28[b]	0,188	***
$C_{14:1}$	0,95	0,96	0,97	0,048	NS
$C_{15:0}$	1,10	1,04	1,13	0,044	NS
anteiso $C_{15:0}$	0,62[a]	0,48[b]	0,48[b]	0,040	*
iso $C_{15:0}$	0,27	0,31	0,29	0,050	NS
$C_{16:0}$	32,03[a]	33,44[b]	34,34[c]	0,281	***
$C_{16:1}$	2,13	2,23	2,22	0,045	NS
$C_{17:0}$	0,69[a]	0,60[b]	0,55[c]	0,019	***
anteiso $C_{17:0}$	0,21	0,21	0,22	0,009	NS
iso $C_{17:0}$	0,48	0,47	0,45	0,016	NS
$C_{17:1}$	0,52	0,21	0,38	0,179	NS
$C_{18:0}$	11,13	10,87	11,76	0,405	NS
$C_{18:1}$	25,27[a]	29,01[b]	27,66[b]	0,483	***
$C_{18:2}$	3,71[a]	2,51[b]	2,10[c]	0,103	***
$C_{18:3}$	<0,05	<0,05	<0,05		
$C_{14:1}/C_{14:0}$	0,09	0,10	0,11	0,005	†
$C_{16:1}/C_{16:0}$	0,07	0,07	0,07	0,003	NS
$C_{17:1}/C_{17:0}$	0,89	0,34	0,70	0,330	NS

[a, b, c]Na mesma linha valores com diferentes notações são significativamente diferentes (P<0,05).
[1]Tratamentos denominados de acordo com a relação ERDP/FME: RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso.
‡Erro padrão da média.
* P<0,05.
** P<0,01.
*** P<0,001.
† P<0,10.

Com efeito, a fermentação, no rúmen, da polpa de citrinos, promove uma maior produção de acetato e de butirato (*e.g.*, WING, 1975; SUTTON *et al.*, 1987) e os ácidos gordos de cadeia longa, do suplemento de gordura, podem ter inibido a síntese *de novo* de ácidos gordos na glândula mamária (PALMQUIST e JENKINS, 1980; HADSELL e SOMMERFELDT,

QUADRO 5.4 – Perfil em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) das amostras de leite recolhidas na Experiência 2.

Ácidos gordos (%)	U0[1]	U5[1]	U10[1]	EPM‡	P
n	18	18	14		
$C_{4:0}$	0,99	0,91	0,89	0,072	NS
$C_{6:0}$	0,88	0,77	0,78	0,052	NS
$C_{8:0}$	0,71	0,63	0,65	0,033	NS
$C_{10:0}$	2,24	2,03	2,15	0,081	NS
$C_{11:0}$	0,28	0,26	0,27	0,011	NS
$C_{12:0}$	3,19	2,92	3,10	0,084	†
$C_{14:0}$	11,19	10,88	11,12	0,121	NS
$C_{14:1}$	1,03[a]	0,96[b]	0,96[b]	0,017	**
$C_{15:0}$	1,38	1,37	1,43	0,035	NS
anteiso $C_{15:0}$	0,43	0,41	0,38	0,013	NS
iso $C_{15:0}$	0,18	0,18	0,16	0,009	NS
$C_{16:0}$	36,81[a]	37,42[ab]	37,81[b]	0,232	*
$C_{16:1}$	2,11	2,08	2,09	0,030	NS
$C_{17:0}$	0,60	0,60	0,62	0,013	NS
anteiso $C_{17:0}$	0,16	0,17	0,17	0,007	NS
iso $C_{17:0}$	0,31[a]	0,31[a]	0,28[b]	0,009	*
$C_{17:1}$	0,17	0,17	0,18	0,008	NS
$C_{18:0}$	9,00	9,39	8,89	0,159	†
$C_{18:1}$	24,43	25,24	24,74	0,363	NS
$C_{18:2}$	2,46[a]	2,32[ab]	2,20[b]	0,067	*
$C_{18:3}$	<0,05	<0,05	<0,05		
$C_{14:1}/C_{14:0}$	0,09	0,09	0,09	0,003	NS
$C_{16:1}/C_{16:0}$	0,06	0,06	0,06	0,001	NS
$C_{17:1}/C_{17:0}$	0,28	0,27	0,27	0,008	NS

[a, b, c]Na mesma linha valores com diferentes notações são significativamente diferentes (P<0,05).
[1]Tratamentos denominados de acordo com o teor em ureia dos alimentos concentrados, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10.
‡Erro padrão da média.
* P<0,05.
** P<0,01.
*** P<0,001.
† P<0,10.

1988; EMANUELSON *et al.*, 1991; GRUMMER, 1991; HOFFMAN *et al.*, 1991; DHIMAN e SATTER, 1993; JENKINS, 1993; DHIMAN *et al.*, 1995; LOOR e HERBEIN, 1998; CHOUINARD *et al.*, 1999; CHILLIARD *et al.*, 2000; BAUMGARD *et al.*, 2001; BENSON *et al.*, 2001; LOOR e HERBEIN, 2001; WARD *et al.*, 2002; LOOR e HERBEIN, 2003) e ter aumentado as

QUADRO 5.5 – Perfil em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) das amostras de leite recolhidas na Experiência 3.

Ácidos gordos (%)	DU[1]	D2[1]	D1[1]	EPM‡	P
n	14	14	14		
$C_{4:0}$	0,57[ab]	0,66[a]	0,42[b]	0,054	*
$C_{6:0}$	0,47[ab]	0,55[a]	0,40[b]	0,039	*
$C_{8:0}$	0,41	0,48	0,38	0,028	†
$C_{10:0}$	1,41	1,53	1,36	0,074	NS
$C_{11:0}$	0,20	0,21	0,21	0,012	NS
$C_{12:0}$	2,39	2,47	2,37	0,092	NS
$C_{14:0}$	10,08	10,16	9,96	0,205	NS
$C_{14:1}$	1,25	1,20	1,21	0,034	NS
$C_{15:0}$	1,30[a]	1,24[a]	1,47[b]	0,051	*
anteiso $C_{15:0}$	0,41[a]	0,46[b]	0,45[b]	0,010	*
iso $C_{15:0}$	0,22	0,23	0,22	0,005	NS
$C_{16:0}$	35,26	35,99	35,54	0,405	NS
$C_{16:1}$	2,76	2,68	2,91	0,067	†
$C_{17:0}$	0,72[a]	0,71[a]	0,80[b]	0,017	**
anteiso $C_{17:0}$	0,25[a]	0,26[ab]	0,28[b]	0,007	*
iso $C_{17:0}$	0,53	0,49	0,54	0,018	NS
$C_{17:1}$	0,27[ab]	0,25[a]	0,28[b]	0,009	*
$C_{18:0}$	7,94	8,42	7,75	0,184	†
$C_{18:1}$	27,74	26,39	27,49	0,575	NS
$C_{18:2}$	2,99[a]	2,70[b]	3,07[a]	0,074	**
$C_{18:3}$	0,24	0,24	0,25	0,008	NS
$C_{14:1}/C_{14:0}$	0,13	0,12	0,12	0,010	NS
$C_{16:1}/C_{16:0}$	0,08	0,07	0,08	0,005	NS
$C_{17:1}/C_{17:0}$	0,38	0,35	0,36	0,020	NS

[a, b, c]Na mesma linha valores com diferentes notações são significativamente diferentes (P<0,05).
[1]Tratamentos denominados de acordo com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.
‡Erro padrão da média.
* P<0,05.
** P<0,01.
*** P<0,001.
† P<0,10.

concentrações de ácido esteárico ($C_{18:0}$) e de ácido oleico ($C_{18:1}$) no leite (DHIMAN e SATTER, 1993; WEIGEL *et al.*, 1997; DRACKLEY *et al.*, 2001).

A diminuição da proporção de ácidos gordos de cadeia curta e média em

consequência da adição de gordura na dieta pode ser devida: (1) a um efeito de diluição simples, dada a maior absorção de ácidos gordos de cadeia longa do sangue; (2) à menor disponibilidade de precursores (acetato e β-hidroxibutirato), devido à menor ingestão voluntária dos animais alimentados com dietas ricas em gordura; e (3) à menor relação acetato/propionato no rúmen, causada pela maior ingestão de ácidos gordos insaturados (CHILLIARD *et al.*, 2000 e 2001a). Mas, a ausência de redução da produção de ácidos gordos de cadeia curta e média após a infusão intravenosa de triglicéridos sugere que o efeito tem origem no rúmen (STORRY *et al.*, 1969a e 1969b). Contudo, a suplementação de dietas com ácidos gordos saturados ou sebo de bovino hidrogenado, fontes de lípidos relativamente inertes no rúmen, diminuíram a proporção e a produção de C6 a C16 na glândula mamária de vacas leiteiras (BANKS *et al.*, 1984). Igualmente, o fornecimento de lípidos protegidos na dieta de vacas leiteiras diminuiu a síntese *de novo* de ácidos gordos na glândula mamária (MATTOS e PALMQUIST, 1974; GOERING *et al.*, 1977; WRENN *et al.*, 1978). No entanto, isto pode reflectir a protecção incompleta dos lípidos, já que a síntese *de novo* é mais reduzida com ácidos gordos insaturados (CLAPPERTON e BANKS, 1985).

Segundo PALMQUIST e JENKINS (1980), a inibição da síntese *de novo* é, provavelmente, mediada pela inibição da ACC, tipo retroacção, pelo aumento das concentrações de acil-CoA na glândula mamária. Isto foi demonstrado quando as concentrações de ácido butírico aumentaram em situações de diminuição do teor em gordura do leite (STORRY *et al.*, 1973; MATTOS e PALMQUIST, 1974), uma vez que a sua síntese é independente da formação de malonil-CoA (LIN e KUMAR, 1972). PIPEROVA *et al.* (2000) referem, também, que dietas ricas em alimentos concentrados (70%), quando comparadas com dietas com 40% de alimento concentrado, promovem menor actividade das enzimas ACC, FAS e abundância relativa de ACC mRNA, diminuindo, assim, a síntese *de novo* de ácidos gordos na glândula mamária. Contudo, a incorporação directa de ácidos gordos de cadeia longa na gordura do leite, por economizar glucose, aumenta a disponibilidade deste nutriente para a síntese de lactose, o que, por sua vez, favorece a produção de leite (DAVIS e COLLIER, 1985; WEIGEL *et al.*, 1997).

Nas experiências 1 e 2, os níveis de ácido palmítico ($C_{16:0}$) no leite variaram de acordo com o fornecimento na dieta, respectivamente, pelo aumento de inclusão de gordura hidrogenada e pela substituição de bagaço de soja por ureia. Igualmente, os níveis de ácido linoleico ($C_{18:2}$) no leite alteraram-se com as diferenças substanciais no seu fornecimento na dieta, na Experiência 1. Os níveis elevados de ácido linoleico ($C_{18:2}$) no

leite das vacas alimentadas com a dieta RL podem, também, ter sido provocados pelo efeito do baixo teor em N da dieta na diminuição das taxas de biohidrogenação (GERSON *et al.*, 1982 e 1983). Na Experiência 2, os níveis de ácido linoleico ($C_{18:2}$) no leite diminuíram com a maior inclusão de ureia. A discrepância entre os níveis de ácido oleico ($C_{18:1}$) nas dietas e no leite, da Experiência 1, reflectem o facto de existirem outras fontes deste ácido gordo no leite, incluindo a biohidrogenação do ácido linoleico ($C_{18:2}$) e do ácido linolénico ($C_{18:3}$) e a insaturação do ácido oleico ($C_{18:1}$).

O ácido linolénico ($C_{18:3}$) foi detectado, apenas, no leite na Experiência 3, o que pode reflectir a reduzida capacidade de biohidrogenação com estas dietas com baixo teor em proteína e elevado teor em amido (SECÇÃO 5.2.). Note-se que, maiores proporções de ácido linolénico ($C_{18:3}$) do que de ácido linoleico ($C_{18:2}$) e de ácido oleico ($C_{18:1}$) são convertidos em ácido esteárico ($C_{18:0}$; SAUVANT e BAS, 2001). Já nas experiências 1 e 2, provavelmente, a biohidrogenação não terá sido afectada em grande extensão.

Os tratamentos efectuados tiveram um efeito significativo nos níveis de ácidos gordos de cadeia ímpar no leite, em particular nas experiências 1 e 3. Os efeitos mais notáveis foram os níveis superiores de ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$) na dieta RL e a redução progressiva nos níveis de ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) com o aumento do teor em PB da dieta na Experiência 1. Os níveis superiores da maioria dos ácidos gordos de cadeia ímpar (efeito significativo para o $C_{15:0}$, *anteiso* $C_{15:0}$, $C_{17:0}$ e *anteiso* $C_{17:0}$) associaram-se com a dieta mais assíncrona (D1) da Experiência 3. Como se pensa que estes ácidos gordos derivam dos microrganismos do rúmen, as diferenças encontradas podem reflectir diferenças nos substratos e/ou no ambiente ruminal.

No QUADRO 5.6 apresenta-se a matriz de correlações para todos os dados, incluindo o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite, a composição das dietas e o fluxo de proteína microbiana estimado de acordo com o AFRC (1993; CAPÍTULO 4). Os resultados mostram correlações significativas entre os fornecimentos de N e de hidratos de carbono na dieta e o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite. O ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$) correlacionou-se significativa e positivamente com o teor em açúcares totais da dieta ($r = 0,596$), sendo os níveis superiores deste ácido na dieta RL, provavelmente, explicados pela maior inclusão de polpa de citrinos. Este efeito é consistente com o maior teor deste ácido nas bactérias associadas à fase líquida (LEE *et al.*, 1999; DEWHURST *et al.*, 2000b). LEE *et al.* (1999) observaram que as bactérias associadas à fase líquida, recolhidas do rúmen de vacas alimentadas com silagem de erva e alimento

QUADRO 5.6 – Matriz de correlações entre o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite (% do total de ácidos gordos), composição da dieta (g kg^{-1} MS) e fluxo estimado de proteína microbiana para o duodeno (MCP; g dia^{-1}).

	iso $C_{15:0}$	*anteiso* $C_{15:0}$	$C_{15:0}$	*iso* $C_{17:0}$	*anteiso* $C_{17:0}$	$C_{17:0}$	$C_{17:1}$	PB	Amido	NDF	Açúcares	MCP
iso $C_{15:0}$	1,000	0,315**	-0,180	0,208	0,074	0,075	-0,045	-0,121	-0,374**	0,354**	0,113	-0,058
anteiso $C_{15:0}$		1,000	-0,111	0,260*	0,019	0,214	-0,022	-0,304*	-0,467***	0,300*	0,596***	-0,398***
$C_{15:0}$			1,000	-0,178	-0,144	0,485***	-0,114	0,168	0,370**	-0,382**	-0,231	0,032
iso $C_{17:0}$				1,000	0,789***	0,508***	0,134	-0,669***	-0,341**	0,567***	0,184	-0,680***
anteiso $C_{17:0}$					1,000	0,491***	0,358**	-0,578***	-0,163	0,463***	0,039	-0,617***
$C_{17:0}$						1,000	-0,026	-0,559***	0,151	0,069	0,104	-0,525***
$C_{17:1}$							1,000	-0,272*	-0,226	0,219	0,339**	-0,310**
PB								1,000	0,150	-0,455***	-0,400***	0,751***
Amido									1,000	-0,805***	-0,564***	0,407***
NDF										1,000	0,282*	-0,529***
Açúcares											1,000	-0,589***
MCP												1,000

*P<0,05.
**P<0,01.
***P<0,001.

concentrado, possuíam maiores teores em ácido pentadecanóico ($C_{15:0}$) e em ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$) e menor em ácido 13-metil-tetradecanóico (*iso* $C_{15:0}$) do que as bactérias associadas à fase sólida. Igualmente, DEWHURST *et al.* (2000b) referem maiores concentrações de ácidos gordos totais de cadeia ímpar no leite de vacas em pastoreio, com um aumento particular no ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$), o que pode estar relacionado com um nível superior de bactérias associadas à fase líquida.

Os teores em ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$), observados nas três experiências, foram semelhantes aos obtidos por SALAWU *et al.* (2002) em vacas alimentadas com dietas à base de silagens de ervilha e trigo (*bicrop*) ou com silagens cortadas num estádio avançado de maturidade de baixo teor em hidratos de carbono solúveis em água. No mesmo sentido vão os resultados de estudos em que participámos (resultados não publicados) para o teor em ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$), de amostras de leite recolhidas numa experiência onde foi avaliada a resposta produtiva de vacas leiteiras alimentadas com silagens de azevém e de cereais imaturos (trigo e triticale), suplementadas com uma quantidade fixa de concentrado de baixo teor em açúcares (CABRITA *et al.*, 2003).

O teor em PB da dieta relacionou-se significativa e negativamente com os ácidos gordos 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$), 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) e heptadecanóico ($C_{17:0}$) ($r = -0,669$; $r = -0,578$; e $r = -0,559$, respectivamente), sugerindo que estes ácidos gordos podem ser marcadores de deficiência em proteína da dieta. Os níveis de ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) variaram entre 0,80 para a dieta assíncrona (D1) com 144,5 g kg^{-1} PB (na MS) e 0,55% dos ácidos gordos do leite para a dieta RH com 174,5 g kg^{-1} PB (na MS). As concentrações de ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) foram, também, baixas no leite de vacas alimentadas com as dietas com elevado teor em PB (18,2 a 20,2 % de PB na MS) utilizadas por SALAWU *et al.* (2002). Nas amostras de leite recolhidas no estudo acima referido (CABRITA *et al.*, 2003) e em que os teores em PB das dietas variaram entre 12,7 e 14,5% (na MS), foram observados teores em ácido 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e em ácido 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) significativamente superiores nas dietas com menor teor em PB, sendo, no geral, os teores nestes ácidos, também, elevados. Embora não seja claro o porquê dos níveis de ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) aumentarem com a deficiência em proteína da dieta, uma explicação pode ser a alteração na população microbiana. Por exemplo, é bem conhecido que existem diferenças significativas entre as bactérias do rúmen em termos de teor em ácido

heptadecanóico ($C_{17:0}$; BAE *et al.*, 2000). Contrariamente, BAS *et al.* (2003) não observaram efeito significativo do teor em PB da dieta no perfil em ácidos gordos de bactérias isoladas de fluído ruminal de cabras.

A correlação significativa e negativa entre os teores em NDF e em PB da dieta (r = -0,445) e o facto do ácido 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e do ácido 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) se terem relacionado significativa e positivamente com o teor em NDF (r = 0,567 e r = 0,463, respectivamente) deixa em aberto a possibilidade destes ácidos gordos estarem relacionados com o fornecimento de NDF. BAS *et al.* (2003) observaram que o teor em NDF da dieta se correlacionou significativa e negativamente com o teor em ácido esteárico ($C_{18:0}$) e significativa e positivamente com os teores em ácidos gordos de cadeia ímpar, em ácidos gordos de configuração *iso* e em ácidos gordos de configuração *anteiso* de bactérias isoladas de fluído ruminal de cabras. Estes autores, obtiveram, também, correlações significativas e positivas entre os ácidos gordos pentadecanóico ($C_{15:0}$), heptadecanóico ($C_{17:0}$), 13-metil-tetradecanóico (*iso* $C_{15:0}$), 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$), 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$). No nosso estudo, a elevada correlação positiva (r = 0,789) encontrada entre o ácido 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e o ácido 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) pode, também, sugerir que estes ácidos gordos estão associados com a mesma população microbiana do rúmen.

A diminuição do teor em proteína verdadeira na Experiência 2 mostrou tendência para reduzir os níveis dos ácidos 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$), possivelmente reflectindo a redução no fornecimento de precursores de cadeia ramificada (*i.e.* aminoácidos), como sugerido por SAUVANT e BAS (2001). O efeito nos níveis de ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada observado na Experiência 3 pode ser explicado por um maior fornecimento de precursores em consequência da ineficiência proteica no rúmen com a dieta assíncrona (D1). Contudo, esta hipótese não é suportada pelos resultados da Experiência 1 que envolveu grandes diferenças no teor em PB e ou não mostrou nenhum efeito ou um efeito negativo de proteína adicional no teor em ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada no leite, com excepção do ácido 13-metil-tetradecanóico (*iso* $C_{15:0}$).

As correlações observadas, neste trabalho, entre o teor em amido da dieta e o perfil em ácidos gordos de cadeia ímpar do leite, tende a reflectir a elevada e significativa correlação (r = -0,805) entre os teores em NDF e em amido das dietas.

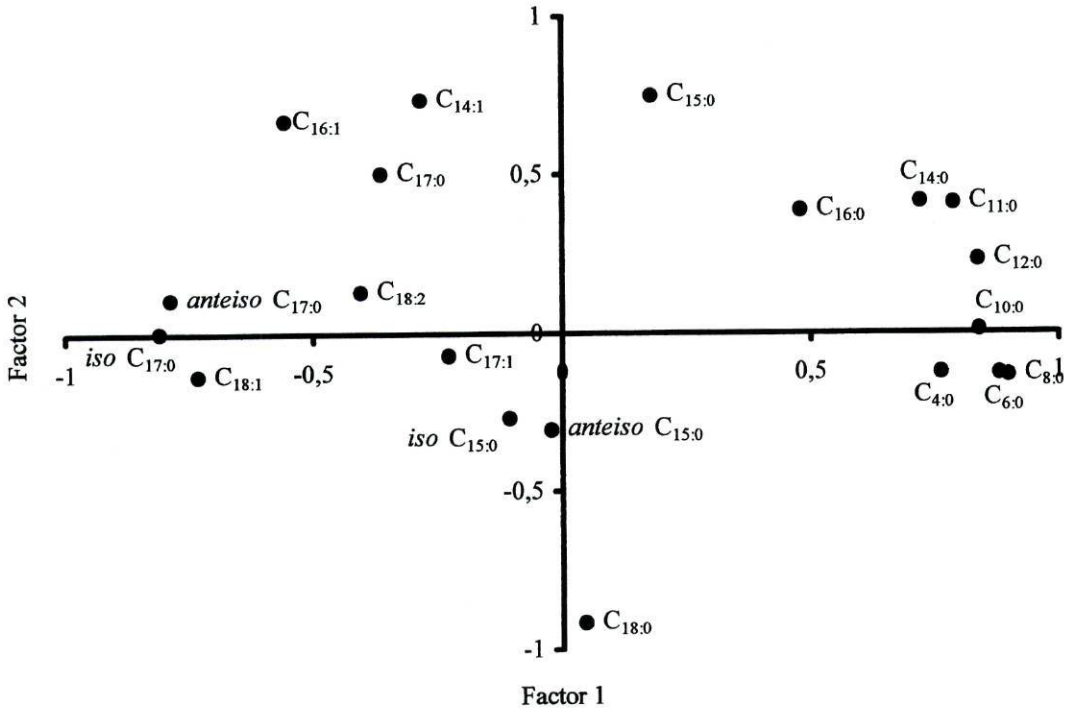
O fluxo de proteína microbiana para o duodeno, estimado de acordo com o AFRC (1993) e apresentado no CAPÍTULO 4, relacionou-se significativa e negativamente com todos os ácidos gordos de cadeia ímpar, com excepção do ácido 13-metil-tetradecanóico (*iso* $C_{15:0}$) e do ácido pentadecanóico ($C_{15:0}$). É, porém, difícil identificar se este efeito é real ou se reflecte as relações, acima discutidas, entre a composição da dieta (sobretudo o teor em PB) e os ácidos gordos de cadeia ímpar. Saliente-se que, na maioria dos casos, o fluxo estimado (AFRC, 1993) de proteína microbiana para o duodeno foi limitado pelo fornecimento de ERDP.

A análise de factores (*principal component factor analysis*), que examina as relações numa única série de variáveis, foi utilizada para estudar os padrões de alteração dos diferentes grupos de ácidos gordos na amplitude de amostras e de dietas utilizada neste trabalho. Agrupamentos de ácidos gordos longe da origem sugerem origens/vias comuns (MASSART-LEËN e MASSART, 1981), que são importantes para a variação geral nos resultados do perfil em ácidos gordos. Recentemente, FIEVEZ, VLAEMINCK, e DEWHURST (2003, comunicação pessoal) utilizaram a análise de componentes principais em dados do perfil em ácidos gordos de amostras de leite obtidas a partir de uma maior amplitude de dietas do que as utilizadas no nosso estudo e mostraram que é possível identificar origens/vias comuns de digestão e de metabolismo dos ácidos gordos (incluindo a síntese *de novo*, o fornecimento na dieta, a síntese microbiana e a acção da Δ^9-desaturase na glândula mamária).

A análise de factores (*principal component factor analysis*) parece ter fornecido uma descrição interessante dos nossos dados. Os resultados estão apresentados nas FIGURAS 5.3 (comparação dos factores 1 e 2) e 5.4 (comparação dos factores 1 e 3). O primeiro factor, que explicou 47,2% da variação total, agregou os ácidos gordos de cadeia curta e média em oposição aos ácidos gordos 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$), 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) e ácido oleico ($C_{18:1}$). O segundo factor explicou 21,7% da variação e agregou os ácidos gordos miristoleico ($C_{14:1}$), palmitoleico ($C_{16:1}$), pentadecanóico ($C_{15:0}$) e heptadecanóico ($C_{17:0}$) em oposição ao ácido esteárico ($C_{18:0}$) e o factor 3 explicou 13,3% da variação e agregou os ácidos 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$), heptadecanóico ($C_{17:0}$), 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e linoleico ($C_{18:2}$) em oposição ao ácido esteárico ($C_{16:0}$).

Imediatamente óbvia é a estreita associação entre os ácidos gordos de cadeia curta ($C_{4:0}$ ao $C_{10:0}$) e, em menor extensão, os ácidos gordos de cadeia média ($C_{12:0}$ e

(a)



(b)

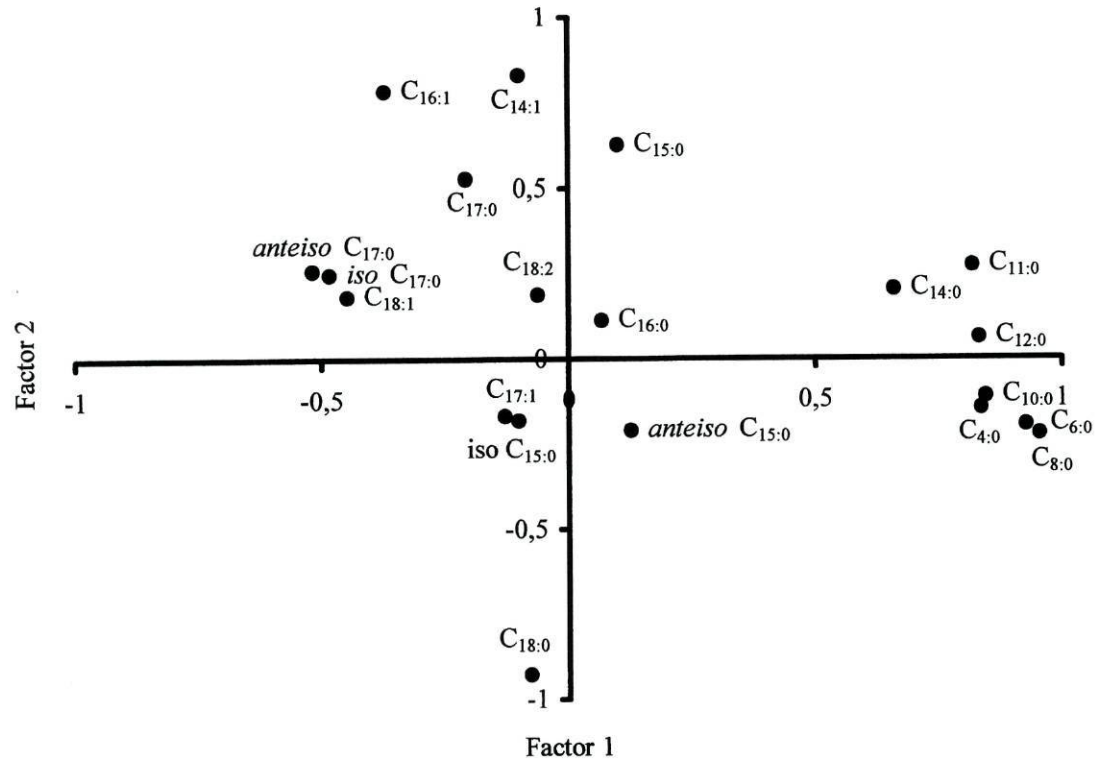
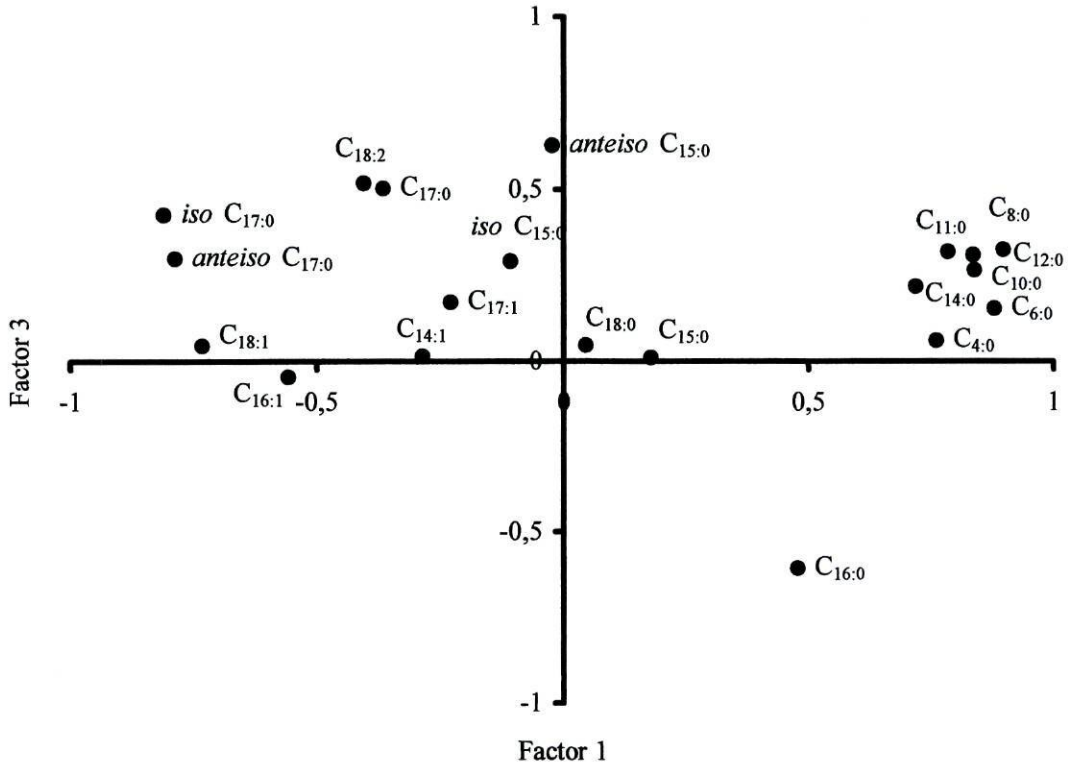


FIGURA 5.3 – Planos (*plots*) do factor 1 *versus* o factor 2 da análise de factores (*principal component factor analysis*) baseada no perfil em ácidos gordos do leite (a) sem rotação e (b) com rotação ortogonal.

(a)



(b)

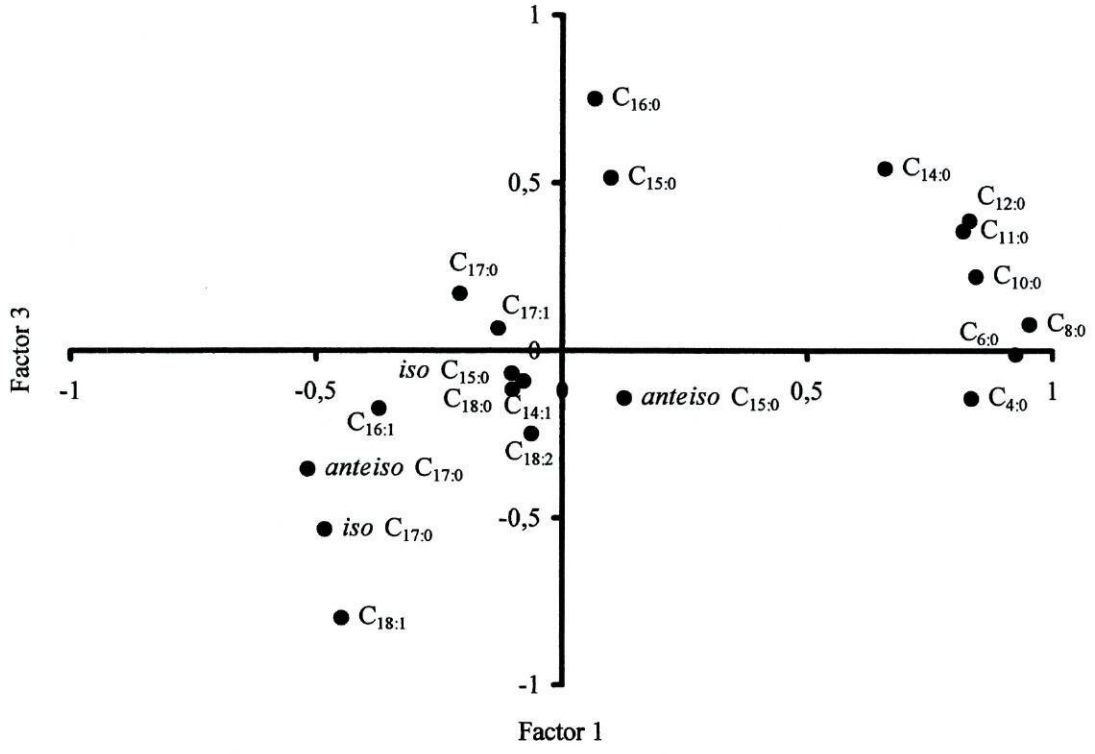


FIGURA 5.4 – Planos (*plots*) do factor 1 *versus* o factor 3 da análise de factores (*principal component factor analysis*) baseada no perfil em ácidos gordos do leite (a) sem rotação e (b) com rotação ortogonal.

$C_{14:0}$), reflectindo a sua origem comum na síntese *de novo*. O facto do ácido palmítico ($C_{16:0}$) não se ter agrupado com os ácidos gordos de cadeia curta e média pode ter sido devido à sua dupla origem, com uma proporção dependente do fornecimento na dieta (JENKINS, 1993; ENJALBERT *et al.*, 1998; CHILLIARD *et al.*, 2000 e 2001a; CLEGG *et al.*, 2001). O facto do ácido undecanóico ($C_{11:0}$) se ter agrupado com o ácido laúrico ($C_{12:0}$) e o ácido mirístico ($C_{14:0}$) confirma a sugestão (DIEDRICH e HENSCHEL, 1990) de que é um ácido gordo de alongamento da cadeia.

Os planos (*plots*) (FIGURAS 5.3 e 5.4) mostram, também, uma associação clara dos ácidos gordos monoenóicos ($C_{14:1}$, $C_{16:1}$ e, em menor extensão, $C_{17:1}$), que são, predominantemente, produzidos pela actividade da Δ^9-desaturase da glândula mamária nos correspondentes ácidos gordos saturados. Enquanto estes resultados confirmam a semelhança (factores 1 e 3), existe algo completamente diferente (factor 2) sobre as vias de produção do ácido heptadecenóico ($C_{17:1}$) no leite. Isto é, também, confirmado pelo facto da relação $C_{17:1}/C_{17:0}$ (0,645, 0,273, e 0,362 para as experiências 1, 2 e 3, respectivamente) ter sido muito diferente das relações $C_{16:1}/C_{16:0}$ (0,067, 0,056 e 0,078 para as experiências 1, 2 e 3, respectivamente) e $C_{14:1}/C_{14:0}$ (0,098, 0,089 e 0,123 para as experiências 1, 2 e 3, respectivamente). Igualmente, a correlação simples, considerando os dados de todas as experiências, entre o $C_{14:1}$ e o $C_{16:1}$ foi de 0,74, enquanto as correlações entre o $C_{14:1}$ e o $C_{17:1}$, e entre o $C_{16:1}$ e o $C_{17:1}$ foram de 0,05 e 0,11, respectivamente. O facto do ácido oleico ($C_{18:1}$) não se ter agrupado com os outros ácidos gordos monoenóicos era esperado devido às suas múltiplas origens acima referidas. Por esta razão, devemos ser cuidadosos a atribuir qualquer significado ao agrupamento do ácido 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$), do ácido 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e do ácido oleico ($C_{18:1}$), embora este efeito tenha sido evidente mesmo quando a análise de factores (*principal component factor analysis*) foi feita em separado para cada experiência (resultados não apresentados).

A análise discriminativa canónica, uma técnica de redução de dimensões relacionada com os componentes principais e a correlação canónica, foi utilizada para fornecer um resumo das análises simples de variância. Os planos (*plots*) das médias das classes de dietas nas variáveis canónicas, baseados nos ácidos gordos de cadeia par e ímpar, estão apresentados nas FIGURAS 5.5 e 5.6, respectivamente. Os ácidos gordos de cadeia ímpar do leite foram mais sensíveis aos tratamentos do que os ácidos gordos de cadeia par, como demonstrado, claramente, pela maior separação dos tratamentos na Experiência 3.

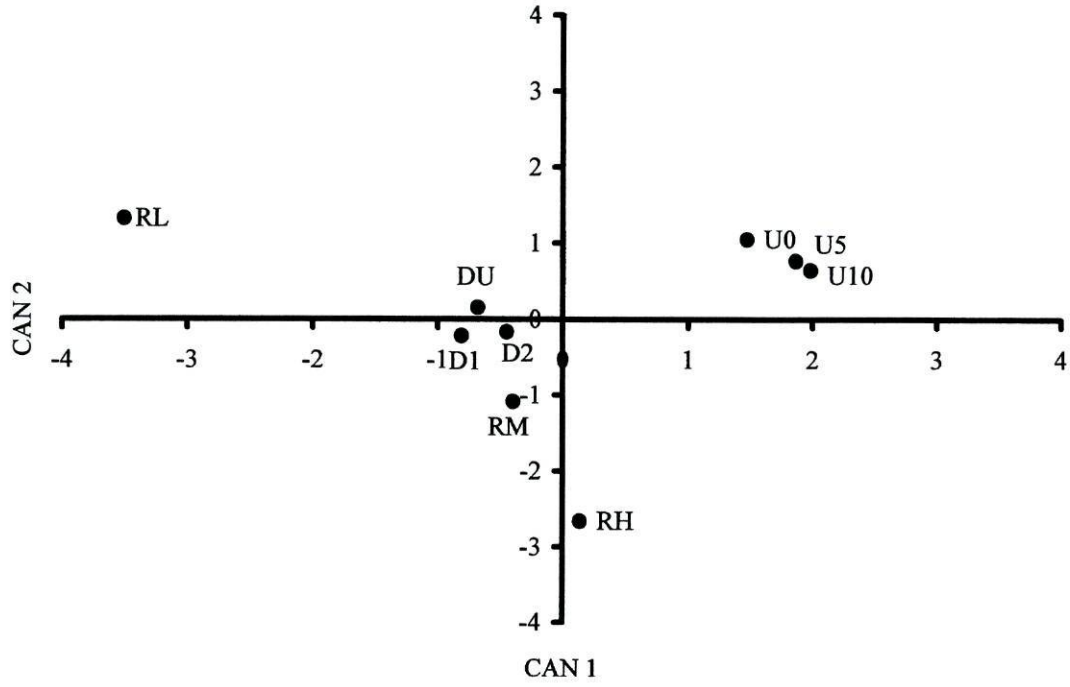
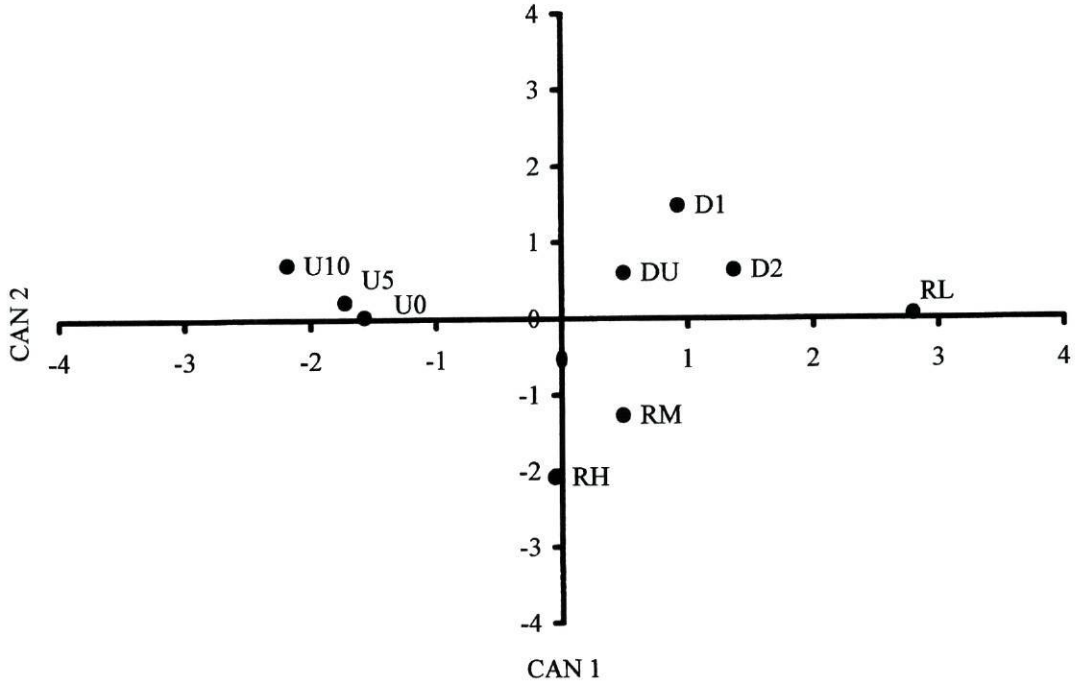


FIGURA 5.5 – Plano (*plot*) dos ácidos gordos de cadeia par das médias das classes de dietas nas variáveis canónicas. Tratamentos denominados de acordo: com a relação ERDP/FME, RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira deficiência e ligeiro excesso; com o seu teor em ureia, respectivamente, 0, 5,0 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10; e com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.

No QUADRO 5.7 encontram-se os coeficientes canónicos (*raw canonical coefficients*) para as variáveis independentes baseados na consideração separada dos ácidos gordos de cadeias par e ímpar. A comparação do tamanho dos coeficientes confirma os resultados da análise simples de variância na identificação dos ácidos gordos que variaram através da série de dados. Os coeficientes baseados nos ácidos gordos de cadeia par mostram que o ácido hexanóico ($C_{6:0}$) e o ácido octanóico ($C_{8:0}$) foram os ácidos gordos que mais contribuíram para as variáveis, o que ilustra a grande importância dos substratos ruminais para a síntese *de novo* na glândula mamária. Os ácidos gordos de cadeia ímpar mais significativos foram o ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$), o ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$), o ácido 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) e o ácido 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$), reflectindo, provavelmente, o efeito da natureza do substrato na predominância de diferentes classes de microrganismos no rúmen.

(a)



(b)

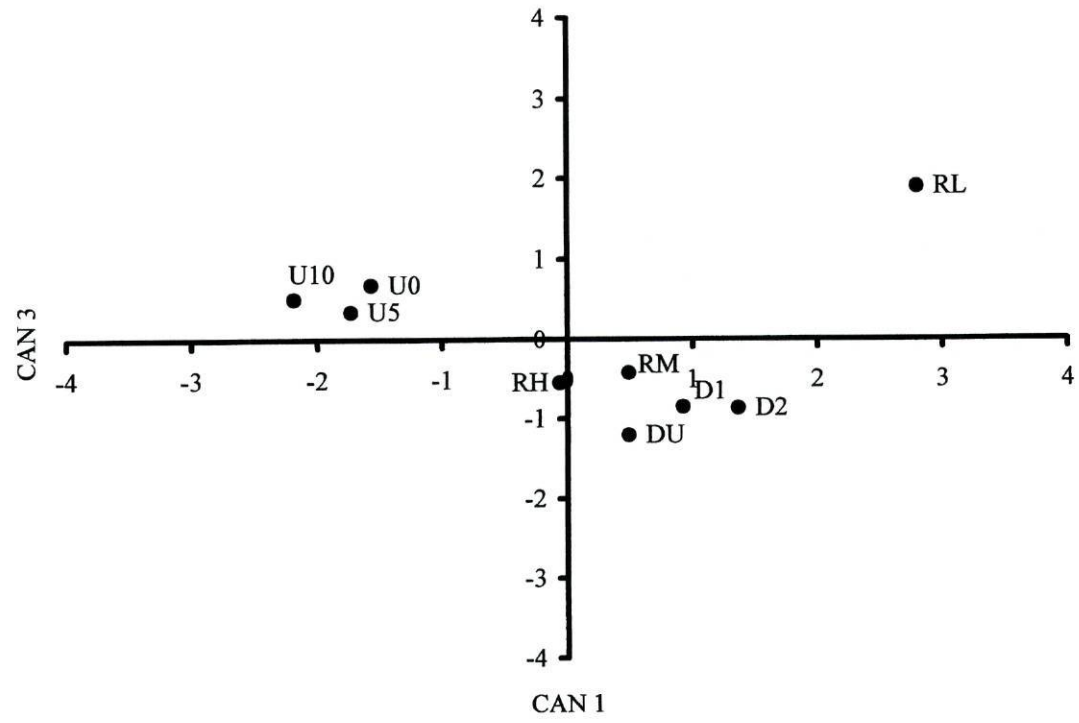


FIGURA 5.6 – Planos (*plots*) dos ácidos gordos de cadeia ímpar das médias das classes de dietas nas variáveis canónicas (a) CAN 1 *versus* CAN 2 e (b) CAN 1 *versus* CAN 3. Tratamentos denominados de acordo: com a relação ERDP/FME, RL, RM e RH proporcionaram, respectivamente, uma grande deficiência, ligeira

deficiência e ligeiro excesso; com o seu teor em ureia, respectivamente, 0, 5 e 10 g kg^{-1} para U0, U5 e U10; e com a forma de distribuição do alimento concentrado proteico, respectivamente, como alimento completo com a dieta base, em duas refeições antes da dieta base e em uma refeição antes da distribuição da dieta base na refeição da manhã para DU, D2 e D1.

QUADRO 5.7 – Coeficientes canónicos (*raw canonical coefficients*) para as variáveis canónicas significativas para os ácidos gordos de cadeia par (PAR) e cadeia ímpar (ÍMPAR) do leite.

PAR	CAN 1[1]	CAN 2[1]	ÍMPAR	CAN 1[1]	CAN 2[1]	CAN 3[2]
$C_{4:0}$	0,8451	5,2316	$C_{15:0}$	-2,4666	-1,8419	-1,6997
$C_{6:0}$	10,6579	-4,1669	*anteiso* $C_{15:0}$	6,1965	-4,5297	6,5648
$C_{8:0}$	-16,4190	2,4765	*iso* $C_{15:0}$	-0,2785	-5,2112	-3,5447
$C_{10:0}$	0,4284	-1,3051	$C_{17:0}$	8,6975	16,7390	6,2894
$C_{12:0}$	1,5129	0,0984	*anteiso* $C_{17:0}$	-6,0185	1,3788	-18,2093
$C_{14:0}$	0,3699	1,1581	*iso* $C_{17:0}$	7,1892	-7,2549	-4,2372
$C_{14:1}$	-0,2115	-0,0677	$C_{17:1}$	2,0919	0,1569	2,2970
$C_{16:0}$	0,4747	0,2281				
$C_{16:1}$	-0,2368	-0,0955				
$C_{18:0}$	0,1596	0,1290				
$C_{18:1}$	0,4517	0,0725				
$C_{18:2}$	-1,0584	1,7230				
R^2†	0,754	0,618		0,733	0,542	0,497

[1]P<0,001.
[2]P<0,05.
†Entre CAN_i e as variáveis de classe.

5.5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o perfil em ácidos gordos do leite é significativamente afectado pelo fornecimento, na dieta, quer de N, quer de hidratos de carbono. A análise de factores (*principal component factor analysis*) parece ter permitido uma descrição razoável dos dados, discriminando claramente entre os ácidos gordos que são sintetizados na glândula mamária (ácidos gordos de cadeia curta e média), que dependem da actividade da Δ^9 -desaturase (ácidos gordos monoenóicos), que são sobretudo absorvidos directamente da corrente sanguínea (ácidos gordos de cadeia longa) e aqueles que dependem das populações microbianas no rúmen (ácidos gordos de cadeia ímpar). Além disso, os ácidos gordos de cadeia ímpar, no leite, apresentaram um poder discriminatório superior entre as dietas. Os níveis de ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$) aumentaram com o fornecimento de açúcares na dieta e o ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) parece ser um marcador da deficiência em proteína. Adicionalmente, o ácido 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e o

ácido 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) associaram-se com os teores em NDF e em PB das dietas. Estes resultados sugerem que os ácidos gordos de cadeia ímpar no leite têm potencial para serem utilizados como uma técnica não invasiva para avaliar a função ruminal em termos de populações microbianas, substratos e interacções, embora esta hipótese deva ser validada, por exemplo, pela utilização de técnicas de biologia genética aplicadas à ecologia ruminal. São, também, necessários mais estudos para identificar os efeitos de outros factores, como o estádio de lactação (mobilização de gordura corporal) e fontes de gordura na dieta, no perfil em ácidos gordos do leite.

"In order to contribute to the development and knowledge of the microbial contribution to the profile of nutrients available for absorption in the ruminant, it is essential that models are based on sound biological and mathematical principles." (DIJKSTRA *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 6
Conclusões Finais

A bibliografia (CAPÍTULO 2) mostrou que o crescimento microbiano varia com as fontes de N e de energia, não esquecendo que, num dado momento, a forma preferencial de N da população microbiana depende do tipo de substrato energético e vice-versa, com efeitos marcados na actividade proteolítica, na digestibilidade da fibra e na alteração dos efeitos dos substratos. A reciclagem de N para o rúmen é outro aspecto invariavelmente referido. Isto porque a capacidade que os ruminantes desenvolveram para reciclar N pode, quer colmatar parcialmente o défice em N degradável de dietas deficientes, quer aumentar o sincronismo, no rúmen, entre as disponibilidades de N e de energia de dietas aparentemente equilibradas. Contrariamente, a reciclagem intra-ruminal de N, por diminuir o fluxo de proteína microbiana para o duodeno, deve ser contrariada. A modificação das taxas de diluição ruminais, pela redução do tamanho de partícula ou pela adição de sais, constitui solução viável, para esse fim. Reconhece-se, ainda, que as estratégias de alimentação da vaca leiteira devem permitir reduzir as necessidades de manutenção dos microrganismos, por forma a que a eficiência de síntese de proteína microbiana seja maximizada.

A informação analisada no CAPÍTULO 3 permite concluir que o estreito sincronismo entre a libertação de energia e de N traz benefícios principalmente em casos em que o crescimento microbiano é limitado por insuficiência de qualquer destes elementos. Com efeito, parece que os animais ruminantes desenvolveram mecanismos para atenuar os efeitos do assincronismo da disponibilização de nutrientes no rúmen, nomeadamente pela alteração dos padrões de ingestão, pela capacidade de armazenagem de hidratos de carbono pela população microbiana durante períodos de deficiência de N e pela maior reciclagem

de N, para o rúmen, com dietas assíncronas.

Do trabalho experimental (CAPÍTULO 4) conclui-se que dietas com baixa relação ERDP/FME, mas que satisfaçam as necessidades em MP, promovem menor ingestão de MS e menor produção de leite. Pelo contrário, o fornecimento de RDP em excesso, em relação à quantidade de FME fornecida pela dieta, não aumentou a ingestão de MS, nem a produção de leite em vacas no meio da lactação, tendo levado a um desperdício de RDP. Os resultados obtidos mostram, também, que parte da proteína de origem vegetal da dieta pode ser substituída por N não proteico (ureia) sem acarretar efeitos adversos na produtividade de vacas no início da lactação, desde que seja garantida a disponibilidade de hidratos de carbono rapidamente fermentáveis na dieta; e que a sincronização das disponibilidades de N e de energia para os microrganismos do rúmen de vacas no meio da lactação aumentou a produção de leite, provavelmente, via um aumento da síntese de proteína microbiana. No entanto, a resposta negativa a dietas assíncronas foi, apenas, observada numa situação extrema de assincronismo, pelo que, provavelmente, em condições práticas de alimentação pode não existir grandes benefícios em balancear estreitamente a libertação de N e de energia no rúmen. Os resultados da relação A/c em amostras de urina, o método não invasivo de estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno utilizado, sugerem que o volume de urina produzido aumenta, quer com a ingestão de N, quer com o aumento do assincronismo. Esta técnica não permitiu, todavia, identificar diferenças antecipadas no fluxo de proteína microbiana para o duodeno, tendo, também, sido observada variação diurna na excreção urinária de creatinina. Assim sendo, será, provavelmente, necessário recolher a totalidade de urina para se estimar o fluxo de proteína microbiana para o duodeno através da excreção de DP em vacas leiteiras.

Os resultados apresentados no CAPÍTULO 5 mostram que o perfil em ácidos gordos do leite é significativamente afectado pelo fornecimento, na dieta, quer de N, quer de hidratos de carbono. A análise de factores (*principal component factor analysis*) discriminou claramente os ácidos gordos que são sintetizados na glândula mamária (ácidos gordos de cadeia curta e média), que dependem da actividade da Δ^9 -desaturase (ácidos gordos monoenóicos), que são sobretudo absorvidos directamente da corrente sanguínea (ácidos gordos de cadeia longa) e aqueles que dependem das populações microbianas no rúmen (ácidos gordos de cadeia ímpar). A análise discriminativa canónica mostrou um maior poder discriminatório, entre dietas, dos ácidos gordos de cadeia ímpar no leite. Os níveis de ácido 12-metil-tetradecanóico (*anteiso* $C_{15:0}$) aumentaram com o fornecimento de

açúcares na dieta, os ácidos 15-metil-hexadecanóico (*iso* $C_{17:0}$) e 14-metil-hexadecanóico (*anteiso* $C_{17:0}$) associaram-se com os teores em NDF e em PB, parecendo o ácido heptadecanóico ($C_{17:0}$) ser um marcador da deficiência em proteína.

Conquanto suponhamos que os resultados obtidos permitem identificar estratégias de suplementação azotada de silagens de milho que melhorem a utilização da fracção RDP da dieta, consideramos ser necessário congregar esforços para que, no futuro, se possa desenvolver trabalho de investigação, nesta área, de forma integrada, isto é, que os estudos de nutrição e alimentação da vaca leiteira sejam enquadrados numa linha de investigação que albergue todos os componentes do ciclo do N nas explorações leiteiras.

No contexto do desenvolvimento de metodologias não invasivas ou menos invasivas de diagnóstico da função ruminal, apesar dos resultados aqui obtidos anteverem potencial de utilização dos ácidos gordos de cadeia ímpar no leite para avaliar a função ruminal, esta hipótese deve ser validada. Neste ponto, são necessários mais estudos que permitam a identificação dos microrganismos e dos efeitos no perfil em ácidos gordos do leite de outros factores, como o estádio de lactação (mobilização de gordura corporal) e a inclusão de fontes de gordura na dieta. Entendemos, também, ser necessária mais investigação no sentido de se desenvolverem, com base nesta metodologia ou noutras, testes rápidos de diagnóstico da função ruminal passíveis de serem aplicados ao nível da exploração.

Finalmente, pensamos que este trabalho evidencia, uma vez mais, a necessidade dos sistemas correntes de formulação de regimes alimentares – factoriais e estáticos – se basearem nos mecanismos do rúmen e do próprio animal, bem como na dinâmica dos nutrientes individuais, sendo, ainda, desejável que estes permitam prever a variação da composição dos produtos de origem animal.

CAPÍTULO 7
Referências Bibliográficas

ABE, M. e IRIKI, T., 1978. Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of rumen contents. *Br. J. Nutr.*, **39**:255-264.

ABE, M., SHIBUI, H., IRIKI, T. e KUMENO, F., 1973. Relation between diet and protozoal population in the rumen. *Br. J. Nutr.*, **29**:197-202.

ABE, M., IRIKI, T., TOBE, N. e SHIBUI, H., 1981. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**:758-765.

ABU-GAHZALEH, A.A., SCHINGOETHE, D.J. e HIPPEN, A.R., 2001. Conjugated linoleic acid and other beneficial fatty acids in milk fat from cows fed soybean meal, fish meal, or both. *J. Dairy Sci.*, **84**:1845-1850.

AGNEW, K.W., MAYNE, C.S. e DOHERTY, J.G., 1996. An examination of the effect of method and level of concentrate feeding on milk production in dairy cows offered a grass silage-based diet. *Anim. Sci.*, **63**:21-31.

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL (AFRC), 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB Int., Wallingford, Oxon, England.

AHRAR, M. e SCHINGOETHE, D.J., 1979. Heat-treated soybean meal as a protein supplement for lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **62**:932-940.

AITCHISON, T.E., MERTENS, D.R., MCGILLIARD, A.D. e JACOBSON, N.L., 1976. Effect of nitrogen solubility on nitrogen utilization in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **59**:2056-2062.

ALBIN, R.C. e CLANTON, D.C., 1966. Factors contributing to the variation in urinary creatinine and creatinine-nitrogen ratios in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, **25**:107-112.

ALDRICH, J.M., MULLER, L.D. e VARGA, G.A., 1993. Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **76**:1091-1105.

ALLEN, S.A. e MILLER, E.L., 1976. Determination of nitrogen requirement for microbial growth from the effect of urea supplementation of a low N diet on abomasal N flow and N recycling in wethers and lambs. *Br. J. Nutr.*, **36**:353-368.

AMARAL, D.M., CROOM JR., W.J., RAKES, A.H., LEONARD, E.S. e LINNERUD, A.C., 1985. Increased concentration of sodium chloride on milk production of cows fed low fiber diets. *J. Dairy Sci.*, **68**:2940-2947.

AMBROZIC, J., FERME, D., GRABNAR, M., RAVNIKAR, M. e AVGUSTIN, G., 2001. The bacteriophages of ruminal prevotellas. *Folia Microbiol. (Praha)*, **46**:37-39.

ANABLE, 2000. Melhoramento nacional dos bovinos leiteiros. *Publicação de Resultados*.

ANNISON, E.F. e BRYDEN, W.L., 1998. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. I. Metabolism in the rumen. *Nut. Res. Rev.*, **11**:173-198.

ANTONIEWICZ, A.M., HEINEMAN, W.W. e HANKS, E.M., 1980. The effect of changes in the intestinal flow of nucleic acids on allantoin excretion in the urine of sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **95**:395-400.

ANTONIEWICZ, A.M., HEINEMANN, W.W. e HANKS, E.M., 1981. Effect of level of feed intake and body mass on allantoin excretion and the allantoin to creatinine ratio in the urine of sheep. *Rocz. Nauk. Zoot. T.*, **8**:49-65.

ARAMBEL, M.J., BARTLEY, E.E., DENNIS, S.M., DUFVA, G.S., NAGARAJA, T.B., NUZBACK, D.E., RIDDELL, D.O., DAYTON, A.D. e GALITZER, S.J., 1987. Evaluation of several methods for estimating microbial nitrogen concentration in the rumen. *Nutr. Reports. Int.*, **35**:25-38.

ARGYLE, J.L. e BALDWIN, R.L., 1989. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. *J. Dairy Sci.*, **72**:2017-2027.

ARIELI, A., BRUCKENTAL, I. e SMOLER, E., 1989. Prediction of duodenal nitrogen supply from degradation of organic and nitrogenous matter *in situ*. *J. Dairy Sci.*, **72**:2532-2539.

ARIELI, A., MABJEESH, S., TAGARI, H., BRUCKENTAL, I. e ZAMWELL, S., 1993. Evaluation of protein flow to the duodenum in dairy cattle by the *in sacco* method. *Livest. Prod. Sci.*, **35**:283-292.

ARIELI, A., SHABI, Z., BRUCKENTAL, I., TAGARI, H., AHARONI, Y., ZAMWELL, S. e VOET, H., 1996. Effect of the degradation of organic matter and crude protein on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **79**:1774-1780.

ARMENTANO, L.E., BERTICS, S.J. e RIESTERER, J., 1993. Lack of response to addition of degradable protein to a low protein diet fed to midlactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **76**:3755-3762.

ASHES, J.R., WELCH, P.ST.V., GULATI, S.K., SCOTT, T.W., BROWN, G.H. e BLAKELEY, S., 1992. Manipulation of the fatty acid composition of milk by feeding protected canola seeds. *J. Dairy Sci.*, **75**:1090-1096.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR), 1991. Normalisation française V 03-030. Produits agricoles et alimentaires. Extraction de la matière grasse en vue de sa caractérisation. *AFNOR Publications*. 11 Avenue Francis de Pressensé. 93571 Saint Denis La Plaine Cedex. France. 11 pp. Online available: http://www.afnor.fr/.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990. Official Methods of Analysis. Vol. I. 15th ed., AOAC, Arlington, VA.

ATASOGLU, C., VALDÉS, C., WALKER, N.D., NEWBOLD, C.J. e WALLACE, R.J., 1998. De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B_14, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:2836-2843.

ATASOGLU, C., NEWBOLD, C.J. e WALLACE, R.J., 2001. Incorporation of [15]ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:2819-2822.

ATWELL, D.G., MERCHEN, N.R., JASTER, E.H., FAHEY JR., G.C., BERGER, L.L., TITGEMEYER, E.C. e BOURQUIN, L.D., 1991. Intake, digestibility, and *in situ* digestion kinetics of treated wheat straw and alfalfa mixtures fed to Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, **74**:3524-3534.

BACH, A., HUNTINGTON, G.B., CALSAMIGLIA, S. e STERN, M.D., 2000. Nitrogen metabolism of early lactation cows fed diets with two different levels of protein and different amino acid profiles. *J. Dairy Sci.*, **83**:2585-2595.

BAE, G.S., CHANG, M.B., MAENG, W.J., DEWHURST, R.J., DAVIES, D.R. e MERRY, R.J., 2000.

Variation in the concentrations of odd-chain fatty acids in rumen bacteria. *Proc. 25th Conference on Rumen Function*, Chicago, pp. 32.

BAILEY, C.B. e BALCH, C.C., 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow at rest. *Br. J. Nutr.*, **15**:383-402.

BAIRD, G.D., SYMONDS, H.W. e ASH, R., 1974. Determination of portal and hepatic metabolic production rates in the adult dairy cow. *Proc. Nutr. Soc.*, **33**:70A:71A.

BAKER, L.D., FERGUSON, J.D. e CHALUPA, W., 1995. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **78**:2424-2434.

BALCELLS, J., GUADA, J.A., CASTRILLO, C. e GASA, J., 1991. Urinary excretion of allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **116**:309-317.

BALCELLS, J., FONDEVILA, M., GUADA, J.A., CASTRILLO, C. e SURRA, J.C.E., 1993. Urinary excretions of purine derivatives and nitrogen in sheep given straw supplemented with different sources of carbohydrates. *Anim. Prod.*, **57**:287-292.

BALDWIN, R.L. e DENHAM, S.C., 1979. Quantitative and dynamic aspects of nitrogen metabolism in the rumen: a modelling analysis. *J. Anim. Sci.*, **49**:1631-1639.

BALDWIN, R.L. e KOONG, L.J., 1980. Mathematical modelling in analyses of ruminant digestive function: philosophy, methodology and application. **In**: Y. Ruckebusch e P. Thivend (eds.), *Digestive physiology and metabolism in ruminants*, MTP press, Lancaster. pp. 251-268.

BALDWIN, R.L. e ALLISON, M.J., 1983. Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.*, **57**(Supl. 2):461-477.

BALDWIN, R.L., THORNLEY, J.H.M. e BEEVER, D.E., 1987. Metabolism of the lactating cow. II. Digestive elements of a mechanistic model. *J. Dairy Res.*, **54**:107-131.

BANKS, W., CLAPPERTON, J.L., GIRDLER, A.K. e STEELE, W., 1984. Effect of inclusion of different forms of dietary fatty acid on the yield and composition of cow's milk. *J. Dairy Res.*, **51**:387-395.

BARDGETT, R.D. e HOBBS, P.J., 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass following reductions in the intensity of management of upland grass. *Biol. Fertil. Soils*, **22**:261-264.

BARNEY, D.J., GRIEVE, D.G., MACLEOD, G.K. e YOUNG, L.G., 1981a. Response of cows to a reduction in dietary crude protein from 17% to 13% during early lactation. *J. Dairy Sci.*, **64**:25-33.

BARNEY, D.J., GRIEVE, D.G., MACLEOD, G.K. e YOUNG, L.G, 1981b. Response of cows to dietary crude protein during midlactation. *J. Dairy Sci.*, **64**:655-661.

BARREFORS, P., GRANELLI, K., APPELQVIST, L.-A. e BJOERK, L., 1995. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavour. *J. Dairy Sci.*, **78**:2691-2699.

BARTLEY, E.E. e DEYOE, C.W., 1981. Reducing the rate of ammonia release by the use of alternative non-protein nitrogen sources. **In**: W. Haresign e D.J.A. Cole (eds.), *Recent developments in ruminant nutrition*, Butterworths. pp. 99-114.

BAS, P., ARCHIMÈDE, H., ROUZEAU, A. e SAUVANT, D., 2003. Fatty acid composition of mixed-rumen bacteria: effect of concentration and type of forage. *J. Dairy Sci.*, **86**:2940-2948.

BASILE, F., VOORHEES, K.J. e HADFIELD, T.L., 1995. Microorganism Gram-type differentiation based on pyrolisis-mass spectrometry of bacterial fatty acid methyl ester extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:1534-1539.

BATES, D.B. e BERGEN, W.G., 1984. Use of RNA as an internal marker of ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.*, **59**:431A.

BAUCHART, D., 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *J. Dairy Sci.*, **76**:3864-3881.

BAUCHART, D., LEGAY-CARMIER, F., DOREAU, M. e GAILLARD, B., 1990. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. *Br. J. Nutr.*, **63**:563-578.

BAUER, J.D, 1982. *Clinical laboratory methods*. Ninth edition. D. Ladig (ed.), The C.V. Mosby Company. 11830 Westline Industrial Drive. St. Louis. Missouri 63146.

BAUMAN, D.E., CORL, B.A., BAUMGARD, L.H. e GRIINARI, J.M., 1998. Trans fatty acids, conjugated linoleic acid and milk fat synthesis. *Proc. Cornell Nutr. Conf. for Feed Manufacturers*. 60th Meeting, October 20, 21, 22, Cornell University, Ithaca, NY 14853-4801. pp. 95-103.

BAUMGARD, L.H., SANGSTER, J.K. e BAUMAN, D.E., 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *Am. Soc. Nutr. Sci.*, **131**:1764-1769.

BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M. e YANG, W.Z., 1997. Effects of nonstructural carbohydrates and source of cereal grain in high concentrate diets of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:1640-1650.

BEAUCHEMIN, K.A., YANG, W.Z. e RODE, L.M., 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:378-390.

BEAULIEU, A.D., DRACKLEY, J.K. e MERCHEN, N.R., 2002. Concentrations of conjugated linoleic acid (cis-9, trans-11-octadecadienoic acid) are not increased in tissue lipids of cattle fed a high-concentrate diet supplemented with soybean oil. *J. Anim. Sci.*, **80**:847-861.

BEN-GHEDALIA, D., YOSEF, E., MIRON, J. e EST, Y., 1989. The effects of starch- and pectin-rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **24**:289-298.

BENSON, J.A., REYNOLDS, C.K., HUMPHRIES, D.J., RUTTER, S.M. e BEEVER, D.E., 2001. Effects of abomasal infusion of long-chain fatty acids on intake, feeding behaviour and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **84**:1182-1191.

BESSA, R.J.B., SANTOS-SILVA, J., RIBEIRO, J.M.R. e PORTUGAL, A.V., 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest. Prod. Sci.*, **63**:201-211.

BHATTACHANYA, A.N. e WARNER, R.G., 1968. Voluntary feed intake of pelleted diets for cattle, sheep and rabbits as affected by different alkali supplements. *J. Anim. Sci.*, **27**:1418-1425.

BICKERSTAFFE, R., NOAKES, D.E. e ANISON, E.F., 1972. Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer of milk fat in the lactating goat, with special reference to the *cis*- and *trans*- isomers of octadecenoate and linoleate. *Biochem. J.*, **120**:607-617.

BICKERSTAFFE, R., ANNISON, E.F. e LINZELL, J.L., 1974. The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **82**:71-85.

BILODEAU, P.P., PETITCLERC, D., PIERRE ST., N., PELLETIER, G. e LAURENT ST., G.J., 1989. Effects of photoperiod and pair-feeding on lactation of cows fed corn barley grain in total mixed rations. *J. Dairy Sci.*, **72**:2999-3005.

BINES, J.A. e BROWN, R.E., 1968. Incorporation of carbon from acetate and butyrate into milk components. *J. Dairy Sci.*, **51**:698-705.

BIRD, S.H. e LENG, R.A., 1978. The effects of defaunation of the rumen on the growth of cattle on low-protein high-energy diets. *Br. J. Nutr.*, **40**:163-167.

BIRD, S.H., NOLAN, J.V. e LENG, R.A., 1990. The nutritional significance of rumen protozoa. **In**: S. Hoshino, R. Onodera, H. Minarto e H. Itibashi (eds.), *The rumen ecosystem*, Springer-Verlag, Tokyo, pp. 151-160.

BLAUWIEKEL, R. e KINCAID, R.L., 1986. Effect of crude protein and solubility on performance and blood constituents of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **69**:2091-2098.

BLOCK, E., KILMER, L.H. e MULLER, L.D., 1981. Acid insoluble ash as a marker of digestibility for sheep fed corn plants or hay and for lactating dairy cattle fed hay. *J. Anim. Sci.*, **52**:1164-1169.

BOERO, P.O., BALCELLS, J., MARTÍN-ORÚE, S.M., LIANG, J.B. e GUADA, J.A., 2001. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livest. Prod. Sci.*, **68**:243-250.

BOLAND, M., MACGIBBON, A. e HILL, J., 2001. Designer milks for the new millennium. *Livest. Prod. Sci.*, **72**:99-109.

BOND, D.R. e RUSSELL, J.B., 1998. The ability of *Streptococcus bovis* to regulate its proton motive force via a mechanism involving the intracellular phosphate pool. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:976-981.

BOSS, D.L. e BOWMAN, J.G., 1996. Barley varieties for finishing steers: II. Ruminal characteristics and rate, site, and extent of digestion. *J. Anim. Sci.*, **74**:1973-1981.

BOWMAN, J.M., GRIEVE, D.G., BUCHANAN-SMITH, J.G. e MACLEOD, G.K., 1988. Response of dairy cows in early lactation to sodium hydroxide-treated soybean meal. *J. Dairy Sci.*, **71**:982-989.

BRODERICK, G.A., 1992. Relative value of fish meal versus solvent soybean meal for lactating dairy cows fed alfalfa silage as sole forage. *J. Dairy Sci.*, **75**:174-183.

BRODERICK, G.A., 1996. Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. Introduction. *J. Nutr.*, **126**(Supl.):1324-1325.

BRODERICK, G.A. e WALLACE, R.J., 1988. Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids and fluorescamine-reactive peptides in the sheep rumen. *J. Anim. Sci.*, **66**:2233-2238.

BRODERICK, G. e CRAIG, W.M., 1989. Metabolism of peptides and amino acids during *in vitro* protein degradation by mixed rumen organisms. *J. Dairy Sci.*, **72**:2540-2548.

BRODERICK, G.A. e MERCHEN, N.R., 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.*, **75**:2618-2632.

BRODERICK, G.A., SATTER, L.D. e HARPER, A.E., 1974. Use of plasma amino acid concentration to identify limiting amino acids for milk production. *J. Dairy Sci.*, **57**:1015-1023.

BRODERICK, G.A., WALLACE, R.J. e MCKAIN, N., 1988. Uptake of small neutral peptides by mixed rumen microrganisms *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.*, **42**:109-118.

BRODERICK, G.A., RICKER, D.B. e DRIVER, L.S., 1990. Expeller soybean meal and corn by-products versus solvent soybean meal for lactating dairy cows fed alfalfa silage as sole forage. *J. Dairy Sci.*, **73**:453-462.

BRODERICK, G.A., CRAIG, W.M. e RICKER, D.B., 1993. Urea versus true protein as supplement for lactating dairy cows fed grain plus mixtures of alfalfa and corn silages. *J. Dairy Sci.*, **76**:2266-2274.

BROUDISCOU, L., POCHET, S. e PONCET, C., 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **49**:189-202.

BRUCKENTAL, I., TAGARI, H., AMIR, S., KENNIT, H. e ZAMWELL, S., 1986. The effect on the performance of dairy cattle of plant protein concentration and of urea or urea-phosphate supplementation in the diet. *Anim. Prod.*, **43**:73-82.

BRUCKENTAL, I., DRORI, D., KAIM, M., LEHRER, H. e FOLMAN, Y., 1989. Effects of source and level of protein on milk yield and reproductive performance of high-producing primiparous and multiparous dairy cows. *Anim. Prod.*, **48**:319-329.

BRUCKENTAL, I., HOLTZMAN, M., KAIM, M., AHARONI, Y., ZAMWELL, S., VOET, H. e ARIELI, A.,

2000. Effect of amount of undegradable crude protein in the diets of high-yielding dairy cows on energy balance and reproduction. *Livest. Prod. Sci.*, **63**:131-140.

BRYANT, M.P., 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.*, **32**:1809-1813.

BRYANT, M.P. e ROBINSON, I.M., 1961. An improved on nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.*, **42**:1446-1456.

BRYANT, M.P. e ROBINSON, I.M., 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *J. Bacteriol.*, **84**:605-611.

BUNTING, L.D., BOLING, J.A., MACKOWN, C.T. e MUNTIFERING, R.B., 1987. Effect of dietary protein level on nitrogen metabolism in lambs: studies using ^{15}N-nitrogen. *J. Anim. Sci.*, **64**:855-867.

BUTLER, W.R., 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **81**:2533-2539.

BUTLER, W.R., 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Rep. Sci.*, **60-61**:449-457.

CABRITA, A.R.J.B., 2000. Avaliação e previsão do valor nutritivo de silagens de milho e de silagens de erva produzidas na região do Entre-Douro e Minho. *Tese de Mestrado*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 180 pp.

CABRITA, A.R.J., ABREU, J.M., MIRANDA, M.F., CERCA, M., PINTO, C., LOPES, Z. e FONSECA, A.J.M., 2003. Responses of dairy cows supplemented with a fixed amount of concentrate to whole-crop cereal or ryegrass silages. *Proc. 6th International symposium on the nutrition of herbivores*, University of Yucatan, Merida, Mexico, Tropical and Subtropical Agroecosystems, **3**:219-223.

CALSAMIGLIA, S., STERN, M.D. e FIRKINS, J.L., 1996. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, **74**:1375-1381.

CALSAMIGLIA, S., FERRET, A. e DEVANT, M., 2002. Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.*, **85**:574-579.

CAMERON, M.R., KLUSMEYER, T.H., LYNCH, G.L., CLARK, J.H. e NELSON, D.R., 1991. Effects of urea and starch on rumen fermentation, nutrient passage to the duodenum, and performance of cows. *J. Dairy Sci.*, **74**:1321-1336.

CANFIELD, R.W., SNIFFEN, C.J. e BUTLER, W.R., 1990. Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **73**:2342-2349.

CASPER, D.P. e SCHINGOETHE, D.J., 1986. Evaluation of urea and dried whey in diets of cows during early lactation. *J. Dairy Sci.*, **69**:1346-1354.

CASPER, D.P. e SCHINGOETHE, D.J., 1989. Lactational response of dairy cows to diets varying in ruminal solubilities of carbohydrate and crude protein. *J. Dairy Sci.*, **72**:928-941.

CASPER, D.P., SCHINGOETHE, D.J. e EISENBEISZ, W.A., 1990. Response of early lactation dairy cows fed diets varying in source of nonstructural carbohydrate and crude protein. *J. Dairy Sci.*, **73**:1039-1050.

CASPER, D.P., MAIGA, H.A., BROUK, M.J. e SCHINGOETHE, D.J., 1999. Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:1779-1790.

CASSEL, E.K., MERRILL, W.G., MILLIGAN, R.A. e GUEST, R.W., 1984. Evaluation of systems for feeding supplemental concentrate to cows in groups. *J. Dairy Sci.*, **67**:560-568.

CECAVA, M.J., MERCHEN, N.R., BERGER, L.L. e NELSON, D.R., 1990. Effect of energy level and feeding frequency on site of digestion and postruminal nutrient flows in steers. *J. Dairy Sci.*, **73**:2470-2479.

CHALMERS, J.S., MOISEY, F.R. e LEAVER, J.D., 1984. The performance of dairy cows with access to self-feed silage offered concentrates from a free-access dispenser. *Anim. Prod.*, **39**:17-23.

CHALUPA, W., 1968. Problems in feeding urea to ruminants. *J. Anim. Sci.*, **29**:207-219.

CHALUPA, W., 1984. Discussion of protein symposium. *J. Dairy Sci.*, **67**:1134-1146.

CHALUPA, W., ODELL, G.D., KUTCHES, A.J. e LAUKER, R., 1967. Changes in rumen chemical characteristics and protozoa populations of animals with depressed milk fat tests. *J. Dairy Sci.*, **50**:1002. P154.

CHAMBERLAIN, D.G. e CHOUNG, J.-J-, 1995. The importance of rate of ruminal fermentation of energy sources in diets for dairy cows. **In**: P.C. Garnsworthy e D.J.A. Cole (eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Nottingham, Univ. Press, UK. pp. 67-89.

CHASE, C.C.JR. e HIBBERD, C.A., 1987. Utilization of low-quality native grass hay by beef cows fed increasing quantities of corn grain. *J. Anim. Sci.*, **65**:557-566.

CHEN, G. e RUSSELL, J.B., 1989a. Transport of glutamine by *Streptococcus bovis* and conversion of glutamine to pyroglutamic acid and ammonia. *J. Bacteriol.*, **171**:2981-2985.

CHEN, G. e RUSSELL, J.B., 1989b. Sodium-dependent transport of branched-chain amino acids by a monensin-sensitive ruminal peptostreptococcus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:2658-2663.

CHEN, G. e RUSSELL, J.B., 1990. Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin-sensitive ruminal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**:2186-2192.

CHEN, G., SNIFFEN, C.J. e RUSSELL, J.B., 1987a. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *J. Dairy Sci.*, **70**:983-992.

CHEN, G., RUSSELL, J.B. e SNIFFEN, C.J., 1987b. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate-limiting step in ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.*, **70**:1211-1219.

CHEN, K.H., HUBER, J.T., THEURER, C.B., ARMSTRONG, D.V., WANDERLEY, R.C., SIMAS, J.M., CHAN, S.C. e SULLIVAN, J.L., 1993. Effect of protein quality and evaporative cooling on lactational performance of Holstein cows in hot weather. *J. Dairy Sci.*, **76**:819-825.

CHEN, K.H., HUBER, J.T., THEURER, C.B., SWINGLE, R.S., SIMAS, J., CHAN, S.C., WU, Z. e SULLIVAN, J.L., 1994. Effect of steam flaking of corn and sorghum grains on performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **77**:1038-1043.

CHEN, X.B., ØRSKOV, E.R. e HOVELL, F.D.DEB., 1990a. Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br. J. Nutr.*, **63**:121-129.

CHEN, X.B., HOVELL, F.D.DEB., ØRSKOV, E.R. e BROWN, D.S., 1990b. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br. J. Nutr.*, **63**:131-142.

CHEN, X.B., ØRSKOV, E.R. e HOVELL, F.D.DEB., 1991. The use of intragastric infusion in studies on excretion of purine derivatives as a measure of microbial protein supply in ruminants. *Proc. 6th International symposium on protein metabolism and nutrition*, **2**:67-70.

CHEN, X.B., ABDULRAZAK, S.A., SHAND, W.J. e ØRSKOV, E.R., 1992a. The effect of supplementing straw with barley or unmolassed sugar-beet pulp on microbial protein supply in sheep estimated from urinary purine derivative excretion. *Anim. Prod.*, **55**:413-417.

CHEN, X.B., CHEN, Y.K., FRANKLIN, M.F., ØRSKOV, E.R. e SHAND, W.J., 1992b. The effect of

feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J. Anim. Sci.*, **70**:1534-1542.

CHEN, X.B., MEJIA, A.T., KYLE, D.J. e ØRSKOV, E.R, 1995. Evaluation of the use of the purine derivative:creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **125**:137-143.

CHEN, X.B., SAMARAWEERA, L., KYLE, D.J. e ØRSKOV, E.R., 1996. Urinary excretion of purine derivatives and tissue xanthine oxidase (EC 1.2.3.2) activity in buffaloes (*Bubalis bubalis*) with special reference to differences between buffaloes and *Bos taurus* cattle. *Br. J. Nutr.*, **75**:397-407.

CHEN, X.B., FUJIHARA, T., NAKAMURA, K., MAWUENYEGAH, P.O., FRANKLIN, M.F. e KYLE, D.J., 1997. Response of urinary and plasma purine derivatives to various rates and infusion patterns of purines in sheep nourished by intragastric infusion. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **129**:343-352.

CHENG, K.J. e WALLACE, R.J., 1979. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flow. *Br. J. Nutr.*, **42**:553-557.

CHENG, K.-J., HIRONAKA, R., ROBERTS, D.W.A. e COSTERTON, J.W., 1973. Cytoplasmic glycogen inclusions in cells of anaerobic Gram-negative rumen bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **19**:1501-1506.

CHENG, K.-J., FAY, J.P., HOWARTH, R.E. e COSTERTON, J.W., 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**:613-625.

CHENOST, M. e DULPHY, J.P., 1987. Amélioration de la valeur alimentaire (composition, digestibilité, ingestibilité) des mauvais foins et des pailles par les differents types de traitement. **In**: C. Demarquilly (ed.), *Les fourrages secs: récolte, traitement, utilization*, Editions INRA, Paris. pp. 199-230.

CHEONG, J.P.E. e BROOKER, J.D., 1998. Lysogenic bacteriophage M1 from *Selenomonas ruminantium*: isolation, characterization and DNA sequence analysis of the integration site. *Microbiol.*, **144**:2195-2202.

CHETAL, U., MEHRA, U.R., NATH, K. e RANJHAN, S.K., 1975. On the variation of urinary creatinine in buffalo calves and the effect of dietary protein intake on urinary creatinine, creatinine-nitrogen ratio and creatinine coefficient. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **84**:1-5.

CHIKUNYA, S., NEWBOLD, C.J., RODE, L., CHEN, X.B. e WALLACE, R.J., 1996. Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **63**:333-340.

CHILLIARD, Y., 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. *J. Dairy Sci.*, **76**:3897-3931.

CHILLIARD, Y., FERLAY, A., MANSBRIDGE, R.M. e DOREAU, M., 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.*, **49**:181-205.

CHILLIARD, Y., FERLAY, A. e DOREAU, M., 2001a. Contrôle de la qualité nutritionelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières: acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. INRA *Prod. Anim.*, **14**:323-335.

CHILLIARD, Y., FERLAY, A. e DOREAU, M., 2001b. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.*, **70**:31-48.

CHOUINARD, P.Y., CORNEAU, L., BARBANO, D.M., METZGER, L.E. e BAUMAN, D.E., 1999. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.*, **129**:1579-1584.

CHOUNG, J.-J. e CHAMBERLAIN, D.G., 1995. Effects of intraruminal infusion of propionate on the concentrations of ammonia and insulin in peripheral blood of cows receiving an intraruminal infusion of urea. *J. Dairy Res.*, **62**:549-557.

CHOUNG, J.-J., CHAMBERLAIN, D.G., THOMAS, P.C. e BRADBURY, I., 1990. The effects of intraruminal infusions of urea on the voluntary intake and milk production of cows receiving grass silage diets. *J. Dairy Res.*, **57**:455-464.

CHRISTENSEN, R.A., LYNCH, G.L., CLARK, J.H. e YU, Y., 1993. Influence of amount and degradability of protein on production of milk and milk components by lactating holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **76**:3490-3496.

CHRISTIANSEN, W.C., WOODS, W. e BURROUGHS, W., 1964. Ration characteristics influencing rumen protozoal populations. *J. Anim. Sci.*, **23**:984-988.

CLAPPERTON, J.L. e BANKS, W., 1985. Factors affecting the yield of milk and its constituents, particularly fatty acids, when dairy cows consume diets containing added fat. *J. Sci. Food Agric.*, **36**:1205-1211.

CLARK, J.H. e DAVIS, C.L., 1980. Some aspects of feeding high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **63**:873-885.

CLARK, J.H., KLUSMEYER, T.H. e CAMERON, M.R., 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **75**:2304-2323.

CLAY, A.B. e SATTER, L.D., 1979. Milk production response to dietary protein and methionine hydroxy analog. *J. Dairy Sci.*, **62**(Supl.):75.

CLAYPOOL, D.W., PANGBORN, M.C. e ADAMS, H.P., 1980. Effect of dietary protein on high-producing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **63**:833-837.

CLEGG, R.A., BARBER, M.C., POOLEY, L., ERNENS, I., LARONDELLE, Y. e TRAVERS, M.T., 2001. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. *Livest. Prod. Sci.*, **70**:3-14.

COLEMAN, G.S., 1985. The cellulase content of 15 species of entodiniomorph protozoa, mixed bacteria, and plant debris isolated from ovine rumen. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **104**:349-360.

COLEMAN, G.S., 1989. Protozoal-bacterial interaction in the rumen. **In**: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (eds.), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, Penambul Books, Armidale, Australia. pp. 13-28.

COLEMAN, G.S., 1992. The rate of uptake and metabolism of starch grains and cellulose particles by *Entodinium* species, *Eudiplodinium maggii*, some other entodiniomorphid protozoa and natural protozoal populations taken from the ovine rumen. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**:507-513.

COLEMAN, G.S. e SANDFORD, D.C., 1980. The uptake and metabolism of bacteria, amino acids, glucose and starch by the spined and spineless forms of the rumen ciliate *Entodinium caudatum*. *J. Gen. Microbiol.*, **117**:411-418.

COLLOMB, M., BÜTIKOFER, U., SPAHNI, M., JEANGROS, B. e BOSSET, J.O., 1999. Composition en acides gras et en glycérides de la matière grasse du lait de vache en zones de montagne et de plaine. *Sciences des Aliments*, **19**:97-110.

COLOVOS, N.F., HOLTER, J.B., DAVIS, H.A. e URBAN JR., W.E., 1967. Urea for lactating dairy cattle. I. Effect of concentrate fiber and urea levels on nutritive value of the ration. *J. Dairy Sci.*, **50**:518-522.

COM(1998)353. Alterações climáticas – Para uma estratégia da UE pós-Quioto. *Comunicação da comissão ao conselho e ao parlamento europeu.*

COM(1999)230. A preparação para a implementação do Protocolo de Quioto. *Comunicação da comissão ao conselho e ao parlamento europeu.* 42 pp.

COOPER, R.A., 1984. Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.*,

38:49-68.

COOPER, R.A. e ANDERSON, A., 1970. The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **11**:273-276.

COPPOCK, C.E. e WILKS, D.L., 1991. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *J. Anim. Sci.*, **69**:3826-3837.

COSTA, N.D., MCINTOSH, G.H. e SNOSWELL, A.M., 1976. Production of endogenous acetate by the liver in lactating ewes. *Aust. J. Biol. Sci.*, **29**:33-42.

COSTERTON, J.W., DAMGAARD, H.D. e CHENG, K.-J., 1974. Cell envelope morphology of rumen bacteria. *J. Bacteriol.*, **118**:1132-1143.

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

COTTA, M.A. e HESPELL, R.B., 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**:51-58.

CRAIG, M., BRODERICK, G. e RICKER, B., 1987. Quantitation of the microrganisms associated with the particulate phase of ruminal digesta. *J. Nutr.*, **117**:56-62.

CRESSMAN, S.G., GRIEVE, D.G., MACLEOD, G.K., WHEELER, E.E. e YOUNG, L.G., 1980. Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **63**:1839-1847.

CROCKER, L.M., DEPETERS, E.J., FADEL, J.G., PEREZ-MONTI, H., TAYLOR, S.J., WYCKOFF, J.A. e ZIN, R.A., 1998. Influence of processed corn grain in diets of dairy cows on digestion of nutrients and milk composition. *J. Dairy Sci.*, **81**:2394-2407.

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

CZERKAWSKI, J.W., 1986. An introduction to rumen studies. *Pergamon Pre*ss, New York.

DANIELS, Z.M., CHEN, X.B., KYLE, D.J., SINCLAIR, K. e ØRSKOV, E.R., 1994. Purine derivatives in urine and plasma of lactating cows given different levels of food intake. *Anim. Prod.*, **58**:453A.

DAVIES, Z.D., BROOKS, A.E., GRIFFITHS, A.E. e THEODOROU, G.W., 1998. Assessment of fermentation characteristics of ruminant foods using an automated pressure evaluation system. **In**: Deauville, E.R., Owen, E., Adesogan, A.T., Rymer, C., Huntingdon, J., Lawrence, T.L.J. (eds), *In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants, Br. Soc. Anim. Sci., Occasional Publication* N°. 22, pp. 190-192.

DAVIS, S.R. e COLLIER, R.J., 1985. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. *J. Dairy Sci.*, **68**:1041-1058.

DAWSON, J. M., 1999. Variation in nutrient supply and effects on whole body anabolism. **In**: G. E. Lobley, A. White e J. C. MacRae (eds.), *Proc. VIIIth Int. Symp. on Protein Metabolism and Nutrition*, Aberdeen, UK, EAAP Publ. No. **96**:101-126.

DAWSON, J.M., BRUCE, C.I., BUTTERY, P.J., GILL, M. e BEEVER, D.E., 1988. Protein metabolism in the rumen of silage-fed steers: effect of fishmeal supplementation. *Br. J. Nutr.*, **60**:339-353.

DE GRACIA, M., OWEN, F.G. e LOWRY, S.R., 1989. Corn gluten meal and blood meal mixture for dairy cows in midlactation. *J. Dairy Sci.*, **72**:3064-3069.

DE GROOT, T.H. e AAFJES, J.H., 1960. On the constancy of creatinine excretion in the urine of the dairy cow. *Br. Vet. J.*, **116**:409-418.

DE PETERS, E.J. e TAYLOR, S.J., 1985. Effects of feeding corn or barley on composition of milk and diet digestibility. *J. Dairy Sci.*, **68**:2027-2032.

DE SMET, A.M., DEMEYER, D.I. e VAN NEVEL, C.J., 1992. Effect of defaunation and hay:concentrate ratio on fermentation, fibre digestion and passage in the rumen of sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **37**:333-344.

DE VISSER, H., 1993. Characterization of carbohydrates in concentrates for dairy cows. **In**: P.C. Garnsworthy e D.J.A. Cole (eds.), *Recent advances in animal nutrition*, Nottingham. pp. 19-38.

DEGREGORIO, R.M., TUCKER, R.E., MITCHELL, G.E.JR. e GILL, W.W., 1982. Carbohydrate fermentation in the large intestine of lambs. *J. Anim. Sci.*, **54**:855-862.

DEHORITY, B.A. e TIRABASSO, P.A., 2001. Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, pH, and other parameters in the rumen. *J. Anim. Sci.*, **79**:2908-2912.

DELAQUIS, A.M. e BLOCK, E., 1995a. The effects of changing ration ingredients on acid-base status, renal function, and macromineral metabolism. *J. Dairy Sci.*, **78**:2024-2039.

DELAQUIS, A.M. e BLOCK, E., 1995b. Dietary anion-cation difference, acid-base status, mineral metabolism, renal function, and milk production of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **78**:2259-2284.

DEMEYER, D.I., 1989. Effect of defaunation on rumen fibre digestion and digesta kinetics. **In**: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (eds.), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, Penambul Books, Armidale, Australia, pp. 171-180.

DEMEYER, D.I. e VAN NEVEL, C.J., 1979. Effect of defaunation on the metabolism of rumen microorganisms.. *Br. J. Nutr.*, **42**:515-524.

DEMEYER, D. e VAN NEVEL, C., 1986. Influence of substrate and microbial interaction on efficiency of rumen microbial growth. *Reprod. Nutr. Dev.*, **26**:161-179.

DEMEYER, D. e DOREAU, M., 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proc. Nutr. Soc.*, **58**:593-607.

DENNIS, S.M., ARAMBEL, M.J., BARTLEY, E.E. e DAYTON, A.D., 1983. Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci.*, **66**:1248-1254.

DEPARDON, N., DEBROAS, D. e BLANCHART, G., 1995. Breakdown of peptides from a soya protein hydrolisate by rumen bacteria. Simultaneous study of enzyme activities and of two physico-chemical parameters: molecular weight and hydrophobicity. *J. Sci. Food Agric.*, **68**:25-81.

DEPARDON, N., DEBROAS, D. e BLANCHART, G., 1996. Breakdown of peptides from a casein hydrolysate by rumen bacteria. Simultaneous study of enzyme activities and physicochemical parameters. *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**:457-466.

DEPETERS, E.J. e CANT, J.P., 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.*, **75**:2043-2070.

DEPETERS, E.J., FREEDEN, A.H., BATH, D.L. e SMITH, N.E., 1984. Effect of sodium bicarbonate addition to alfalfa hay-based diets on digestibility of dietary fractions and rumen characteristics. *J. Dairy Sci.*, **67**:2384-2355.

DEVANT, M., FERRET, A., CALSAMIGILIA, S., CASALS, R. e GASA, J., 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **79**:1944-1953.

DEWHURST, R.J. e WEBSTER, A.J.F., 1992a. Effects of diet, level of intake, sodium bicarbonate and monensin on urinary allantoin excretion in sheep. *Br. J. Nutr.*, **67**:345-353.

DEWHURST, R.J. e WEBSTER, A.J.F., 1992b. A note on the effect of plane of nutrition on fractional outflow rates from the rumen and urinary allantoin excretion by wether sheep. *Anim. Prod.*, **54**:445-448.

DEWHURST, R.J., MILTON, A.M., OFFER, N.W. e THOMAS, C., 1996. Effects of the composition of grass silages on milk production and nitrogen utilization by dairy cows. *Anim. Sci.*, **62**:25-34.

DEWHURST, R.J., LEWIS, S.N., DHANOA, M.S. e EVANS, R.T., 1997. Comparison of urinary purine derivative excretion with the flow of purine bases at the duodenum of lactating dairy cows. *Proc. Nutr. Soc.*, **56**:185A.

DEWHURST, R.J., DAVIES, D.R. e MERRY, R.J., 2000a. Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **85**:1-21.

DEWHURST, R.J., TWEED, J.K.S. e WILLIAMS, G.B., 2000b. Variation in the concentrations of odd-chain fatty acids. *Proc. 25th Conference on Rumen Function*, Chicago. pp 29.

DEWHURST, R.J., WADHWA, D., BORGIDA, L.P. e FISHER, W.J., 2001. Rumen acid production from dairy feeds. 1. Effects on feed intake and milk production of dairy cows offered grass or corn silage. *J. Dairy Sci.*, **84**:2721-2729.

DEWHURST, J., MOORBY, J.M., DANELÓN, J. e TWEED, J.K., 2002. Effect of diet forage:concentrate ratio on odd-chain fatty acids in milk from holstein-friesian cows. *J. Dairy Sci.*, **85**(Supl.):318A.

DHIMAN, T.R. e SATTER, L.D., 1993. Protein as the first-limiting nutrient for lactating dairy cows fed high proportions of good quality alfalfa silage. *J. Dairy Sci.*, **76**:1960-1971.

DHIMAN, T.R., VAN ZANTEN, K. e SATTER, L.D., 1995. Effect of dietary fat source on fatty acid composition of cow's milk. *J. Sci. Food Agric.*, **69**:101-107.

DHIMAN, T.R., ANAND, G.R., SATTER, L.D. e PARIZA, M.W., 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.*, **82**:2146-2156.

DHIMAN, T.R., ZAMAN, M.S., MACQUEEN, I.S. e BOMAN, R.L., 2002. Influence of corn processing and frequency of feeding on cow performance. *J. Dairy Sci.*, **85**:217-226.

DIAS DA SILVA, A.A., 1999. A alimentação da vaca leiteira no virar do milénio – do conhecimento científico à aplicação prática. *IX Congresso de Zootecnia*, Exponor.

DIEDRICH, M. e HENSCHEL, K.-P., 1990. The natural occurrence of unusual fatty acids. Part 1. Odd numbered fatty acids. *Die Nahrung*, **10**:935-943.

DIJKSTRA, J., 1994. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. *Br. J. Nutr.*, **72**:679-699.

DIJKSTRA, J., NEAL, H.D.ST.C., BEEVER, D.E. e FRANCE, J., 1992. Simulation of nutrient digestion, absorption, and outflow in the rumen: Model description. *J. Nutr.*, **122**:2239-2256.

DIJKSTRA, J., FRANCE, J., NEAL, H.D.ST.C., ASSIS, A.G., AROEIRA, L.J.M. e CAMPOS, O.F., 1996. Simulation of digestion in cattle fed sugar cane: model development. *J. Agric. Sci.*, **127**:231-246.

DIJKSTRA, J., FRANCE, J. e TAMMINGA, S., 1998. Quantification of the recycling of microbial nitrogen in the rumen using a mechanistic model of rumen fermentation processes. *J. Agric. Sci., (Camb.)*, **130**:81-94.

DIJKSTRA, J., FRANCE, J., TAMMINGA, S. e MILLS, J.A.N., 2003. Predicting the yield of nutrientes from microbial metabolism in the rumen. Matching herbivore nutrition to ecosystems biodiversity. L.'t Mannetje, L. Ramírez-Avilés, C. Sandoval-Castro e J.C. Ku-Vera (eds), *Proc. VI International Symposium on the Nutrition of Herbivores*, Mérida, México. pp 101-127.

DINN, N.E.M., SHELFORD, J.A. e FISHER, L.J., 1998. Use of the Cornell net carbohydrate and protein system and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **81**:229-237.

DINSDALE, D., CHENG, K.-J., WALLACE, R.J. e GOODLAG, R.A., 1980. Digestion of epithelial tissue of the rumen wall by adherent bacteria in infused and conventionally fed sheep. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**:1059-1066.

DIRECTIVA 91/676/CEE do Conselho, de 12 de Dezembro de 1991, relativa à protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola. *Jornal Oficial das Comunidades*

Europeias, L **375**:1-8.

DIRECTIVA 98/83/CE do Conselho, de 3 de Novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L **330**:32-54.

DIXON, R.M., 1986. Effects of dietary concentrates on rumen digestion of fibrous feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **14**:193-202.

DJOUVINOV, D.S. e TODOROV, N.A., 1994. Influence of dry matter intake and passage rate on microbial protein synthesis in the rumen of sheep and its estimation by cannulation and a non-invasive method. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **48**:289-304.

DJOUVINOV, D. e TODOROV, N., 1995. Effect of feeding level and diet composition on microbial protein synthesis and *in vivo* feed protein degradability in the rumen of sheep. *Ann. Zootech.*, **44**(Supl):224.

DJOUVINOV, D.S., NAKASHIMA, Y., TODOROV, N. e PAVLOV, D., 1998. In situ degradation of feed purines. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **71**:67-77.

DOREAU, M. e FERLAY, A., 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **45**:379-396.

DOREAU, M. e CHILLIARD, Y., 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev.*, **37**:113-124.

DOU, Z., KOHN, R.A., FERGUSON, J.D., BOSTON, R.C. e NEWBOLD, J.D., 1996. Managing nitrogen on dairy farms: an integrated approach. I. Model description. *J. Dairy Sci.*, **79**:2071-2080.

DOYLE, R.J., CHALOUPKA, J. e VINTER, V., 1988. Turnover of cell walls in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, **52**:554-567.

DRACKLEY, J.K., BEAULIEU, A.D. e ELLIOTT, J.P., 2001. Responses of milk fat composition to dietary fat or nonstructural carbohydrates in Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.*, **84**:1231-1237.

DUNLAP, T.F., KOHN, R.A., DOUGLASS, L.W. e ERDMAN, R.A., 2000. Diets deficient in rumen undegraded protein did not depress milk production. *J. Dairy Sci.*, **83**:1806-1812.

DZIERZEWICZ, Z., CWALINA, B., KURKIEWICZ, S., CHODUREK, E. e WILCZOK, T., 1996. Intraspecies variability of cellular fatty acids among soil and intestinal species of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:3360-3365.

EADIE, J.M. e MANN, S.O., 1970. Development of the rumen microbial population: high starch diets and instability. **In**: A.T. Phillipson (ed.), *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*, Proc. 3rd International symposium, Cambridge, England, Oried Press, New Castle. pp. 335-347.

EDWARDS, J.S. e BARTLEY, E.E., 1979. Soybean meal or starea for microbial protein synthesis or milk production with rations above thirteen percent natural protein. *J. Dairy Sci.*, **62**:732-739.

EDWARDS, J.S., BARTLEY, E.E. e DAYTON, A.D., 1980. Effects of dietary protein concentration on lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **63**:243-248.

ELROD, C.C., VAN AMBURGH, M. e BUTLER, W.R., 1993. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J. Anim. Sci.*, **71**:702-706.

EL-SHAZLY, K., DEHORITY, B.A. e JOHNSON, R.R., 1961. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.*, **20**:268-273.

EMANUELSON, M., MURPHY, M. e LINDBERG, J.-E., 1991. Effects of heat-treated and untreated full-fat rapeseed and tallow on rumen metabolism, digestibility, milk composition and milk yield in lactating cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **34**:291-309.

ENJALBERT, F., NICOT, M.-C., BAYOURTHE, C. e MONCOULON, R., 1998. Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in

lactating dairy cows. *J. Nutr.*, **128**:1525-1532.

ERB, R.E., SURVE, A.H., RANDEL, R.D. e GARVERICK, H.A., 1977. Urinary creatinine as an index of urinary excretion of estrogen in cows prepartum and postpartum. *J. Dairy Sci.*, **60**:1057-1063.

ERDMAN, R.A., 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. *J. Dairy Sci.*, **71**:3246-3266.

ERDMAN, R.A., HEMKEN, R.W. e BULL, L.S., 1982. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early post partum lactating dairy cows: effects on production, acid-base metabolism, and digestion. *J. Dairy Sci.*, **65**:712-731.

ERDMAN, R.A., PROCTOR, G.H. e VANDERSALL, J.H., 1986. Effect of rumen ammonia concentration on *in situ* rate and extent of digestion of feedstuffs. *J. Dairy Sci.*, **69**:2312-2320.

ERFLE, J.D., SAUER, F.D. e FISHER, L.J., 1974. Interrelationships between milk carnitine and blood and milk components and tissue carnitine in normal and ketotic cows. *J. Dairy Sci.*, **57**:671-676.

ERFLE, J.D., SAUER, F.D. e MAHADEVAN, S., 1977. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.*, **60**:1064-1072.

ERFLE, J.D., BOILA, R.J., TEATHER, R.M., MAHADEVAN, S. e SAUER, F.D., 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, **65**:1457-1464.

ERIKSSON, L. e VALTONEN, M., 1982. Renal urea handling in goats fed high and low protein diets. *J. Dairy Sci.*, **65**:385-389.

ESTEVES, S.N., MANZANO, A. e NOVAES, N.J., 1987. Substituição da espiga de milho desintegrada com palha e sabugo pela polpa de citrus peletizada na engorda de bovinos cachim. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, **16**:507-516.

FAVERDIN, P., DELABY, L., VÉRITÉ, R. e MARQUIS, B., 1998. Effect de la teneur en proteins et en aliments concentrés d'une ration complète à base d'ensilage de maïs sur l'ingestion et la production laitière de vaches laitières en début de lactation. *Renc. Rech. Ruminants*, **5**:263.

FAVERDIN, P., THÉNARD, V., MARCANT, O. e TROMMERSCHLAGER, J.M., 2002. Equilibre énergétique et protéique de rations complètes à base d'herbe conservée pour des vaches laitières en début de lactation. *Renc. Rech. Ruminants*, **9**:291-294.

FAVERDIN, P., M'HAMED, D., RICO-GOMEZ, M. e VÉRITÉ, R., 2003. La nutrition azotée influence l'ingestion chez la vache laitière. *INRA Prod. Anim.*, **16**:27-37.

FELLNER, V., PHILLIP, L.E. e GARINO, H., 2000. Evaluation of the potential protein-sparing effects of sodium bicarbonate when added to grass silage for growing steers. *Can. J. Anim. Sci.*, **80**:131-136.

FERLAY, A., CHILLIARD, Y. e DOREAU, M., 1992. Effects of calcium salts differing in fatty acid composition on duodenal and milk fatty acid profiles in dairy cows. *J. Sci. Food Agric.*, **60**:31-37.

FERREIRA, L.M.M., 2002. Estudo comparativo de marcadores na determinação da digestibilidade *in vivo* em bovinos da raça barrosã e da raça frísia. *Tese de Mestrado*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 122 pp.

FIRKINS, J.L., 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J. Nutr.*, **126**:1347S-1354S.

FLATT, W.P., WARNER, R.G. e LOOSLI, J.K., 1958. Influence of purified materials on the development of the ruminant forestomach. *J. Dairy Sci.*, **41**:1593-1600.

FOLDAGER, J. e HUBER, J.T., 1979. Influence of protein percent and source on cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **62**:954-964.

FOLMAN, Y., NEUMARK, H., KAIN, M. e KAUFMAN, W., 1981. Performance, rumen and blood metabolites of high-yielding cows fed varying protein percents and protected soybean. *J. Dairy Sci.*, **64**:759-768.

FONSECA, A.J.M., DIAS-DA-SILVA, A.A. e LOURENÇO, A.L.G., 2001. Effects of maize and citrus-pulp supplementation of urea-treated wheat straw on intake and productivity in female lambs. *Anim. Sci.*, **73**:123-136.

FORSBERG, C.W., LOVELOCK, L.K., KRUMHOLZ L. e BUCHANAN-SMITH, J.G., 1984. Protease activities of rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**:101-110.

FORSHELL, L.P., 1993. Composting of cattle and pig manure. *Zentralbl Veterinarmed* [B], **40**:634-640.

FORSTER JR., L.A., GOETSCH, A..L., GALLOWAY SR., D.L. e JOHNSON, Z.B., 1993. Feed intake, digestibility, and live weight gain by cattle consuming forage supplemented with rice bran and(or) corn. *J. Anim. Sci.*, **71**:3105-3114.

FORSTER, R.J., GRIEVE, D.G., BUCHANAN-SMITH, J.G. e MACLEOD, G.K., 1983. Effect of dietary protein degradability on cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **66**:1653-1662.

FRANZOLIN, R. e DEHORITY, B.A., 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.*, **74**:2803-2809.

FRAVEL, H.N.A. e MCBRIEN, B.C.H., 1980. The effect of methylglyoxal on cell division and the synthesis of protein and DNA in synchronous and asynchronous cultures of *Escherichia coli*. *Br. J. Gen. Microbiol.*, **117**:127-134.

FREDEEN, A.H., 1996. Considerations in the nutritional modification on milk composition. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **59**:185-197.

FREEDBERG, W.B., KISTLER, W.S. e LIN, E.C.C., 1971. Lethal synthesis of methylglyoxal by *Escherichia coli* during unregulated glycerol metabolism. *J. Bacteriol.*, **108**:137-144.

FRENCH, N. e KENNELLY, J.J., 1990. Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **73**:1857-1863.

FU, C.J., FELTON, E.D., LEHMKUHLER, J.W. e KERLEY, M.S., 2001. Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.*, **79**:1305-1312.

FUJIHARA, T., ØRSKOV, E.R., REEDS, P.J. e KYLE, D.J., 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric infusion. *J. Agric. Sci.*, **109**:7-12.

FURCHTENICHT, J.E. e BRODERICK, G.A., 1987. Effect of inoculum preparation and dietary energy on microbial numbers and rumen protein degradation activity. *J. Dairy Sci.*, **70**:1404-1410.

GALLOWAY SR., D.L., GOETSCH, A.L., FORSTER JR., L.A., BRAKE, A.C. e JOHNSON, Z.B., 1993. Digestion, feed intake, and live weight gain by cattle consuming bermudagrass and supplemented with different grains. *J. Anim. Sci.*, **71**:1288-1297.

GALYEAN, M.L. e OWENS, F.N., 1991. Effects of diet composition and level of feed intake on site and extent of digestion in ruminants. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: Proc. of the seventh international symposium on ruminant physiology*. pp. 483-513.

GANEV, G., ØRSKOV, E.R. e SMART, R., 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *J. Agric. Sci.*, **93**:651-656.

GARCÍA, S.C., SANTINI, F.J. e ELIZALDE, J.C., 2000. Sites of digestion and bacterial protein synthesis in dairy heifers fed fresh oats with or without corn or barley grain. *J. Dairy Sci.*, **83**:746-755.

GARTON, G.A., LOUGH, A.K. e VIOQUE, E., 1961. Glycerid hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *J. Gen. Microbiol.*, **25**:215.

GAYNOR, P.J., WALDO, D.R., CAPUCO, A.V., ERDMAN, R.A., DOUGLASS, L.W. e TETER, B.B., 1995. Milk fat depression, the glucogenic theory, and *trans*-$C_{18:1}$ fatty acids. *J. Dairy Sci.*, **78**:2008-2015.

GERSON, T., JOHN, A., SHELTON, I.D. e SINCLAIR, B.R., 1982. Effects of dietary N on the lipids of rumen digesta, plasma, liver, muscle and perirenal fat in sheep. *J. Agric. Sci.* (*Camb.*), **99**:71-78.

GERSON, T., JOHN, A. e SINCLAIR, B.R., 1983. The effect of dietary N on *in vitro* lipolysis and fatty acid hydrogenation in rumen digesta from sheep fed diets high in starch. *J. Agric. Sci.* (*Camb.*), **101**:97-101.

GERSON, T., JOHN, A. e KING, A.S.D., 1985. The effects of dietary starch and fibre on the *in vitro* rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *J. Agric. Sci.* (*Camb.*), **105**:27-30.

GERSON, T., JOHN, A. e KING, A.S.D., 1986. Effects of feeding ryegrass of varying maturity on the metabolism and composition of lipids in the rumen of sheep. *J. Agric. Sci.* (*Camb.*), **106**:445-448.

GERSON, T., KING, A.S.D., KELLY, K.E. e KELLY, W.J., 1988. Influence of particle size and surface area on *in vitro* rates of gas production, lipolysis of triacylglycerol and hydrogenation of linoleic acid by sheep rumen digesta or *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Agric. Sci.* (*Camb.*), **110**:31-37.

GIBSON, J.P., 1984. The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. *Anim. Prod.*, **38**:181-189.

GIESECKE, D., STANGASSINGER, M. e TIEMEYER, W., 1984. Nucleic acid digestion and urinary purine metabolites in sheep nourished by intragastric infusions. *Can. J. Anim. Sci.*, **64**(Supl.):144-145.

GIESECKE, D., EHRENTREICH, L., STANGASSINGER, M. e AHRENS, F., 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **77**:2376-2381.

GIETZEN, D.W., 1993. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.*, **123**:610-625.

GILL, M. e ROBINSON, P., 1995. Diurnal patterns in crude protein and amino acid flow in the duodenum and the influence of time of feeding a protein meal to lactating cows. *Ann. Zootech.*, **44**(Supl.):230.

GIRARD, V. e HAWKE, J.C., 1978. The role of holotrichs in the metabolism of dietary linoleic acid in the rumen. *Biochim. Biophys. Acta*, **528**:17-27.

GIVENS, D.I., 1990. The digestibility of maize silage – an update. *Proc. 2nd Annual conference of the maize growers association*. Maize Growers Association, Reading, UK.

GOERING, H.K., WREN, T.R., EDMONDSON, L.F., WEYANT, J.R., WOOD, D.L. e BITMAN, J., 1977. Feeding polyunsaturated vegetable oils to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **60**:739-747.

GOMES, M.J.M., 2001. Eficiência de utilização de alimentos fibrosos em ovinos da raça churra da terra quente. A suplementação e o genótipo como factores de variação. *Tese de Doutoramento*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 406 pp.

GOMES, M.J., HOVELL, F.D.DEB., CHEN, X.B., NENGOMASHA, E.M. e FIKREMARIAM, D., 1994. The effect of starch supplementation of straw on microbial protein supply in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **49**:277-286.

GONDA, H.L. e LINDBERG, J.E., 1994. Evaluation of dietary nitrogen utilization in dairy cows based on urea concentrations in blood, urine and milk, and on urinary concentration of purine

derivatives. *Acta Agric. Scand. Sect. A Anim. Sci.*, **44**:236-245.

GONDA, H.L. e LINDBERG, J.E., 1997. Effect of diet on milk allantoin and its relationship with urinary allantoin in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:364-373.

GONDA, H.L., EMANUELSON, M. e MURPHY, M., 1996. The effect of roughage to concentrate ratio in the diet on nitrogen and purine metabolism in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **64**:27-42.

GORDON, F.J., 1977. The effect of protein content on the response of lactating cows to level of concentrate feeding. *Anim. Prod.*, **20**:181-191.

GORDON, F.J. e FORBES, T.J., 1970. The associative effect of level of energy and protein intake in the dairy cow. *J. Dairy Res.*, **37**:481-491.

GRANT, R.J. e MERTENS, D.R., 1992. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. *J. Dairy Sci.*, **75**:2762-2768.

GREENHALGH, J.F.D., REID, G.W. e SARMIENTO, E.A., 1979. The utilization by dairy cows of rations given as complete diets or separate feeds. *Proc. of the 30th annual meeting of the European Association for Animal Production*, Arrógate. pp. 1-4.

GRIGSBY, K.N., KERLEY, M.S., PATERSON, J.A. e WEIGEL, J.C., 1993. Combinations of starch and digestible fiber in supplements for steers consuming a low-quality bromegrass hay diet. *J. Anim. Sci.*, **71**:1057-1064.

GRINGS, E.E., ROFFLER, R.E. e DEITELHOFF, D.P., 1991. Response of dairy cows in early lactation to additions of cottonseed meal in alfalfa-based diets. *J. Dairy Sci.*, **74**:2580-2587.

GRINGS, E.E., ROFFLER, R.E. e DEITELHOFF, D.P., 1992a. Evaluation of corn and barley as energy sources for cows in early lactation fed alfalfa-based diets. *J. Dairy Sci.*, **75**:193-200.

GRINGS, E.E., ROFFLER, R.E. e DEITELHOFF, D.P., 1992b. Responses of dairy cows to additions of distillers dried grains with solubles in alfalfa-based diets. *J. Dairy Sci.*, **75**:1946-1953.

GRISWOLD, K.E. e MACKIE, R.I., 1997. Degradation of protein and utilization of the hydrolytic products by a predominant ruminal bacterium, *Prevotella ruminicola* B_14. *J. Dairy Sci.*, **80**:167-175.

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

GRISWOLD, K.E., WHITE, B.A. e MACKIE, R.I., 1999. Proteolytic activities of the starch-fermenting bacterium, *Streptococcus bovis*. *Curr. Microbiol.*, **39**:180-186.

GRUMMER, R.R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, **74**:3244-3257.

GRUMMER, R.R., LUCK, M.L. e BARMORE, J.A., 1994. Lactational performance of dairy cows fed raw soybeans, with or without animal by-product proteins, or roasted soybeans. *J. Dairy Sci.*, **77**:1354-1359.

GRUMMER, R.R., SLARK, K., BERTICS, S.J., LUCK, M.L. e BARMORE, J.A., 1996. Soybeans versus animal sources of rumen-undegradable protein and fat for early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **79**:1809-1816.

GUEDES, C.V.M., 2001. Degradação *in sacco* da fracção azotada dos alimentos no rúmen. A natureza dos glúcidos da dieta como factor de variação e as técnicas *in vitro* como instrumento de previsão. *Tese de Doutoramento*, Universidade de Trás-os-Montes de Alto Douro, Vila Real, 359 pp.

GUTIERREZ, J., WILLIAMS, P.P., DAVIS, R.E. e WARWICK, E.S., 1962. Lipid metabolism of rumen ciliates and bacteria. 1. Uptake of fatty acids by isotricha prostoma and entodinium simples. *Appl. Microbiol.*, **10**:548-551.

HA, J.K. e KENELLY, J.J., 1984. Effect of protein on nutrient digestion and milk production by

Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **67**:2302-2307.

HACKETTE, S.L., SKYE, G.E., BURTON, C. e SEGEL, I.H., 1970. Characterization of an ammonia transport system in filamentous fungi with methylammonium-^{14}C. *J. Biol. Chem.*, **245**:4241-4250.

HADSELL, D.L. e SOMMERFELDT, J.L., 1988. Chickpeas as a protein and energy supplement for high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **71**:762-772.

HAGEMEISTER, H., LUPPING, W. e KAUFNMANN, W., 1981. Microbial protein synthesis and digestion in the high-yielding dairy cow. **In**: W. Haresign e D.J.A. Cole (eds.), *Recent developments in ruminant nutrition*, Butterworths, pp. 31-48.

HAIGH, P.A., MUTSVANGWA, T., SPRATT, R. e MCBRIDE, B.W., 2002. Effects of dietary protein solubility on nitrogen losses from lactating dairy cows and comparison with predictions from the cornell net carbohydrate and protein system. *J. Dairy Sci.*, **85**:1208-1217.

HANNAFORD, M.C., LEITER, L.A., JOSSE, R.G., GOLDSTEIN, M.B., MARLISS, E.B. e HALPERIN, M.L., 1982. Protein wasting due to acidosis of prolonged fasting. *Am. J. Physiol.*, **243**:E251-256.

HANSEN, H.O. e KNUDSEN, J., 1987. Effect of exogenous long-chain fatty acids on lipid biosynthesis in dispersed ruminant mammary gland epithelial cells: esterification of long-chain exogenous fatty acids. *J. Dairy Sci.*, **70**:1344-1349.

HAO, X., CHANG, C., LARNEY, F.J. e TRAVIS, G.R., 2002. Greenhouse gas emissions during cattle feedlot manure composting. *J. Environ. Qual.*, **30**:376-386.

HARFOOT, C.G. e HAZLEWOOD, G.P., 1997. Lipid metabolism in the rumen. **In**: P.N. Hobson e C.S. Stewart (eds.), *The rumen microbial ecosystem*, Blackie Acad. Prof., London, pp. 382-426.

HARROP, C.J.F. e PHILLIPSON, A.T., 1971. The effects of diet and pentagastrin on the influx of urea into the rumen of sheep. *Proc. Nutr. Soc.*, **30**:3A-4A.

HARROP, C.J.F. e PHILLIPSON, A.T., 1974. Nitrogen metabolism in the ovine stomach. 1. The transfer of urea from the blood to the rumen. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **82**:399-408.

HAVASSY, I., BODA, K., KOSTA, K., KUCHAR, S. e RYBOSOVA, E., 1974. Passage of 15N-labelled urea nitrogen from the blood into the sheep rumen and its recirculation. *Physiol. Bohemoslov.*, **23**:277-287.

HAWKE, J.C. e SILCOOK, W.R., 1970. The *in vitro* rates of lipolysis and biohydrogenation in rumen contents. *Biochim. Biophys. Acta*, **218**:201-212.

HAZLEWOOD, G.P. e EDWARDS, R., 1981. Proteolytic activities of a rumen bacterium, *Bacteroides ruminicola* R8/4. *J. Gen. Microbiol.*, **125**:11-15.

HAZLEWOOD, G.P., JONES, G.A. e MANGAN, J.L., 1981. Hydrolysis of leaf fraction 1 protein by the proteolytic rumen bacterium *Bacteroides ruminicola* R8/4. *J. Gen. Microbiol.*, **123**:223-232.

HAZLEWOOD, G.P., ORPIN, C.G., GREENWOOD, Y. e BLACK, M.E., 1983. Isolation of proteolytic rumen bacteria by use of selective medium containing leaf fraction 1 protein (ribulosebisphosphate carboxylase). *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**:1780-1784.

HELMER, L.G. e BARTLEY, E.E., 1971. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants. A review. *J. Dairy Sci.*, **54**:25-51.

HENDERSON, C. e HODGKISS, W., 1973. An electron microscopic study of *Anaerovibrio lipolytica* (strain 5s) and its lipolytic enzyme. *J. Gen. Microbiol.*, **76**:389-393.

HENDERSON, S.J., AMOS, H.E. e EVANS, J.J., 1985. Influence of dietary protein concentration and degradability on milk production, composition, and ruminal protein metabolism. *J. Dairy Sci.*,

68:2227-2237.

HENSON, J.E., SCHINGOETHE, D.J. e MAIGA, H.A., 1997. Lactational evaluation of protein supplements of varying ruminal degradabilities. *J. Dairy Sci.*, **80**:385-392.

HENNING, P.A., VAN DER LINDEN, Y., MATTHEYSE, M.E., NAUHAUS, W.K., SCHWARTZ, H.M. e GILCHRIST, F.M.C., 1980. Factors affecting the intake and digestion of roughages by sheep fed maize straw supplemented with maize grain. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **94**:565-573.

HENNING, P.H., STEYN, D.G. e MEISSNER, H.H., 1991. The effect of energy and nitrogen supply on ruminal bacteria growth *in vitro*. *Anim. Prod.*, **53**:165-175.

HENNING, P.H., STEYN, D.G. e MEISSNER, H.H., 1993. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. *J. Anim. Sci.*, **71**:2516-2528.

HERRERA-SALDANA, R. e HUBER, J.T., 1989. Influence of varying protein and starch degradabilities on performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **72**:1477-1483.

HERRERA-SALDANA, R., GOMEZ-ALARCON, R., TORABI, M. e HUBER, J.T., 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.*, **73**:142-148.

HESPELL, R.B., 1984. Influence of ammonia assimilation pathways and survival strategy on rumen microbial growth. **In**: F.M.C. Gilchrist e R.I. Mackie (eds.), *Herbivore nutrition in the subtropics and tropics*, The Science Press (PTY) Ltd., Craighill, S.A., pp. 346.

HESPELL, R.B. e BRYANT, M.P., 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on Y_{ATP}. *J. Anim. Sci.*, **49**:1640-1659.

HIDAYAT, HILLMAN, K., NEWBOLD, C.J. e STEWART, C.S., 1993. The contributions of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation *in vitro*, as determined by microbial gas production. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **42**:193-208.

HIGGINBOTHAM, G.E., TORABI, M. e HUBER, J.T., 1989. Influence of dietary protein concentration and degradability on performance of lactating cows during hot environmental temperatures. *J. Dairy Sci.*, **72**:2554-2564.

HIGHFILL, B.D., BOGGS, D.L., AMOS, H.E. e CRICKMAN, J.G., 1987. Effects of high fiber energy supplements on fermentation characteristics and *in vivo* and *in situ* digestibilities of low quality fescue hay. *J. Anim. Sci.*, **65**:224-234.

HINO, T. e RUSSELL, J.B., 1987. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **64**:261-270.

HOBSON, P.N., SUMMERS, R., PESTGATE, J.R. e WARE, D.A., 1973. Nitrogen fixation in the rumen of a living sheep. *J. Gen. Microbiol.*, **77**:225-226.

HOFFMAN, P.C., GRUMMER, R.R., SHAVER, R.D., BRODERICK, G.A. e DRENDEL, T.R., 1991. Feeding supplemental fat and undegraded intake protein to early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **74**:3468-3474.

HOLDER, P., BUTTERY, P.J. e GARNSWORTHY, P.C., 1995. The effect of dietary asynchrony on rumen nitrogen recycling in sheep. *Proc. of the 11th meeting of Br. Soc. Anim. Sci.* pp 528.

HOLTER, J.B. e URBAN, W.E.JR., 1992. Water partitioning and intake prediction in dry and lactating holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **75**:1472-1479.

HOLTER, J.B., COLOVOS, N.F., DAVIS, H.A. e URBAN JR., W.E., 1968a. Urea for lactating dairy cattle. III. Nutritive value of rations of corn silage plus concentrate containing various levels of urea. *J. Dairy Sci.*, **51**:1243-1248.

HOLTER, J.B., COLOVOS, N.F. e URBAN JR., W.E., 1968b. Urea for lactating dairy cattle. IV. Effect of urea versus no urea in the concentrate on production performance in a high-producing herd. *J. Dairy Sci.*, **51**:1403-1408.

HOLTER, J.B., HAYES, H.H., URBAN JR., W.E., RAMSEY, S. e RIDEOUT, H., 1992. Response of Holstein cows to corn gluten meal used to increase undegradable protein in early or late lactation. *J. Dairy Sci.*, **75**:1495-1506.

HOOVER, W.H., 1978. Digestion and absorption in the hindgut of ruminants. *J. Anim. Sci.*, **46**:1789-1801.

HOOVER, W.H. e STOKES, S.R., 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.*, **74**:3630-3644.

HOUPT, T., 1970. Transfer of urea and ammonia to the rumen. **In**: A.T. Phillipson (ed.), *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*, Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, pp. 119-131.

HOWARD, H.J., AALSETH, E.P., ADAMS, G.D., BUSH, L.J., MCNEW, R.W. e DAWSON, L.J., 1987. Influence of dietary protein on reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **70**:1563-1571.

HOWLETT, M.R., MOUNTFORD, D.O., TURNER, K.W. e ROBERTON, A.M., 1976. Metabolism and growth yields in *Bacteroides ruminicola* strain B_14. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**:274-283.

HRISTOV, A.N. e BRODERICK, G.A., 1996. Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay, or corn silage. *J. Dairy Sci.*, **79**:1627-1637.

HRISTOV, A.N. e ROPP, J.K., 2003. Effect of dietary carbohydrate composition and availability on utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **86**:2416-2427.

HSU, J.T., FAHEY JR., G.C., MERCHEN, N.R. e MACKIE, R.I., 1991. Effects of defaunation and various nitrogen supplementation regimens on microbial numbers and activity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, **69**:1279-1289.

HUBER, J.T. e SANDY, R.A., 1965. Response of dairy cows fed unlimited corn silage to three levels of urea and grain. *J. Anim. Sci.*, **24**:887.

HUBER, J.T. e KUNG JR., L., 1981. Protein and nonprotein nitrogen utilization in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **64**:1170-1195.

HUBER, J.T., SANDY, R.A., POLAN, C.E., BRYANT, H.T. e BLASER, R.E., 1967. Varying levels of urea for dairy cows fed corn silage as the only forage. *J. Dairy Sci.*, **50**:1241-1247.

HUBER, J.T., LICHTENWALNER, R.E. e THOMAS, J.W., 1973. Factors affecting response of lactating cows to ammonia-treated corn silages. *J. Dairy Sci.*, **56**:1283-1290.

HUNGATE, R.E., BRYANT, M.P. e MAH, R.A., 1964. The rumen bacteria and protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.*, **18**:131-166.

HUNTINGTON, G.B. e ARCHIBEQUE, S.L., 1999. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *Proc. American Soc. Anim. Sci.*, pp. 1-11.

HVELPLUND, T., MISCIATTELLI, L. e WEISBJERG, M.R., 2001. Supply of the dairy cow with amino acids from dietary protein. *J. Anim. Feed Sci.*, **10**(Supl. 1):69-85.

INSTITUTE NACIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA), 1988. *Alimentation des bovines, ovins e caprins*. R. Jarrige (ed.), INRA, Paris. 476 pp.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 2001. Standard ISO 14156:2001. Milk and milk products – extraction methods for lipids and liposoluble compounds. *ISO Publications*. Rue de Varembé. Case Postale 56 CH-1211 Geneva 20. Switzerland. 6 pp. Online available: http://www.iso.ch/.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 2002a. Standard ISO 15884:2002. Milk fat – preparation of fatty acid methyl esters. *ISO Publications*. Rue de Varembé. Case Postale 56 CH-1211 Geneva 20. Switzerland. 6 pp. Online available: http://www.iso.ch/.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 2002b. Standard ISO 15885:2002.

Milk fat – determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography. *ISO Publications*. Rue de Varembé. Case Postale 56 CH-1211 Geneva 20. Switzerland. 8 pp. Online available: http://www.iso.ch/.

IPHARRAGUERRA, I.R., SHABI, Z., CLARK, J.H. e FREEMAN, D.E., 2002. Ruminal fermentation and nutrient digestion by dairy cows fed varying amounts of soyhulls as a replacement for corn grain. *J. Dairy Sci.*, **85**:2890-2904.

ISAACSON, H.R., HINDS, F.C., BRYANT, M.P. e OWENS, F.N., 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.*, **58**:1645-1659.

IVAN, M., NEILL, L., FORSTER, R., ALIMON, R., RODE, L.M. e ENTZ, T., 2000. Effects of *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, and total fauna on ruminal fermentation and duodenal flow in wethers fed different diets. *J. Dairy Sci.*, **83**:776-787.

IVERSON, W.G. e MILLIS, N.F., 1976a. Characterization of *Streptococcus bovis* bacteriophages. *Can. J. Microbiol.*, **22**:847-852.

IVERSON, W.G. e MILLIS, N.F., 1976b. Lysogeny in *Streptococcus bovis*. *Can. J. Microbiol.*, **22**:853-857.

JAMES, S.M., KYRIAZAKIS, I. e EMMANS, G.C., 2001. Diet selection of sheep: effects of adding urea to foods with different protein contents. *Anim. Sci.*, **73**:183-195.

JAMES, S.M., KYRIAZAKIS, I., EMMANS, G.C. e TOLKAMP, B.J., 2002. Diet selection of sheep: sodium bicarbonate, but not the offering of hay, modifies the effect of urea on diet selection. *Anim. Sci.*, **74**:357-367.

JANICKI, F.J., HOLTER, J.B. e HAYES, H.H., 1985. Varying protein content and nitrogen solubility for pluriparous, lactating Holstein cows: digestive performance during early lactation. *J. Dairy Sci.*, **68**:1995-2008.

JAQUETTE, R.D., RAKES, A.H. e CROOM KR., W.J., 1987. Effect of amount and source of dietary nitrogen on milk fat depression in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **70**:1202-1210.

JENKINS, T.C., 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*, **76**:3851-3863.

JENKINS, T.C., 1994. Regulation of lipid metabolism in the rumen. *J. Nutr.*, **124**:1372S-1376S.

JENSEN, K.F. e PEDERSEN, S., 1990. Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components. *Microbiol. Rev.*, **54**:89-100.

JIANG, W.H., PATTERSON, J.A. e STEENSON, L.R., 1995. Isolation and characterization of a temperate bacteriophage from a ruminal acetogen. *Curr. Microbiol.*, **31**:336-339.

JOHNSON, R.R., 1976. Influence of carbohydrate solubility on non-protein nitrogen utilization in the ruminant. *J. Anim. Sci.*, **43**:184-191.

JOHNSON, M.A., SWEENEY, T.F. e MULLER, L.D., 1988. Effects of feeding synthetic zeolite A and sodium bicarbonate on milk production, nutrient digestion, and rate of digesta passage in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **71**:946-953.

JOHNSON, L.M., HARRISON, J.H. e RILEY, R.E., 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using urinary uric acid or allantoin. *J. Dairy Sci.*, **81**:2408-2420.

JOLLIFFE, L.K., DOYLE, R.J. e STREIPS, U.N., 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell.*, **25**:753-763.

JONES, G.M., STEPHENS, C. e KENSETT, B., 1975. Utilization of starea, urea, or soybean meal in complete rations for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **58**:689-695.

JONES, D.F., HOOVER, W.H. e WEBSTER, T.K.M., 1998. Effects of concentrations of peptides on microbial metabolism in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, **76**:611-616.

JORDAN, E.R., CHAPMAN, T.E., HOLTAN, D.W. e SWANSON, L.V., 1983. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **66**:1854-1862.

JOUANY, J.-P., 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimization. *INRA Prod. Anim.*, 7:207-225.

KAJIKAWA, H., MITSUMORI, M. e OHMOMO, S., 2002. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.*, **85**:2015-2022.

KALSCHEUR, K.F., TETER, B.B., PIPEROVA, L.S. e ERDMAN, R.A., 1997a. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans*-$C_{18:1}$ fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:2104-2114.

KALSCHEUR, K.F., TETER, B.B., PIPEROVA, L.S. e ERDMAN, R.A., 1997b. Effect of fat source on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:2115-2126.

KALSCHEUR, K.F., VANDERSALL, J.H., ERDMAN, R.A., KOHN, R.A. e RUSSEK-COHEN, E., 1999. Effects of dietary crude protein concentration and degradability on milk production responses of early, mid, and late lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:545-554.

KAUFFMAN, W., 1976. Influence of the composition of the ration and the frequency of feeding on pH regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, **3**:103-114.

KEBREAB, E., FRANCE, J., MILLS, J.A., ALLISON, R. e DIJKSTRA, J., 2002. A dynamic model of N metabolism in the lactating dairy cow and an assessment of impact of N excretion on the environment. *J. Anim. Sci.*, **80**:248-259.

KEERY, C.M. e AMOS, H.E., 1993. Effects of source and level of undegraded intake protein on nutrient use and performance of early lactation cows. *J. Dairy Sci.*, **76**:499-513.

KELLY, M.L., BERRY, J.R., DWYER, D.A., GRIINARI, J.M., CHOUINARD, P.Y., AMBURGH, M.E.V. e BAUMAN, D.E., 1998a. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.*, **128**:881-885.

KELLY, M.L., KOLVER, E.S., BAUMAN, D.E., VAN AMBURGH, M.E. e MULLER, L.D., 1998b. Effect of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **81**:1630-1636.

KEMP, P., WHITE, R.W. e LANDER, D.J., 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.*, **90**:100-114.

KEMPTON, T.J., NOLAN, J.V. e LENG, R.A., 1977. Nitrógeno no proteico y proteínas desviadas. Principios para su empleo en las raciones de ruminantes. *Revista Mundial de Zootecnia*, **22**:1-9.

KENNEDY, P.M., 1980. The effects of dietary sucrose and the concentrations of plasma urea and rumen ammonia on the degradation of urea in the gastrointestinal tract of cattle. *Br. J. Nutr.*, **43**:125-140.

KENNEDY, P.M. e SIEBERT, B.D., 1972. The utilization of spear grass. II. The influence of sulphur on energy intake and rumen and blood parameters in cattle and sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, **23**:45-56.

KENNEDY, P.M. e MILLIGAN, L.P., 1978. Transfer of urea from the blood to the rumen of sheep. *Br. J. Nutr.*, **40**:149-154.

KENNEDY, P.M. e MILLIGAN, L.P., 1980. The degradation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants. *Can. J. Anim. Sci.*, **60**:205-221.

KENNELLY, J.J., 1996. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **60**:137-152.

KENNELLY, J.J., ROBINSON, B. e KHORASANI, G.R., 1999. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:2486-2496.

KEPLER, C.R. e TOVE, S.B., 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12}-cis, Δ^{11}-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, **242**:5686-5692.

KEPLER, C.R., HIRONS, K.P., MCNEILL, J.J. e TOVE, S.B., 1966. Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, **241**:1350-1354.

KERTZ, A.F., KOEPKE, M.K., DAVIDSON, L.E., BETZ, N.L., NORRIS, J.R., SKOCH, L.V., CORDS, B.R. e HOPKINS, D.T., 1982. Factors influencing intake of high urea-containing rations by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **65**:587-604.

KERTZ, A.F., DAVIDSON, L.E., CORDS, B.R. e PUCH, H.C., 1983. Ruminal infusion of ammonium chloride in lactating cows to determine effect of pH on ammonia trapping. *J. Dairy Sci.*, **66**:2597-2601.

KHORASANI, G.R. e KENNELLY, J.J., 2001. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in late-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **84**:1707-1716.

KHORASANI, G.R., DE BOER, G. e KENNELLY, J.J., 1996. Response of early lactation cows to ruminally undegradable protein in the diet. *J. Dairy Sci.*, **79**:446-453.

KHORASANI, G.R., OKINE, E.K. e KENNELLY, J.J., 2001. Effects of substituting barley grain with corn on ruminal fermentation characteristics, milk yield, and milk composition of holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **84**:2760-2769.

KIM, K.H., OH, Y.-G., CHOUNG, J.-J. e CHAMBERLAIN, D.G., 1999a. Effects of varying degrees of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial protein in cattle consuming grass silage. *J. Sci. Food Agric.*, **79**:833-838.

KIM, K.H., CHOUNG, J.-J. e CHAMBERLAIN, D.G., 1999b. Effects of varying the degree of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial protein in lactating dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal-based concentrate. *J. Sci. Food Agric.*, **79**:1441-1447.

KIM, Y.K., SCHINGOETHE, D.J., CASPER, D.P. e LUDENS, F.C., 1991. Lactational response of dairy cows to increased dietary crude protein with added fat. *J. Dairy Sci.*, **74**:3891-3899.

KIM, Y.J., LIU, R.H., BOND, D.R. e RUSSELL, J.B., 2000. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**:5226-5230.

KINSELLA, J.L., 1972. Stearoyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: Possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. *Lipids*, **7**:349-355.

KIRCHGESSNER, M. e KAUFFMANN, T.E.G., 1987. Urea and allantoin in the milk of cows during and after excess of energy supply. 5. Communications on the influence of excessive energy supply of lactating cows and its consequences. *J. Anim. Physol. Anim. Nutr.*, **58**:147-156.

KIRK, J.M., WOODWARD, C.L., ELLIS, W.C. e RICKE, S.C., 2000. Glutamine synthetase and protease enzyme activities and growth response of ruminal bacterium *Prevotella ruminicola* strain B(1)4 to nitrogen source and concentration. *J. Environ. Sci. Health*, **35**:103-120.

KLIEVE, A.V. e BAUCHOP, T., 1988. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:1637-1641.

KLIEVE, A.V. e SWAIN, R.A. 1993. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulse-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:2299-2303.

KLIEVE, A.V., HUDMAN, J.F. e BAUCHOP, T., 1989. Inducible bacteriophages from ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:1630-1634.

KLIEVE, A.V., TURNER, A.F. e HECK, G.L., 1998. Dietary influences on bacteriophage numbers in the rumen. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, **22**:341.

KLUSMEYER, T.H., MCCARTHY JR., R.D., CLARK, J.H. e NELSON, D.R., 1990a. Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **73**:3526-3537.

KLUSMEYER, T.H., CAMERON, M.R., MCCOY, G.C. e CLARK, J.H., 1990b. Effects of feed processing and frequency of feeding on ruminal fermentation, milk production, and milk composition. *J. Dairy Sci.*, **73**:3538-3543.

KLUSMEYER, T.H., LYNCH, G.L., CLARK, J.H. e NELSON, D.R., 1991. Effects of calcium salts of fatty acids and proportion of forage in diet on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. *J. Dairy Sci.*, **74**:2220-2232.

KNIGHT, W.M., 1973. Interval urea infusion for lambs. *J. Anim. Sci.*, **36**:145-149.

KNOTT, F.N., POLAN, C.E. e HUBER, J.T., 1967. Three levels of concentrate nitrogen with and without urea for lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **50**:964.

KNOTT, F.N., POLAN, C.E. e HUBER, J.T., 1972. Further observations on utilization of urea by lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **55**:466-473.

KNOWLTON, K.F., GLENN, B.P. e ERDMAN, R.A., 1998. Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. *J. Dairy Sci.*, **81**:1972-1984.

KOBAYASHI, Y., WAKITA, M. e HOSHINO, S., 1992. Effects of the ionophore salinomycin on nitrogen and long-chain fatty acids profiles of digesta in the rumen and duodenum of sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **36**:67-76.

KOENIG, K.M., NEWBOLD, C.J., MCINTOSH, F.M. e RODE, L.M., 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *J. Anim. Sci.*, **78**:2431-2445.

KOLVER, E., MULLER, L.D., VARGA, G.A. e CASSIDY, T.J., 1998. Synchronization of ruminal degradation of supplemental carbohydrate with pasture nitrogen in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **81**:2017-2028.

KOMARAGIRI, M.V.S. e ERDMAN, R.A., 1997. Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and protein. *J. Dairy Sci.*, **80**:929-937.

KOTARSKI, S.F., WANISKA, R.D. e THURN, K.K., 1992. Starch hydrolysis by the rumen microflora. *J. Nutr.*, **122**:178-190.

KOVACIK, A.M., LOERCH, S.C. e DEHORITY, B.A., 1986. Effect of supplemental sodium bicarbonate on nutrient digestibility and ruminal pH measured continuously. *J. Anim. Sci.*, **62**:226-234.

KREIKEMEIER, K.K., HARMON, D.L., BRANT JR., R.T., NAGARAJA, T.G. e COCHRAN, R.C., 1990. Steam-rolled wheat diets for finishing cattle: Effects of dietary roughage and feed intake on finishing steer performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.*, **68**:2130-2141.

KRÖBER, T.F., KÜLLING, D.R., MENZI, H., SUTTER, F. e KREUZER, M., 2000. Quantitative effects of feed protein reduction and methionine on nitrogen use by cows and nitrogen emission from slurry. *J. Dairy Sci.*, **83**:2941-2951.

KUNG JR., L. e HUBER, J.T., 1983. Performance of high producing cows in early lactation fed protein of varying amounts, sources, and degradability. *J. Dairy Sci.*, **66**:227-234.

KUNG JR., L., TUNG, R.S. e CARMEAN, B.R., 1992. Rumen fermentation and nutrient digestion in

cattle fed diets varying in forage and energy source. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **39**:1-12.

KWAN, K., COPPOCK, C.E., LAKE, G.B., FETTMAN, M.J., CHASE, L.E. e MCDOWELL, R.E., 1977. Use of urea by early postpartum holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **60**:1706-1724.

LARSEN, M., MADSEN, T.G., WEISBJERG, M.R., HVELPLUND, T. e MADSEN, J., 2001. Small intestinal digestibility of microbial and endogenous amino acids in dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, **85**:9-21.

LARSON, S.F., BUTLER, W.R. e CURRIE, W.B., 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:1288-1295.

LATHAM, M.J., SHARPE, M.E. e SUTTON, J.D., 1971. The microbial flora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. *J. Appl. Bacteriol.*, **34**:425-434.

LATHAM, M.J., STORRY, J.E. e SHARPE, M.E., 1972. Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *Appl. Microbiol.*, **24**:871-877.

LE LIBOUX, S. e PEYRAUD, J.L., 1999. Effect of forage particle size and feeding frequency on fermentation patterns and sites and extent of digestion in dairy cows fed mixed diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **76**:297-319.

LE RUYET, P. e TUCKER, W.B., 1992. Ruminal buffers: temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.*, **75**:1069-1077.

LEDOUX, M., LALOUX, L. e SAUVANT, D., 2000. Les isomères *trans* des acides gras: origine et présence dans l'alimentation. *Sciences des Aliments*, **20**:393-411.

LEE, S.S., CHANG, M.B., SCOLLAN, N.D., MERRY, R.J., DHANOA, M.S., HOBBS, V.J., MAENG, W.J. e DEWHURST, R.J., 1999. The fatty acid composition of solid- and liquid-associated rumen bacteria isolated from cows. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, York. pp 30.

LEIVA, E., HALL, M.B. e VAN HORN, H.H., 2000. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. *J. Dairy Sci.*, **83**:2866-2875.

LENG, R.A., 1982. Modification of rumen fermentation. **In**: J.B. Hacker (ed.), *Nutritional limits to animal production from pastures*, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, pp. 427-481.

LENG, R.A. e WEST, C.E., 1969. Contribution of acetate, butyrate, palmitate, stearate and oleate to ketone body synthesis in sheep. *Res. Vet. Sci.*, **10**:57-63.

LEONARD, M. e BLOCK, E., 1988. Effect of ration protein content and solubility on milk production of primiparous Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, **71**:2709-2722.

LESCOAT, P. e SAUVANT, D., 1995. Development of a mechanistic model for rumen digestion validated using the duodenal flux of amino acids. *Reprod. Nutr. Dev.*, **35**:45-70.

LIN, C.Y. e KUMAR, S., 1972. Pathway for synthesis of fatty acids in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, **247**:604-606.

LINDSAY, J.R. e HOGAN, J.P., 1972. Digestion of two legumes and rumen bacterial growth in defaunated sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, **23**:321-330.

LING, J.R. e ARMSTEAD, I.P., 1995. The *in vitro* uptake and metabolisnm of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**:116-124.

LITTLE, W., TREACHER, R.J. e REID, I.M., 1987. A 2-year comparison of the production, health and fertility of dairy cows given concentrates either twice daily in the parlour or through out-of-parlor dispensers. *Anim. Prod.*, **45**:171-180.

LOCKINGTON, R.A., ATTWOOD, G.T. e BROOKER, J.D., 1988. Isolation and characterization of a

temperate bacteriophage from the ruminal anaerobe *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:1575-1580.

LOOR, J.J. e HERBEIN, J.H., 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J. Nutr.*, **128**:2411-2419.

LOOR, J.J. e HERBEIN, J.H., 2001. Alterations in blood plasma and milk fatty acid profiles of lactating Holstein cows in response to ruminal infusion of a conjugated linoleic acid mixture. *Anim. Res.*, **50**:463-476.

LOOR, J.J. e HERBEIN, J.H., 2003. Dietary canola or soyabean oil with two levels of conjugated linoleic acids (CLA) alter profiles of 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **103**:63-83.

LOOR, J.J., HERBEIN, J.H. e POLAN, C.E., 2002. *Trans*18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *J. Dairy Sci.*, **85**:1197-1207.

LOOSLI, J.K. e WARNER, R.G., 1958. Distillers grains, brewers grains, and urea as protein supplements for dairy rations. *J. Dairy Sci.*, **41**:1446-1450.

LOU, J., DAWSON, K.A. e STROBEL, H.J., 1997. Glycogen biosynthesis via UDP-glucose in the ruminal bacterium *Prevotella bryantii* $B_1$4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**:4355-4359.

LUNDQUIST, R.G., OTTERBY, D.E. e LINN, J.G., 1986. Influence of formaldehyde treated soybean meal on milk production. *J. Dairy Sci.*, **69**:1337-1345.

LYLE, R.R., JOHNSON, R.R. e BACKUS, W.R., 1981. Ruminal characteristics as affected by monensin, type of protein supplement and proportions of whole wheat and corn in forage-free diets fed to finishing steers. *J. Anim. Sci.*, **53**:1377-1382.

MABJEESH, S.J., ARIELI, A., BRUCKENTAL, I., ZAMWELL, S. e TAGARI, H., 1997. Effect of ruminal degradability of crude protein and nonstructural carbohydrates on the efficency of bacterial crude protein synthesis and amino acid flow to the abomasum of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:2939-2949.

MACGREGOR, C.A., STOKES, M.R., HOOVER, W.H., LEONARD, H.A., JUNKINS, L.L.JR., SNIFFEN, C.J. e MAILMAN, R.W., 1983. Effect of dietary concentration of total nonstructural carbohydrate on energy and nitrogen metabolism and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **66**:39-50.

MACKIE, R.I. e WHITE, B.A., 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.*, **73**:2971-2995.

MACKIE, R.I., GILCHRIST, F.M.C., ROBBERTS, A.M., HANNAH, P.E. e SCHWARTZ, H.M., 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci.*, **90**:241-254.

MACLEOD, G.K., GRIEVE, D.G., MCMILLAN, I. e SMITH, G.C., 1984. Effect of varying protein and energy densities in complete rations fed to cows in first lactation. *J. Dairy Sci.*, **67**:1421-1429.

MAENG, W.J. e BALDWIN, R.L., 1976a. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effects of urea and amino acids over time. *J. Dairy Sci.*, **59**:643-647.

MAENG, W.J. e BALDWIN, R.L., 1976b. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea. *J. Dairy Sci.*, **59**:648-655.

MAENG, W.J., VAN NEVEL, C.J., BALDWIN, R.L. e MORRIS, J.G., 1976. Rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acids and protein. *J. Dairy Sci.*, **59**:68-79.

MAFF, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1986. The analysis of agricultural materials. *Reference Book*, HMSO, London, 17 pp.

MAGLIONE, G. e RUSSELL, J.B., 1997. The adverse effect of ammonia limitation and excess-cellobiose on *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**:720-725.

MAHADEVAN, S., ERFLE, J.D. e SAUER, F.D., 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.*, **50**:723-728.

MAJDOUB, A., LANE, G.T. e AITCHISON, T.E., 1978. Milk production response to nitrogen solubility in dairy rations. *J. Dairy Sci.*, **61**:59-65.

MANSFIELD, H.R. e STERN, M.D., 1994. Effects of soybean hulls and lignosulfonate-treated soybean meal on ruminal fermentation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **77**:1070-1083.

MANSFIELD, H.R., STERN, M.D. e OTTERBY, D.E., 1994. Effects of beet pulp and animal by-products on milk yield and *in vitro* fermentation by rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.*, **77**:205-216.

MANSTON, R. RUSSELL, A.M., DEW, S.M. e PAYNE, J.M., 1975. The influence of dietary protein upon blood composition in dairy cows. *Vet. Rec.*, **96**:497-502.

MÄNTYSAARI, P.E., SNIFFEN, C.J., MUSCATO, T.V., LYNCH, J.M. e BARBANO, D.M., 1989. Performance of cows in early lactation fed isonitrogenous diets containing soybean meal or animal by-product meals. *J. Dairy Sci.*, **72**:2958-2967.

MARTIN, S.A., 1994. Nutrient transport by ruminal bacteria: a review. *J. Anim. Sci.*, **72**:3019-3031.

MARTIN, S.A. e JENKINS, T.C., 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and *trans*-$C_{18:1}$ fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.*, **80**:3347-3352.

MARTIN, C., BERNARD, L. e MICHAEL-DOREAU, B., 1996. Influence of sampling time and diet on amino acid composition of protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.*, **74**:1157-1163.

MARTÍN-ORÚE, S.M., DAPOZA, C., BALCELLS, J. e CASTRILLO, C., 1996. Purine derivative excretion in lactating ewes fed straw and different levels of fish meal. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **63**:341-346.

MARTÍN-ORÚE, S.M., BALCELLS, J., GUADA, J.A. e FONDEVILA, M., 2000. Microbial nitrogen production in growing heifers: direct measurement of duodenal flow of purine bases versus urinary excretion of purine derivatives as estimation procedures. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **88**:171-188.

MASSART-LEËN, A.M. e MASSART, D.L., 1981. The use of clustering techniques in the elucidation or confirmation of metabolic pathways. *Biochem. J.*, **196**: 611-618.

MASSART-LEËN, A.M., ROETS, E., VERBEKE, R. e PEETERS, G., 1974. Incorporation of [1-^{14}C] myristic acid in milk components by the isolated perfused udder. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **14**:459-469.

MASSART-LEËN, A.M., ROETS, E., PEETERS, G. e VERBEKE, R., 1983. Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. *J. Dairy Sci.*, **66**:1445-1454.

MATHIEU, F., SÉNAUD, J. e JOUANY, J.P., 1995. Effect of the addition of mixed B-type protozoa in defaunated rumen of sheep on the degradation and fermentation of different proteins. *Ann. Zootech.*, **44**(Suppl.):226.

MATTHÉ, A., LEBZIEN, P., HRIC, I. e FLACHOWSKY, G., 2003. Influence of prolonged adaptation periods on starch degradation in the digestive tract of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **103**:15-27.

MATTOS, W. e PALMQUIST, D.L., 1974. Increased polyunsaturated fatty acid yields in milk of cows fed protected fat. *J. Dairy Sci.*, **57**:1050-1054.

MAYES, R.W. e DOVE, H., 2000. Measurement of dietary nutrient intake in free ranging mammalian herbivores. *Nutr. Res. Rev.*, **13**:107-138.

MCALLAN, A.B., 1982. The fate of nucleic acids in ruminats. *Proc. Nutr. Soc.*, **41**:309-317.

MCALLAN, A.B. e SMITH, R.H., 1973. Degradation of nucleic acids in the rumen. *Br. J. Nutr.*, **29**:331-345.

MCALLAN, A.B., COCKBURN, J.E., WILLIAMS, A.P. e SMITH, R.H., 1988. The degradation of different protein supplements in the rumen of steers and the effects of these supplements on carbohydrate digestion. *Br. J. Nutr.*, **60**:669-682.

MCALLISTER, T.A., PHILLIPPE, R.C., RODE, L.M. e CHENG, K.J., 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.*, **71**:205-212.

MCALLISTER, T.A., BAE, H.D., JONES, G.A. e CHENG, K.-J., 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.*, **72**:3004-3018.

MCCARTHY, S. e SMITH, G.H., 1969. Beta-hydroxybutyrate as a precursor of milk fat in the ruminant. *Proc. Nutr. Soc.*, **28**:28-29A.

MCCARTHY JR., R.D., KLUSMEYER, T.H., VICINI, J.L. e CLARK, J.H., 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **72**:2002-2016.

MCCORMICK, M.E., FRENCH, D.D., BROWN, T.F., CUOMO, G.J., CHAPA, A.M., FERNANDEZ, J.M., BEATTY, J.F. e BLOUIN, D.C., 1999. Crude protein and rumen undegradable protein effects on reproduction and lactation performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:2697-2708.

MCGUFFEY, R.K., GREEN, H.B. e BASSON, R.P., 1990. Lactation response of dairy cows receiving bovine somatotropin and fed rations varying in crude protein and undegradable intake protein. *J. Dairy Sci.*, **73**:2437-2443.

MCGUIRE, M.A., MCGUIRE, M.K., MCGUIRE, M.S. e GRIINARI, J.M., 1997. Bovinic acid: the natural CLA. *Proc. Cornell Nutr. Conf. for Feed Manufacturers*. 59th Meeting, October 21, 22, 23, Cornell University, Ithaca, NY 14853-4801. pp. 217-226.

MCINTYRE, K.H.C., 1971. The effects of continuous intravenous and intraruminal infusions of urea on nitrogen metabolism in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, **22**:429-441.

MCRAE, J.C. e WILSON, S., 1977. The effects of various forms of gastrointestinal cannulation on digestive measurements in sheep. *Br. J. Nutr.*, **38**:65-71.

MEHREZ, A.Z. e ØRSKOV, E.R., 1976. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Proc. Nutr. Soc.*, **35**:40A-41A.

MELLENBERGER, R.W., BAUMAN, D.E. e NELSON, D.R., 1973. Metabolic adaptations during lactogenesis. Fatty acid and lactose synthesis in cow mammary tissue. *Biochem. J.*, **136**:741-748.

MENDOZA, G.D., BRITTON, R.A. e STOCK, R.A., 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, **71**:1572-1578.

MERCHEN, N.R. e SATTER, L.D., 1983. Changes in nitrogenous compounds and sites of digestion of alfalfa harvested at different moisture contents. *J. Dairy Sci.*, **66**:789-801.

MERRY, R.J., SMITH, R.H. e MCALLEN, A.B., 1984. Effect of different dietary nitrogen supplements on rumen fermentation. *Can. J. Anim. Sci.*, **64**(Supl.):56-57.

METCALF, J.A., BEEVER, D.E., SUTTON, J.D., WRAY-CAHEN, D., EVANS, R.T., HUMPHRIES, D.J., BACKWELL, F.R.C., BEQUETTE, B.J. e MACRAE, J.C., 1994. The effect of supplementary protein on *in vivo* metabolism of the mammary gland in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **77**:1816-1827.

MEYER, J.H.F., VAN DER WALT, S.I. e SCHWARTZ, H.M., 1986. The influence of diet and protozoal numbers on the breakdown and synthesis of protein in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, **62**:509-520.

MICHEL, V., FONTY, G., MILLET, L. e GOUET, P., 1993. In vitro study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **110**:5-9.

MITCHELL, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature (Lond.)*, **191**:144-148.

MOORBY, J.M. e DEWHURST, R.J., 1993. Diurnal variation in urinary purine derivative excretion of dairy cows on different feeding patterns. *Anim. Prod.*, **56**:464A.

MOORE, J.H. e CHRISTIE, W.W., 1981. Lipid metabolism in the mammary gland of ruminat animals. **In**: W.W. Christie (ed.), *Lipid metabolism in ruminants,* Pergamon Press, Oxford, 227 pp.

MOROVSKY, M., PRISTAS, P., CZIKKOVA, S. e JAVORSKY, P., 1998. A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* BC25 against ruminal *Streptococcus bovis*. *Microbiol. Res.*, **153**:277-281.

MORRISON, M., 2000. The microbial ecology and physiology of ruminal nitrogen metabolism. **In**: P.B. Cronjé (ed.), *Ruminant physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction*, CAB International, pp. 99-114.

MORRISON, M. e MACKIE, R.I., 1996. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. *Aust. J. Agric. Res.*, **47**:227-246.

MOSCARDINI, S., WRIGHT, T.C., LUIMES, P.H., MCBRIDE, B.W. e SUSMEL, P., 1998. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on purine derivative and urea nitrogen: comparison with predictions from the Cornell net carbohydrate and protein system. *J. Dairy Sci.*, **81**:2421-2329.

MOSS, A.R. e GIVENS, D.I., 1990. Chemical composition and *in vitro* digestion to predict digestibility of field-cured and barn-dried grass hays. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **31**:125-138.

MOULD, F.L. e ØRSKOV, E.R., 1983/84. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis *in sacco*, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **10**:1-14.

MOULD, F.L., ØRSKOV, E.R. e MAN, S.O., 1983/1984a. Associative effects of mixed feeds. II. Effect of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **10**:15-30.

MOULD, F.L., ØRSKOV, E.R. e GAULD, S.A., 1983/1984b. Associative effects of mixed feeds. II. The effect of dietary addition of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **10**:31-47.

MOWREY, A., ELLERSIECK, M.R. e SPAIN, J.N., 1999. Effect of fibrous by-products on production and ruminal fermentation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:2709-2715.

MULHOLLAND, J.G., COOMBE, J.B e MCMANUS, W.R., 1976. Effect of starch on the utilization by sheep of a straw diet supplemented with urea and minerals. *Aust. J. Agric. Res.*, **27**:139-153.

MURDOCK, F.R., HODGSON, A.S. e RILEY, R.E., 1981. Nutritive value of wet brewers grains for lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.*, **64**:1826-1832.

MURPHY, M.R., 1992. Water metabolism of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **75**:326-333.

MURPHY, M.R., BALDWIN, R.L. e KOONG, L.J., 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *J. Anim. Sci.*, **55**:411-421.

NAGARAJA, T.G., TOWNE, G. e BEHARKA, A.A., 1992. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:2410-2414.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th Edition. National Academy Press, Washington, DC, USA.

NEIJSSEL, O.M. e TEMPEST, D.W., 1976. The role of energy-spilling reactions in the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic chemostat culture. *Arch. Microbiol.*, **110**:305-311.

NENGOMASHA, E.M., 1992. The effect of rapidly fermentable carbohydrates on the voluntary intake of roughages: rumen parameters. *Master of Science Thesis*, University of Aberdeen, UK. 73 pp.

NEVILLE, M.C. e PICCIANO, M.F., 1997. Regulation of milk lipid secretion and composition. *Annu. Rev. Nutr.*, **17**:159-183.

NEWBOLD, J.R. e RUST, S.R., 1992. Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. *J. Anim. Sci.*, **70**:538-546.

NEWBOLD, C.J., CHAMBERLAIN, D.G. e WILLIAMS, A.G., 1986. The effects of defaunation on the metabolism of lactic acid in the rumen. *J. Sci. Food Agric.*, **37**:1083-1090.

NEWBOLD, C.J., USHIDA, K., MORVAN, B.M., FONTY, G. e JOUANY, J.P., 1996. The role of ciliate protozoa in the lysis of methanogenic archaea in rumen fluid. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**:421-425.

NIANOGO, A.J., AMOS, H.E., FROETSCHEL, M.A. e KEERY, C.M., 1991. Dietary fat, protein degradability, and calving season: effects on nutrient use and performance of early lactation cows. *J. Dairy Sci.*, **74**:2243-2255.

NOBLE, R.C., MOORE, J.H. e HARFOOT, C.G., 1974. Observations on the pattern of biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. *Br. J. Nutr.*, **31**:99-108.

NOCEK, J.E. e BRAUND, D.G., 1985. Effect of feeding frequency on diurnal dry matter and water consumption, liquid dilution rate, and milk yield in first lactation. *J. Dairy Sci.*, **68**:2238-2247.

NOCEK, J.E. e RUSSELL, J.B., 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.*, **71**:2070-2107.

NOCEK, J.E. e TAMMINGA, S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.*, **74**:3598-3629.

NOCEK, J.E., KAUTZ, W.P., LEEDLE, J.A.Z. e ALLMAN, J.G., 2002. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and *in situ* digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **85**:429-433.

NOLAN, J.V., 1993. Nitrogen kinetics. **In**: J.M. Forbes e J. France (eds.), *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, CAB International. pp. 123-143.

NOLAN, J.V. e LENG, R.A., 1972. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.*, **27**:177-194.

NOLAN, J.V., NORTON, B.W. e LENG, R.A., 1976. Further studies of the dynamics of nitrogen metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.*, **35**:127-147.

NORMA PORTUGUESA 1786, 1985. Alimentos para animais, determinação do teor de cálcio, método volumétrico, processo corrente. *Diário da República*, III Série de 09/07, nº 155. 5 pp.

NORMA PORTUGUESA 2971, 1985. Alimentos para animais, determinação do teor de cinza insolúvel no ácido clorídrico. *Diário da República*, III Série de 10/11, nº 260. 6 pp.

NORMA PORTUGUESA 1785, 1986. Determinação do teor de açúcares. *Diário da República*, III Série de 30/05, nº 123. 8 pp.

NORMA PORTUGUESA 3255, 1986. Determinação do teor de ureia. Método espectrofotométrico. *Diário da República*, III Série de 30/05, nº 123. 5 pp.

NORMA PORTUGUESA 873, 1997. Alimentos para animais, determinação do teor de fósforo, método gravimétrico. *Diário da República*, III Série de 04/05, nº 103. 5 pp.

NORTON, B.W., MACKINTOSH, J.B. e ARMSTRONG, D.G., 1982. Urea synthesis and degradation in sheep given pelleted-grass diets containing flaked barley. *Br. J. Nutr.*, **48**:249-264.

NSAHLAI, I.V., OSUJI, P.O. e UMUNNA, N.N., 2000. Effect of form and of quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary spot samples, daily microbial N supply and predictability of intake. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **85**:223-238.

NUGENT, J.H.A. e MANGAN, J.L., 1981. Characteristics of the rumen proteolysis fraction 1 (185) leaf protein from Lucerne (Medicago sativa L.). *Br. J. Nutr.*, **46**:39-58.

O'CONNOR, J.D., SNIFFEN, C.J., FOX, D.G. e CHALUPA, W., 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *J. Anim. Sci.*, **71**:1298-1311.

O'KELLY, J.C. e SPIERS, W.G., 1991. Influence of host diet on the concentrations of fatty acids in rumen bacteria from cattle. *Aust. J. Agric. Res.*, **42**:243-252.

O'MARA, F.P., MURPHY, J.J. e RATH, M., 1997. The effect of replacing dietary beet pulp with wheat treated with sodium hydroxide, ground wheat, or ground corn in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:530-540.

O'MARA, F.P., MURPHY, J.J. e RATH, M., 2000. The effect of concentrate supplements differing in ruminal protein degradability on milk production and blood metabolite concentrations of dairy cows grazing perennial ryegrass pasture. *Livest. Prod. Sci.*, **64**:183-191.

OBA, M. e ALLEN, M.S., 2003. Effects of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **86**:195-207.

OBARA, Y. e SHIMBAYASHI, K., 1980. The appearance of recycled urea in the digestive tract of goats during the final third of a once daily feeding of a low-protein ration. *Br. J. Nutr.*, **44**:295-305.

OBARA, Y., DELLOW, D.W. e NOLAN, J.V., 1991. The influence of energy-rich supplements on nitrogen kinetics in ruminants. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: *Proc. of the seventh international symposium on ruminant physiology*, pp. 515-539.

OBISPO, N.E. e DEHORITY, B.A., 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.*, **77**:3084-3095.

OH, Y.-G., KIM, K.H., KIM, J.-H-, CHOUNG, J.-J. e CHAMBERLAIN, D.G., 1999. The effect of the form of nitrogen in the diet on ruminal fermentation and the yield of microbial protein in sheep consuming diets of grass silage supplemented with starch or sucrose. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **78**:227-237.

OHAJURUKA, O.A. e PALMQUIST, D.L., 1991. Evaluation of n-alkanes as digesta markers in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, **69**:1726-1732.

OLDHAM, J.D., 1984. Protein-energy interrelationships in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **67**:1090-1114.

OLDHAM, J.D., BROSTER, W.H., NAPPER, D.J. e SMITH, T., 1979. Predicted and measured performance of friesian cows fed on rations calculated to differ in degradable protein and undegraded protein. *Proc. Nutr. Soc.*, **38**:118.

OLDICK, B.S., FIRKINS, J.L. e ST-PIERRE, N.R., 1999. Estimation of microbial nitrogen flow to the duodenum of cattle based on dry matter intake and diet composition. *J. Dairy Sci.*, **82**:1497-1511.

OLIVEIRA, J.S., HUBER, J.T., SIMAS, J.M., THEURER, C.B. e SWINGLE, R.S., 1995. Effect of sorghum grain processing on site and extent of digestion of starch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **78**:1318-1327.

ONODA, A., KOBAYASHI, Y. e HOSHINO, S., 1996. Effects of amino acids on the growth of an anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp N 13. *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**:311-320.

ØRSKOV, E.R., 1982. *Protein Nutrition in Ruminants*. Academic Press, London, 174 pp.

ØRSKOV, E.R., 1994. Recent advances in understanding of microbial transformation in ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, **39**:53-60.

ØRSKOV, E.R. e MEHREZ, A.Z., 1977. Estimation of extent of protein degradation from basal feeds in the rumen of sheep. *Proc. Br. Soc. Nutr.*, **36**:78A.

ØRSKOV, E.R. e MCDONALD, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **92**:499-503.

ØRSKOV, E.R., HOVELL, F.D.DEB. e MOULD, F., 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Prod.*, **5**:195-213.

ØRSKOV, E.R., HUGHES-JONES, M. e ELIMAN, M.E., 1983. Studies on degradation and outflow rate of protein supplements in the rumen of sheep and cattle. *Livest. Prod. Sci.*, **10**:17-24.

OVERTON, T.R., CAMERON, M.R., ELLIOTT, J.P. e CLARK, J.H., 1995. Ruminal fermentation and passage of nutrients to the duodenum of lactating cows fed mixtures of corn and barley. *J. Dairy Sci.*, **78**:1981-1998.

OWEN, F.G. e LARSON, L.L., 1991. Corn distillers dried grains versus soybean meal in lactation diets. *J. Dairy Sci.*, **74**:972-979.

PALMQUIST, D.L., 1976. Ruminant adipose tissue metabolism. *Fed. Proc.*, **35**:2300-2301.

PALMQUIST, D.L. e MATTOS, W., 1978. Turnover of lipoproteins and transfer to milk fat of dietary (1-carbon-14) linoleic acid in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **61**:561-565.

PALMQUIST, D.L. e JENKINS, T.C., 1980. Fat in lactation rations. Review. *J. Dairy Sci.*, **63**:1-14.

PALMQUIST, D.L. e SCHANBACHER, F.L., 1991. Dietary fat composition influences fatty acid composition of milk fat globule membrane in lactating cows. *Lipids*, **26**:718-722.

PALMQUIST, D.L., e WEISS, W.P., 1994. Blood and hydrolyzed feather meals as sources of undegradable protein in high fat diets for cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **77**:1630-1643.

PALMQUIST, D.L., DAVIS, C.L., BROWN, R.E. e SACHAN, D.S., 1969. Availability and metabolism of various substrates in ruminats. V. Entry rate into the body and incorporation into milk fat of D(-)β-hydroxybutyrate. *J. Dairy Sci.*, **53**:633-638.

PALMQUIST, D.L., WEISBJERG, M.R. e HVELPLUND, T., 1993. Ruminal, intestinal, and total digestibilities of nutrients in cows fed diets high in fat and undegradable protein. *J. Dairy Sci.*, **76**:1353-1364.

PAQUAY, R., GODEAU, J.M., DE BAERE, R. e LOUSSE, A., 1973. The effects of the protein content of the diet on the performance of lactating cows. *J. Dairy Res.*, **40**:93-103.

PARODI, P.W., 1997. Cows'milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.*, **127**:1055-1060.

PEREZ, J.F., RODRIGUEZ, C.A., GONZALEZ, J. BALCELLS, J. e GUADA, J.A., 1996. Contribution of dietary purine bases to duodenal digesta in sheep. In situ studies of purine degradability corrected for microbial contamination. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **62**:251-262.

PÉREZ, J.F., BALCELLS, J., GADA, J.A. e CASTRILLO, C., 1997. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of N-15 and purine bases as microbial markers: Effect of protein source and rumen bacteria isolates. *Anim. Sci.*, **65**:225-236.

PETIT, H.V. e TREMBLAY, G.F., 1995a. Ruminal fermentation and digestion in lactating cows fed grass silage with protein and energy supplements. *J. Dairy Sci.*, **78**:342-352.

PETIT, H.V. e TREMBLAY, G.F., 1995b. Milk production and intake of lactating cows fed grass

silage with protein and energy supplements. *J. Dairy Sci.*, **78**:353-361.

PHILLIP, L.E., 1983. Effect of sodium bicarbonate on nitrogen utilization and feed intake by lambs. *Can. J. Anim. Sci.*, **63**:613-621.

PHILLIP, L.E. e HIDALGO, V., 1989. Voluntary feed intake, acid-base balance and partitioning of urinary nitrogen in lambs fed corn silage with added sodium bicarbonate or sodium sesquicarbonate. *J. Anim. Sci.*, **67**:2116-2122.

PHILLIP, L.E. e SIMPSON, M.V., 1992. Differentiation of the effects of protein status and acid-base balance on the appetite of sheep for Lucerne silage. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **118**:249-257.

PHIPPS, R.H., BINES, J.A., FULFORD, R.J. e WELLER, R.F., 1984. Complete diets for dairy cows: a comparison between complete diets and separate ingredients. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **103**:171-180.

PHY, T.S. e PROVENZA, F.D., 1998a. Sheep fed grain prefer foods and solutions that attenuate acidosis. *J. Anim. Sci.*, **76**:954-960.

PHY, T.S. e PROVENZA, F.D., 1998b. Eating barley too frequently or in excess decreases lambs preference for barley but sodium bicarbonate and lasalocid attenuate the response. *J. Anim. Sci.*, **76**:1578-1583.

PIPEROVA, L.S., TETER, B.B., BRUCKENTAL, I., SAMPUGNA, J., MILLS, S.E., YURAWECZ, M.P., FRITSCHE, J., KU, K. e ERDMAN, R.A., 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *J. Nutr.*, **130**:2568-2574.

PIRT, S.J., 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **163**:224-231.

PIRT, S.J., 1975. *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

PITT, R.E., VAN KESSEL, J.S., FOX, D.G., PELL, A.N., BARRY, M.C. e VAN SOEST, P.J., 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *J. Anim. Sci.*, **74**:226-244.

PLASCENCIA, A. e ZINN, R.A., 1996. Influence of flake density on the feeding value of steam-processed corn in diets for lactating cows. *J. Anim. Sci.*, **74**:310-316.

POLAN, C.E., MILLER, C.N. e MCGILLIARD, M.L., 1976. Variable dietary protein and urea for intake and production in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **59**:1910-1914.

POLAN, C.E., HERRINGTON, T.A., WARK, W.A. e ARMENTANO, L.E., 1985. Milk production response to diets supplemented with dried brewers grains, wet brewers grains, or soybean meal. *J. Dairy Sci.*, **68**:2016-2026.

POPJAK, G., FRENCH, T.H. e FOLLEY, S.J., 1951a. Utilization of acetate for milk fat synthesis in the lactating goat. *Biochem. J.*, **48**:411-416.

POPJAK, G., FRENCH, T.H., HUNTER, G.D. e MARTIN, S.J.P., 1951b. Mode of formation of milk fatty acids from acetate in the goat. *Biochem. J.*, **48**:612-618.

PORDOMINGO, A.J., WALLACE, J.D., FREEMAN, A.S. e GALYEAN, M.L., 1991. Supplemental corn grain for steers grazing native rangeland during summer. *J. Anim. Sci.*, **69**:1678-1687.

PORTARIA 1037/97. Diário da República – I Série-B. Nº 227, 1 de Outubro de 1997. pp. 5380-5381.

POTTER, G.D., MCNEILL, J.W. e RIGGS, J.K., 1971. Utilization of processed sorghum grain proteins by steers. *J. Anim. Sci.*, **32**:540-543.

PRESTON, T.R. e LENG, R.A., 1984. Supplementation of diets based on fibrous residues and by-products. **In**: F. Sundstøl e E. Owens (eds.), *Straw and other fibrous by-products as feed*,

Elsevier, Amsterdam, pp. 373-413.

PRINS, R.A., VAN RHEENEN, D.L. e VAN'T KLOOSTER, A.T., 1983. Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**:585-595.

PUCHALA, R. e KULASEK, G.W., 1992. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. *Can. J. Anim. Sci.*, **72**:821-830.

PUPPIONE, D.L., RAPHAEL, B., MCCARTHY, R.D. e DIMICK, P.S., 1973. Variations in the electrophoretic distributions of very low density lipoproteins of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **55**:265-268.

RAJALA-SCHULTZ, P.J., SAVILLE, W.J.A., FRAZER, G.S. e WITTUM, T.E., 2001. Association between milk urea nitrogen and fertility in Ohio dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **84**:482-489.

RAKES, A.H., HARDISON, W.A., ALBERT, J., MOORE, W.E.C. e GRAF, G.C., 1957. Response of growing dairy heifers to frequency of feeding. *J. Dairy Sci.*, **40**:1621-1627.

REDMAN, R.G., KELLAWAY, R.C. e LEIBHOLZ, J., 1980. Utilization of low quality roughages: effects of urea and protein supplements of differing solubility on digesta flows, intake and grow rate of cattle eating oaten chaff. *Br. J. Nutr.*, **44**:343-354.

REES, P. e ROWLINSON, P., 1985. The effect of a fully-controlled out-of-parlour concentrate dispenser on the production of british friesian dairy cows. *Anim. Prod.*, **41**:43-51.

REID, J.T., 1953. Urea as a protein replacement for ruminants: a review. *J. Dairy Sci.*, **36**:955-993.

REID, J.T., TYRRELL, H.F. e MOE, P.W., 1967. Digestible protein needs of milking cows. *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, Cornell University, Ithaca, NY.

RÉMOND, D., CHAISE, J.P., DELVAL, E. e PONCET, C., 1993. Net transfer of urea and ammonia across the ruminal wall of sheep. *J. Anim. Sci.*, **71**:2785-2792.

RICO-GOMEZ, M. e FAVERDIN, P., 2001. La nutrition protéique modifie l'ingestion des vaches laitières: analyse bibliographique. *Renc. Rech. Ruminants*, **8**:285-288.

ROBERTSON, J.B. e VAN SOEST, P.J., 1981. The detergent system of analysis and its application in human foods. **In**: W.P.T. James. e O. Theander (eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*, Marcell Dekker, Inc., New York, pp. 123-158.

ROBINSON, P.H., 1989. Dynamic aspects of feeding management for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **72**:1197-1209.

ROBINSON, P.H. e SNIFFEN, C.J., 1985. Forestomach and whole tract digestibility for lactating dairy cows as influenced by feeding frequency. *J. Dairy Sci.*, **68**:857-867.

ROBINSON, P.H. e KENNELLY, J.J., 1988. Influence of intake of rumen undegradable protein on milk production of late lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **71**:2135-2142.

ROBINSON, P.H. e MCQUEEN, R.E., 1994. Influence of supplemental protein source and feeding frequency on rumen fermentation and performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **77**:1340-1353.

ROBINSON, P.H., SNIFFEN, C.J. e VAN SOEST, P.J., 1985. Influence of level of feed intake on digestion and bacterial yield in the forestomachs of dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, **65**:437-444.

ROBINSON, P.H., TAMMINGA, S. e VAN VUUREN, A.M., 1986. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen fermentation in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, **15**:173-189.

ROBINSON, P.H., TAMMINGA, S. e VAN VUUREN, A.M., 1987. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen ingesta quantity, composition and kinetics of ingesta turnover in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, **17**:37-62.

ROBINSON, P.H., DE BOER, G. e KENNELLY, J.J., 1991. Effect of bovine somatotropin and protein

on rumen fermentation and forestomach and whole tract digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **74**:3505-3517.

ROBINSON, P.H., GILL, M. e KENNELLY, J.J., 1997. Influence of time of feeding a protein meal on ruminal fermentation and forestomach digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:1366-1373.

ROBINSON, P.H., GILL, M. e KENNELLY, J.J., 2002. Influence of time of feeding a protein meal on diurnal patterns of amino acids in duodenal digesta protein of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **97**:115-121.

RODE, L.M. e SATTER, L.D., 1988. Effect of amount and length of alfalfa hay in diets containing barley or corn on site of digestion and rumen microbial protein synthesis in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.*, **68**:445-454.

RODE, L.M., WEAKLEY, D.C. e SATTER, L.D., 1985. Effect of forage amount and particle size in diets of lactating dairy cows on site of digestion and microbial protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.*, **65**:101-111.

ROFFLER, R.E. e SATTER, L.D., 1975. Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants. II. Application of published evidence to the development of a theoretical model for predicting nonprotein nitrogen utilization. *J. Dairy Sci.*, **58**:1889-1898.

ROFFLER, R.E. e THACKER, D.L., 1983. Influence of reduzing dietary crude protein from 17 to 13.5 percent to cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **66**:51-58.

ROFFLER, R.E., SCHWAB, C.G. e SATTER, L.D., 1976. Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants. III. Influence of intraruminal urea infusion on ruminal ammonia concentration. *J. Dairy Sci.*, **59**:80-84.

ROFFLER, R.E., SATTER, L.D., HARDIE, A.R. e TYLER, W.J., 1978. Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle during early lactation. *J. Dairy Sci.*, **61**:1422-1428.

ROGERS, J.A., MULLER, L.D., DAVIS, C.L., CHALUPA, W., KRONFIELD, D.S., KROCHER, L.F. e CUMMINGS, K.R., 1985. Response of dairy cows to sodium bicarbonate and limestone in early lactation. *J. Dairy Sci.*, **68**:646-660.

ROJAS, A., LÓPEZ-BOTE, C., ROTA, A., MARTÍN, L., RODRÍGUEZ, P.L. e TOVAR, J.J., 1994. Fatty acid composition of Verata goat kids fed either goat milk or commercial milk replacer. *Small Ruminant Research*, **14**:61-66.

ROMULO, B., BIRD, S.H. e LENG, R.A., 1989. Effects of defaunation and protein supplementation on intake, digestibility, N retention and fungal numbers in sheep fed straw-based diets. **In**: J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (eds.), *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion.* Penambul Books, Armindale, Australia, pp. 285-288.

ROOKE, J.A. e ARMSTRONG, D.G., 1989. The importance of the form of nitrogen on microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage and continuous intraruminal infusions of sucrose. *Br. J. Nutr.*, **61**:113-121.

ROOKE, J.A., LEE, N.H. e ARMSTRONG, D.G., 1987. The effects of intraruminal infusions of urea, casein, glucose syrup and a mixture of casein and glucose syrup on nitrogen digestion in the rumen of cattle receiving grass-silage diets. *Br. J. Nutr.*, **57**:89-98.

ROONEY, L.W. e PFLUGDFELDER, R.L., 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci.*, **63**:1607-1623.

ROPSTAD, E. e REFSDAL, A.O., 1987. Herd reproductive performance related to urea concentration in bulk milk. *Acta Vet. Scand.*, **28**:55-63.

ROSENBERGER, 1993. *Exame clínico dos bovinos*. G. Dirksen, H-D. Gründer e M. Stöber (eds.), 3ª edição, Guanabara Koogan. pp. 122-124.

RUSSELL, J.B., 1992. Glucose toxicity and the inability of *Bacteroides ruminicola* to regulate

glucose transport and utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:2040-2045.

RUSSELL, J.B., 1993. The glucose toxicity of *Prevotella ruminicola*: methylglyoxal accumulation and its effect on membrane physiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:2844-2850.

RUSSELL, J.B., 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.*, **76**:1955-1963.

RUSSELL, J.B. e BALDWIN, R.L., 1979. Comparison of maintenance energy expenditures and growth yields among several rumen bacteria grown on continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**:537-543.

RUSSELL, J.B. e DOMBROWSKI, D.B., 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**:604-610.

RUSSELL, J.B. e HESPELL, R.B., 1981. Microbial rumen fermentation. *J. Dairy Sci.*, **64**:1153-1169.

RUSSELL, J.B. e COOK, G.M., 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.*, **59**:48-62.

RUSSELL, J.B. e WILSON, D.B., 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.*, **79**:1503-1509.

RUSSELL, J.B. e MANTOVANI, H.C., 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **4**:347-355.

RUSSELL, J.R., YOUNG, A.W. e JORGENSEN, N.A., 1981. Effect of dietary corn starch intake on ruminal, small intestinal and large intestinal starch digestion in cattle. *J. Anim. Sci.*, **52**:1170-1176.

RUSSELL, J.B., SNIFFEN, C.J. e VAN SOEST, P.J., 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, **66**:763-775.

RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J., DRIESSEN, A.J.M. e KONINGS, W.N., 1988. Sodium-dependent transport of neutral amino acids by whole cells and membrane vesicles of *Streptococcus bovis*, a ruminal bacterium. *J. Bacteriol.*, **170**:3531-3536.

RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J. e MARTIN, S.A., 1990. Strategies of nutrient transport by ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.*, **73**:2996-3012.

RUSSELL, J.B., O'CONNOR, J.D., FOX, D.G., VAN SOEST, P.J. e SNIFFEN, C.J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, **70**:3551-3561.

RYCHLIK, J.L. e RUSSELL, J.B., 2002. Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**:1040-1046.

SAHLU, T., SCHINGOETHE, D.J. e CLARK, A.K., 1984. Lactational and chemical evaluation of soybean meals heat treated by two methods. *J. Dairy Sci.*, **67**:1725-1738.

SAKATA, T. e TAMATE, H., 1978. Rumen epithelial proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *J. Dairy Sci.*, **61**:1109-1113.

SAKATA, T. e TAMATE, H., 1979. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by propionate and acetate. *J. Dairy Sci.*, **62**:49-52.

SAKATA, T., HIKOSAKA, K., SHIOMURA, Y. e TAMATE, H., 1980. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelial cell mitosis in adult sheep. *Br. J. Nutr.*, **44**:325-331.

SALAWU, M.B., ADESOGAN, A.T. e DEWHURST, R.J., 2002. Forage intake, meal patterns, and milk production of lactating dairy cows fed grass silage or pea-wheat bi-crop silages. *J. Dairy Sci.*, **85**:3035-3044.

SALES-DUVAL, M. e BLANCHART, G., 2001. Variation of proteolytic activity in ewe during *in vivo*

digestion of two pea-based diets differing by their fermentability characteristics. *Reprod. Nutr. Dev.*, **41**:297-308.

SALES, M., LUCAS, F. e BLANCHART, G., 2000. Effects of ammonia and amino acids on the growth and proteolytic activity of three species of rumen bacteria: *Prevotella albensis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, and *Streptococcus bovis*. *Curr. Microbiol.*, **40**:380-386.

SALTER, D.N., SMITH, R.H. e HEWITT, D., 1983. Factors affecting the capture of dietary nitrogen by micro-organisms of the forestomachs of the young steer. Experiments with [15N]urea. *Br. J. Nutr.*, **50**:427-435.

SANNES, R.A., MESSMAN, M.A. e VAGNONI, D.B., 2002. Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **85**:900-908.

SANTOS, F.A.P., SANTOS, J.E.P., THEURER, C.B. e HUBER, J.T., 1998. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. *J. Dairy Sci.*, **81**:3182-3213.

SARRASECA, A., MILNE, E., METCALF, M.J. e LOBLEY, G.E., 1998. Urea recycling in sheep: effects of intake. *Br. J. Nutr.*, **79**:79-88.

SATTER, L.D., 1986. Protein supply from undegraded dietary protein. *J. Dairy Sci.*, **69**:2734-2749.

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

SATTER, L.D. e ROFFLER, R.E., 1975. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **58**:1219-1237.

SATTER, L.D. e ROFFLER, R.E., 1977. Influence of nitrogen and carbohydrate inputs on rumen fermentation. **In**: W. Haresign e D. Lewis (eds.), *Recent advances in animal nutrition*, Butterworths, London, pp. 25-49.

SAUVANT, D. e BAS, P., 2001. La digestion des lipides chez le ruminant. INRA *Prod. Anim.*, **14**:303-310.

SCHAEFER, D.M., DAVIS, C.L. e BRYANT, M.P., 1980. Determination of ammonia saturation constants for predominant species of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, **63**:1248-1263.

SCHAGER, W.M., HARRISON, J.H., GASKINS, C.T. e DAVIDSON, D., 2003. Factors affecting application of milk allantoin as an estimator of microbial protein flow to the duodenum under commercial conditions. *J. Dairy Sci.*, **86**:1716-1721.

SCHAIBLY, G.E. e WING, J.M., 1974. Effect of roughage concentrate ratio on digestibility and rumen fermentation of corn silage-citrus pulp rations. *J. Anim. Sci.*, **38**:697-707.

SCHEIFINGER, C., RUSSELL, N. e CHALUPA, W., 1976. Degradation of amino acids by pure cultures of rumen bacteria. *J. Anim. Sci.*, **43**:821-827.

SCHINGOETHE, D.J., 1996. Dietary influence on protein level in milk and milk yield in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **60**:181-190.

SCHINGOETHE, D.J., BROUK, M.J. e BIRKELO, C.P., 1999. Milk production and composition from cows fed wet corn distillers grains. *J. Dairy Sci.*, **82**:574-580.

SCHWAB, C.G., 1996. Amino acid nutrition of the dairy cow: current status. *Proc. of the 1996 Cornell Nutr. Conf. for Feed Manufacturers*. 58th Meeting, Cornell University, Ithaca, NY, pp. 184-198.

SCOLLAN, N.D., KIM, H.J., MAENG, W.J., NEVILLE, M.A., EVANS, R.T. e MCALLAN, A.B., 1996. The effect of cereal carbohydrate supplementation on nutrient flow to the duodenum and microbial protein synthesis in steers fed on grass silage. *Proc. of the XIth International Silage Conference*, University of Wales, Aberystwyth, pp. 228-229.

SCOTT, T.W. e ASHES, J.R., 1993. Dietary lipids for ruminants: protection, utilization and effects on remodelling of skeletal muscle phospholipids. *Aust. J. Agric. Res.*, **44**:495-508.

SEQUEIRA, C.A., 1988. Efeito da adição de sais sódicos ao rúmen na utilização digestiva da fibra. *Tese de Doutoramento*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, XIV. 232 pp.

SENEZ, J.C., 1962. Some considerations on the energetics of bacterial growth. *Bacteriol. Rev.*, **26**:95-107.

SHABI, Z., ARIELI, A., BRUCKENTAL, I., AHARONI, Y., ZAMWEL, S., BOR, A. e TAGARI, H., 1998. Effect of the synchronization of the degradation of dietary crude protein and organic matter and feeding frequency on ruminal fermentation and flow of digesta in the abomasum of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **81**:1991-2000.

SHABI, Z., BRUCKENTAL, I., ZAMWELL, S., TAGARI, H. e ARIELI, A., 1999. Effects of extrusion of grain and feeding frequency on rumen fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:1252-1260.

SHEM, M.N., HOVELL, F.D.D. e KIMAMBO, A.E., 1999. Estimation of net ruminal protein synthesis from urinary allantoin excretion by bulls given tropical feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **81**:279-289.

SHI, Y. e WEIMER, P.J., 1992. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:2583-2591.

SHINGFIELD, K.J. e OFFER, N.W., 1998a. Evaluation of milk allantoin excretion as an index of microbial protein supply in lactating dairy cows. *Anim. Sci.*, **67**:371-385.

SHINGFIELD, K.J. e OFFER, N.W., 1998b. Evaluation of the spot urine sampling technique to assess urinary purine derivative excretion in lactating dairy cows. *Anim. Sci.*, **66**:557-568.

SIBANDA, S., TOPPS, J.H., STORM, E. e ØRSKOV, E.R., 1982. The excretion of allantoin by ruminants in relation to protein entering the abomasums. *Proc. Nutr. Soc.*, **41**:75A.

SICILIANO-JONES, J. e MURPHY, M.R., 1989a. Nutrient digestion in the large intestine as influenced by forage to concentrate ratio and forage physical form. *J. Dairy Sci.*, **72**:471-484.

SICILIANO-JONES, J. e MURPHY, M.R., 1989b. Production of volatile fatty acids in the rumen and cecum-colon of starch as affected by forage:concentrate and forage physical form. *J. Dairy Sci.*, **72**:485-492.

SIDDONS, R.C., NOLAN, J.V., BEEVER, D.E. e MACRAE, J.C., 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. *Br. J. Nutr.*, **54**:175-187.

SILANIKOVE, N., MALTZ, E., HALEVI, A. e SHINDER, D., 1997. Metabolism of water, sodium, potassium, and chlorine by high yielding dairy cows at the onset of lactation. *J. Dairy Sci.*, **80**:949-956.

SINCLAIR, L.A., GARNSWORTHY, P.C., NEWBOLD, J.R. e BUTTERY, P.J., 1993. Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **120**:251-263.

SINCLAIR, L.A., GARNSWORTHY, P.C., NEWBOLD, J.R. e BUTTERY, P.J., 1995. Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release in diets with a similar carbohydrate composition on rumen fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **124**:463-472.

SLOAN, B.K., ROWLINSON, P. e ARMSTRONG, D.G., 1988. The influence of a formulated excess of rumen degradable protein or undegradable protein on milk production in dairy cows in early lactation. *Anim. Prod.*, **46**:13-22.

SLYTER, L.L., OLTJEN, R.R., KERN, D.L. e BLANK, F.C., 1970. Influence of type and level of grain and diethylstilbesterol on the rumen microbial populations of steers fed all-concentrate diets. *J. Anim. Sci.*, **31**:996-1002.

SMEDMAN, A.E.M., GUSTAFSSON, I.-G., BERGLUND, L.G.T. e VESSBY, B.O.H., 1999. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**:22-29.

SMET, A.M.DE, BOEVER, J.L.DE, BRABANDER, D.L.DE, VANACKER, J.M. e BOUCQUÉ, CH.V., 1995. Investigation of dry matter degradation and acidotic effect of some feedstuffs by means on *in sacco* and *in vitro* incubations. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **54**:297-315.

SMITH, R.H., 1979. Synthesis of microbial nitrogen compounds in the rumen and their subsequent digestion. *J. Anim. Sci.*, **49**:1604-1614.

SMITH, G.H. e MCCARTHY, S., 1969. Synthesis of milk fat from beta-hydroxybutyrate and acetate in mammary tissue in the cow. *Biochim. Biophys. Acta*, **176**:664-666.

SNIFFEN, C.J. e ROBINSON, P.H., 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *J. Dairy Sci.*, **70**:425-441.

SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J., FOX, D.G. e RUSSELL, J.B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.*, **70**:3562-3577.

SOLOMONSSON, A., THEANDER, A. e WESTERLUND, E., 1984. Chemical characterization of some cereal whole meal and bran fractions. *Swedish J. Agric. Res.*, **14**:111-117.

SOLORZANO, L.C., ARMENTANO, L.E., GRUMMER, R.R. e DENTINE, M.R., 1989. Effects of sodium bicarbonate or sodium sesquicarbonate on lactating Holstein fed a high grain diet. *J. Dairy Sci.*, **72**:453-461.

SOMERS, M., 1961. Factors influencing the secretion of nitrogen in sheep saliva. 4. The influence of injected urea on the quantitative recovery of urea in the parotid saliva and the urinary secretions of sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **39**:145-156.

STANLEY, R.W. e MORITA, K., 1967. Effect of frequency and method of feeding on performance of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **50**:585-586.

STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H., 1980. *Principles and Procedures of Statistics*: A Biometrical Approach. 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., New York, NY.

STERN, M.D., HOOVER, W.H., SNIFFEN, C.J., CROOKER, B.A. e KNOWLTON, P.H., 1978. Effects of nonstructural carbohydrates, urea and soluble protein levels on microbial protein synthesis in continuous culture of rumen contents. *J. Anim. Sci.*, **47**:944.

STERN, M.D., VARGA, G.A., CLARK, J.H., FIRKINS, J.L., HUBER, J.T. e PALMQUIST, D.L., 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*, **77**:2762-2786.

STOKES, S.R., HOOVER, W.H., MILLER, T.K. e BLAUWEIKEL, R., 1991. Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. *J. Dairy Sci.*, **74**:871-881.

STORM, E. e ØRSKOV, E.R., 1983. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.*, **50**:463-470.

STORRY, J.E., TUCKLEY, B. e HALL, A.J., 1969a. The effects of intravenous infusions of triglycerides on the secretion of milk fat in the cow. *Br. J. Nutr.*, **23**:157-172.

STORRY, J.E., HALL, A.J., TUCKLEY, B. e MILLARD, D., 1969b. The effects of intravenous infusions of cod-liver and soya-bean oils on the secretion of milk fat in the cow. *Br. J. Nutr.*, **23**:173-181.

STORRY, J.E., HALL, A.J. e JOHNSON, V.W., 1973. The effects of increasing amounts of dietary tallow on milk fat secretion in the cow. *J. Dairy Res.*, **40**:293-299.

STOUTHAMER, A.H., 1973. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antoine van Leeuwenhock*, **39**:545-565.

STOUTHAMER, A.H. e BETTENHAUSSEN, C.W., 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch culture of microorganisms. A re-evaluation of ATP production by measuring molar growth yields. *Biochem. Biophys. Acta*, **301**:53-70.

STROBEL, H.J. e RUSSELL, J.B., 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, **69**:2941-2947.

STROBEL, H.J. e RUSSELL, J.B., 1991. Role of sodium in the growth of a ruminal selenomonas. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:1663-1668.

STYRIAK, I., KMET, V. e SPANOVA, A., 1989. Isolation and characterization of two rumen *Streptococcus bovis* bacteriophages. *Microbiologica*, **12**:317-322.

STYRIAK, I., GALFI, P. e KMET, V., 1991. Preliminary observations of interaction between bacteriophages and *Streptococcus bovis* bacteria on ruminal epithelium primoculture. *Vet. Microbiol.*, **29**:281-287.

SUL, H.S., LATASA, M.-J., MOON, Y. e KIM, K.-H., 2000. Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J. Nutr.*, **130**:315S-320S.

SULTAN, J.I., FIRKINS, J.L., WEISS, W.P. e LOERCH, S.C., 1992. Effects of energy level and protein source on nitrogen kinetics in steers fed wheat straw-based diets. *J. Anim. Sci.*, **70**:3916-3921.

SURBER, L.M.M. e BOWMAN, J.G.P., 1998. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.*, **76**:1945-1954.

SURRA, J.C., GUADA, J.A., BALCELLS, J. e CASTRILLO, C., 1997. Renal and salivary clearance of purine derivatives in sheep. *Anim. Sci.*, **65**:83-91.

SUSMEL, P., STEFANON, B., PLAZZOTTA, E., SPANGHERO, M. e MILLS, C.R., 1994a. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **123**:257-265.

SUSMEL, P., SPANGHERO, M., STEFANON, B., MILLS, C.R. e PLAZZOTTA, E., 1994b. Digestibility and allantoin excretion in cows fed diets differing in nitrogen content. *Livest. Prod. Sci.*, **39**:97-99.

SUSMEL, P., SPANGUERO, M., STEFANON, B. e MILLS, C.R., 1995. Nitrogen balance and partitioning of some nitrogen catabolites in milk and urine of lactating cows. *Livest. Prod. Sci.*, **44**:209-219.

SUTTON, J.G., HART, I.C., BROSTER, W.H., ELLIOTT, R.J. e SCHULLER, E., 1986. Feeding frequency for lactating cows: effects on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. *Br. J. Nutr.*, **56**:181-192.

SUTTON, J.D., BINES, J.A., MORANT, S.V. e NAPPER, D.J., 1987. A comparison of starch and fibrous concentrates for milk production, energy utilization and hay intake by friesian cows. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **109**:375-386.

SWAIN, R.A., NOLAN, J.V. e KLIEVE, A.V., 1996. Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:994-997.

TAMMINGA, S., 1992. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.*, **75**:345-357.

TAMMINGA, S., 1996. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J. Anim. Sci.*, **74**:3112-3124.

TAS, M.V., EVANS, R.A. e AXFORD, R.F., 1981. The digestibility of amino acids in the small intestine of the sheep. *Br. J. Nutr.*, **45**:167-174.

TELLER, E. e GODEAU, J.M., 1984a. The association of maize silage with urea: the effect on the ammonia content of the rumen fluid, the N flow in the duodenum, the nitrogen and energy balances and the milk production. *Arch. Tierernahr.*, **34**:227-235.

TELLER, E. e GODEAU, J.M., 1984b. The substitution of soybean meal for urea: the effect on the ammonia content of the rumen fluid, the N flow in the duodenum, the nitrogen and energy balances and the milk production. *Arch. Tierernahr.*, **34**:286-294.

THERION, J.J., KISTNER, A. e KORNELIUS, J.H., 1982. Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactilytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**:428-434.

THEURER, C.B., 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.*, **63**:1649-1662.

THEURER, C.B., HUBER, J.T., DELGADO-ELORDUY, A. e WANDERLEY, R., 1999. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:1950-1959.

THOMAS, J.W., EMERY, R.S., BREAUX, J.K. e LIESMAN, J.S., 1984. Response of milking cows fed a high concentrate, low roughage diet plus sodium bicarbonate, magnesium oxide or magnesium hydroxide. *J. Dairy Sci.*, **67**:2532-2545.

THOMAS, P.C., ROBERTSON S., CHAMBERLAIN D.G., LIVINGSTONE R.M., GARTHWAITE P.H., DEWEY P.J.S., SMART R. e WHYTE C., 1988. Predicting the metabolizable energy (ME) content of compounded feeds for ruminants. **In:** W. Haresign e D. J. A. Cole (eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*, London, Butterworths, pp. 127-146.

THONNEY, M.L., DUHAIME, D.J., MOE, P.W. e REID, J.T., 1979. Acid insoluble ash and permanganate lignin as indicators to determine digestibility of cattle rations. *J. Anim. Sci.*, **49**:1112-1116.

THONNEY, M.L., PALHOF, B.A., DECARLO, M.R., ROSS, D.A., FIRTH, N.L., QUAAS, R.L., PEROSIO, D.J., DUHAIME, D.L. e NOUR, A.Y.M., 1985. Sources of variation of dry matter digestibility measured by the acid insoluble ash marker. *J. Dairy Sci.*, **68**:661-668.

THORNTON, R.F., 1970a. Urea excretion in ruminants. I. Studies in sheep and cattle offered the same diet. *Aust. J. Agric. Res.*, **21**:323-326.

THORNTON, R.F., 1970b. Urea excretion in ruminants. II. Studies in sheep whose rumen contents were replaced with physiological saline. *Aust. J. Agric. Res.*, **21**:337-344.

TIEMEYER, W., STOHRER, M. e GIESECKE, D., 1984. Metabolites of nucleic acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **67**:723-728.

TIMMERMANS, S.J.JR., JOHNSON, L.M., HARRISON, J.H. e DAVIDSON, D., 2000. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using milk uric acid or allantoin. *J. Dairy Sci.*, **83**:1286-1299.

TOLKAMP, B.J., DEWHURST, R.J., FRIGGENS, N.C., KYRIAZAKIS, I., VEERKAMP, R.F. e OLDHAM, J.D., 1998a. Diet choice by dairy cows. 1. Selection of feed protein content during the first half of lactation. *J. Dairy Sci.*, **81**:2657-2669.

TOLKAMP, B.J., KYRIAZAKIS, I., OLDHAM, J.D., LEWIS, M., DEWHURST, R.J. e NEWBOLD, J.R., 1998b. Diet choice by dairy cows. 2. Selection for metabolizable protein or for ruminally degradable protein? *J. Dairy Sci.*, **81**:2670-2680.

TOPPS, J.H. e ELLIOTT, R.C., 1965. Relationship between concentration of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature*, **205**:498-499.

TOUSSANT, M.J., WILSON, M.D. e CLARKE, S.D., 1981. Coordinate suppression of liver acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthetase by polyunsaturated fat. *J. Nutr.*, **111**:146-153.

TOWNE, G., NAGARAJA, T.G., COCHRAN, R.C., HARMON, D.L., OWENSBY, C.E. e KAUFMAN, D.W., 1988. Comparisons of ruminal fermentation characteristics and microbial populations in bison and cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:2510-2514.

TOWNE, G., NAGARAJA, T.G., BRANDT JR., R.T. e KEMP, K.E., 1990. Ruminal ciliated protozoa in cattle fed finishing diets with or without supplemental fat. *J. Anim. Sci.*, **68**:2150-2155.

TYUTIKOV, F.M., BESPALOVA, I.A., REBENTISH, B.A., ALEKSANDRUSHKINA, N.N. e KRIVISKY, A.S., 1980. Bacteriophages of methanotrophic bacteria. *J. Bacteriol.*, **144**:375-381.

ULYATT, M.J., WAGHORN, G.C., JOHN, A., REID, C.S.W. e MONRO, J., 1984. Effect of intake and feeding frequency on feeding behaviour and quantitative aspects of digestion in sheep fed chaffed Lucerne hay. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **102**:645-657.

USHIDA, K. e JOUANY, J.P., 1985. Effect of protozoa on rumen protein degradation in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.*, **25**:1075-1081.

USHIDA, K. e KOJIMA, Y., 1991. Effect of defaunation and refaunation of the rumen on cellulolytic *in vitro* with or without ammonia supplementation. *Can. J. Anim. Sci.*, **71**:913-917.

USHIDA, K., JOUANY, J.P. e DEMEYER, D.I., 1984. Protozoal contribution to nitrogen metabolism in sheep. *Can. J. Anim. Sci.*, **64**(Suppl.):20-21.

USHIDA, K., KAYOULI, C., DE SMET, S. e JOUANY, J.P., 1990. Effect of defaunation on protein and fibre digestion in sheep fed on ammonia-treated straw-based diets with or without maize. *Br. J. Nutr.*, **64**:765-775.

USHIDA, K., JOUANY, J.P. e DEMEYER, D.I., 1991. Effects of presence or absence of rumen protozoa on the efficiency of utilization of concentrate and fibrous feeds. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: Proc. of the seventh international symposium on ruminant physiology*. pp. 625-654.

VAGNONI, D.B. e BRODERICK, G.A., 1997. Effects of supplementation of energy or ruminally undegraded protein to lactating cows fed alfalfa hay or silage. *J. Dairy Sci.*, **80**:1703-1712.

VAGNONI, D.B., BRODERICK, G.A., CLAYTON, M.K. e HATFIELD, R.D., 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *J. Dairy Sci.*, **80**:1695-1702.

VALADARES, R.F.D., BRODERICK, G.A., VALADARES FILHO, S.C. e CLAYTON, M.K., 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.*, **82**:2686-2696.

VAN BARNEVELD, S.L., 1999. Chemical and physical characteristics of grains related to variability in energy and amino acid availability in ruminants: a review. *Aust. J. Agric. Res.*, **50**:651-666.

VAN HORN, H.H., FOREMAN, C.F. e RODRIGUEZ, J.E., 1967. Effect of high-urea supplementation on feed intake and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **50**:709-714.

VAN HORN, H.H., JACOBSON, D.R. e GRADEN, A.P., 1969. Influence of level and source of nitrogen on milk production and blood components. *J. Dairy Sci.*, **52**:1395-1403.

VAN HORN, H.H., ZOMETA, C.A., WILCOX, C.J., MARSHALL, S.P. e HARRIS JR., B., 1979. Complete rations for dairy cattle. VIII. Effect of percent and source of protein on milk yield and ration digestibility. *J. Dairy Sci.*, **62**:1086-1093.

VAN HORN, H.H., BLANCO, O., HARRIS JR., B. e BEEDE, D.K., 1985. Interaction of protein percent with caloric density and protein source for lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **68**:1682-1695.

VAN KESSEL, J.S. e RUSSELL, J.B., 1992. Energetics of arginine and lysine transport by whole cells and membrane vesicles of strain SR, a monensin-sensitive ruminal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:969-975.

VAN KESSEL, J.S. e RUSSELL, J.B., 1996. The effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal

bacteria and its impact on energy spilling. *J. Dairy Sci.*, **79**:1237-2448.

VAN KEULEN, J. e YOUNG, B.A., 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.*, **44**:282-287.

VAN NEVEL, C.J. e DEMEYER, D.I., 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soyabean oil by rumen contents *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.*, **36**:53-63.

VAN NEVEL, C., FIEVEZ, V. e DEMEYER, D., 1999. Lipolysis and biohydrogenation of PUFAs from fish oil during *in vitro* incubations with rumen contents. *Proc. Nutr. Soc.*, **58**.

VAN SOEST, P.J., 1994. *Nutrition ecology of the ruminant*. 2nd edition, Comstock, Cornell University press, Ithaca, New York, 476 pp.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B. e LEWIS, B.A., 1991. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal production. *J. Dairy Sci.*, **74**:3583-3597.

VANCE, R.D., PRESTON, R.L., KLOSTERMAN, E.W. e CAHILL, V.R., 1972. Utilization of whole shelled and crimped corn grain with varying proportions of corn silage by growing-finishing steers. *J. Anim. Sci.*, **35**:598-605.

VARGA, G.A. e KOLVER, E.S., 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *Amer. Soc. Nutr. Sci.*. pp. 819S-823S.

VEIRA, D.M., 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci.*, **63**:1547-1560.

VELLE, W., SJAASTAD, Ø.V., AULIE, A., GRØNSET, D., FEIGENWINTER, K. e FRAMSTAD, T., 1997. Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows. *J. Dairy Sci.*, **80**:3325-3332.

VERBIC, J., CHEN, X.B., MACLEOD, N.A. e ØRSKOV, E.R., 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **114**:243-248.

VERCOE, J.E., 1969. The transfer of nitrogen from the blood to the rumen of cattle. *Aust. J. Agric. Res.*, **20**:191-197.

VÉRITÉ, R. e DELABY, L., 1998. Conduite alimentaire et rejetes azotes chez la vache laitière. Interrelations avec les performances. *Renc. Rech. Ruminants*, **5**:185-192.

VICINI, J.L., COHICK, W.S., CLARK, J.H., MCCUTCHEON, S.N. e BAUMAN, D.E., 1988. Effects of feed intake and sodium bicarbonate on milk production and concentrations of hormones and metabolites in plasma of cows. *J. Dairy Sci.*, **71**:1232-1238.

VLAEMINK, B.M., BRUINENBERG, H., FIEVEZ, V., RAES, K. e DEMEYER, D., 2002. Effect of crude protein fibre content in grass silage on milk odd-chain fatty acids. *Reprod. Nutr. Dev.*, **42**(Supl. 1):71A.

VLAEMINK, B., FIEVEZ, V., PEIRTSEGAELE, W., VANDEWOUDE, H., VAN VUUREN, A.M. e DEMEYER, D., 2003. Milk odd chain fatty acids as predictors of microbial protein supply in dairy cattle. *Book of Abstracts* N°. 9, 54th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Roma, Italy, August 31st - September 3rd, pp. 136.

VOSS, V.L., STEHR, D., SATTER, L.D. e BRODERICK, G.A., 1988. Feeding lactating dairy cows proteins resistant to ruminal degradation. *J. Dairy Sci.*, **71**:2428-2439.

VRIES, W.DE, KAPTEIJN, W.M., VAN DER BEEK, E.G. e STOUTHAMER, A.H., 1970. Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus case* L3 in batch cultures and in continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.*, **63**:333-345.

WADHWA, D., BECK, N.F.G., BORGIDA, L.P., DHANOA, M.S. e DEWHURST, R.J., 2001a.

Development of a simple *in vitro* assay for estimating net rumen acid load from diet ingredients. *J. Dairy Sci.*, **84**:1109-1117.

WADHWA, D., BORGIDA, L.P., DHANOA, M.S. e DEWHURST, R.J., 2001b. Rumen acid production from dairy feeds. 2. Effects of diets based on corn silage on feed intake and milk yield. *J. Dairy Sci.*, **84**:2730-2737.

WALLACE, R.J., 1979. Effect of ammonia concentration on the composition, hydrolytic activity and nitrogen metabolism of the microbial flora of the rumen. *J. Appl. Microbiol.*, **47**:443-455.

WALLACE, R.J., 1983. Hydrolysis of ^{14}C-labelled proteins by rumen micro-organisms and by adsorption in proteolysis. *Br. J. Nutr.*, **53**:399-408.

WALLACE, R.J., 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. *J. Nutr.*, **126**(Supl.4):1326S-1334S.

WALLACE, R.J. e JOBLIN, K.N., 1985. Proteolytic activity of rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.*, **29**:19-25.

WALLACE, R.J. e MCPHERSON, C.A., 1987. Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in rumen fluid. *Br. J. Nutr.*, **58**:313-323.

WALLACE, R.J. e COTTA, M.A., 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. **In**: P.N. Hobson (ed.), *The rumen microbial ecosystem*, London, Elsevier, pp. 217-249.

WALLACE, R.J., BRODERICK, G.A. e BRAMMAL, M.L., 1987. Microbial protein and peptide metabolism in rumen fluid from faunated and ciliate-free sheep. *Br. J. Nutr.*, **58**:87-93.

WALLACE, R.J., FALCONER, M.L. e BHARGAVA, P.K., 1989. Toxicity of volatile fatty acids at rumen pH prevents enrichment of *Escherichia coli* by sorbitol in rumen contents. *Curr. Microbiol.*, **19**:277-281.

WALLNOFER, P., BALDWIN, R.L. e STAGNO, E., 1966. Conversion of C^{14}-labelled substrates to volatile fatty acids by the rumen. *Appl. Microbiol.*, **14**:1004-1010.

WANG, S.J., FOX, D.G., CHERNEY, D.J.R., KLAUSNER, S.D. e BOULDIN, D.R., 1999. Impact of dairy farming on well water nitrate level and soil content of phosphorus and potassium. *J. Dairy Sci.*, **82**:2164-2169.

WARD, G.M., HUFFMAN, C.F. e DUNCAN, C.W., 1955. Urea as a protein extender for lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **38**:298-302.

WARD, A.T., WITTENBERG, K.M. e PRZYBYLSKI, R., 2002. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding diets containing solin, flax and canola. *J. Dairy Sci.*, **85**:1191-1196.

WATTIAUX, M.A., COMBS, D.K. e SHAVER, R.D., 1994. Lactational responses to ruminally undegradable protein by dairy cows fed diets based on alfalfa silage. *J. Dairy Sci.*, **77**:1604-1617.

WEBSTER, J., 1993. *Understanding the dairy cow*. Blackwell Scientific Publications, Second Edition, 374 pp.

WEIGAND, E., YOUNG, J.W. e MCGILLIARD, A.D., 1975. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain. *J. Dairy Sci.*, **58**:1294-1300.

WEIGEL, D.J., ELLIOTT, J.P. e CLARK., J.H., 1997. Effects of amount and ruminal degradability of protein on nutrient digestibility and production by cows fed tallow. *J. Dairy Sci.*, **80**:1150-1159.

WEIMER, P.J., 1992. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, **12**:189-223.

WEIMER, P.J., WAGHORN, G.C., ODT, C.L. e MERTENS, D.R., 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacyteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**:122-134.

WELLS, J.E. e RUSSELL, J.B., 1994. The endogenous metabolism of *Fibrobacter succinogenes* and its relationship to cellobiose transport, viability and cellulose digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**:471-476.

WELLS, J.E. e RUSSELL, J.B., 1996a. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly? *J. Dairy Sci.*, **79**:1487-1495.

WELLS, J.E. e RUSSELL, J.B., 1996b. The effect of growth and starvation on the lysis of the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:1342-1346.

WEST, J.W., COPPOCK, C.E., NAVE, D.H., LABORE, J.M., GREENE, L.W. e ODOM, T.W., 1987. Effects of potassium carbonate and sodium bicarbonate on rumen function in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **70**:81-90.

WESTLAKE, K. e MACKIE, R.I., 1990. Peptide and amino acid transport in *Streptococcus bovis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**:97-102.

WESTON, R.H., 1988. Factors limiting the intake of feed by sheep. The effects of concentrate supplements on the voluntary consumption and digestion of a medium-quality roughage. *Aust. J. Agric. Res.*, **39**:255-271.

WESTON, R.H. e HOGAN, J.P., 1967. The transfer of nitrogen from the blood to the rumen of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, **20**:967-973.

WHITE, S.L., BERTRAND, J.A., WADE, M.R., WASHBURN, S.P., GREEN JR., J.T. e JENKINS, T.C., 2001. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.*, **84**:2295-2301.

WHITFORD, M.F., MCPHERSON, M.A., FORSTER, R.J. e TEATHER, R.M., 2001. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:569-574.

WING, J.M., 1975. Effect of physical form and amount of citrus pulp on utilization of complete feeds for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **58**:63-66.

WITT, M.W., SINCLAIR, L.A., WILKINSON, R.G. e BUTTERY, P.J., 2000. The effects of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen supply to the rumen on milk production and metabolism of ewes offered grass silage based diets. *Anim. Sci.*, **71**:187-195.

WOHLT, J.E. e CLARK, J.H., 1978. Nutritional value of urea versus performed protein for ruminants. I. Lactation of dairy cows fed corn based diets containing supplemental nitrogen from urea and/or soybean meal. *J. Dairy Sci.*, **61**:902-915.

WOHLT, J.E., CHMIEL, S.L., ZAJAC, P.K., BACKER, L., BLETHEN, D.B. e EVANS, J.L., 1991. Dry matter intake, milk yield and composition, and nitrogen use in Holstein cows fed soybean, fish, or corn gluten meals. *J. Dairy Sci.*, **74**:1609-1622.

WOLIN, M.J., 1969. Volatile fatty acids and the inhibition of *Escherichia coli* growth by rumen fluid. *Appl. Microbiol.*, **17**:83-90.

WOLK, A., VESSBY, B., LJUNG, H. e BARREFORS, P., 1998. Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**:291-295.

WOODFORD, S.T., MURPHY, M.R. e DAVIS, C.L., 1984. Water dynamics of dairy cattle as affected by initiation of lactation and feed intake. *J. Dairy Sci.*, **67**:2336-2343.

WRENN, T.R., BITMAN, J., WATERMAN, R.A., WEYANT, J.R., WOOD, D.L., STROZINSKI, L.L. e HOOVEN, N.W., 1978. Feeding protected and unprotected tallow to lactating cows. *J. Dairy Sci.*, **61**:49-58.

WRIGHT, T.C., MOSCARDINI, S., LUIMES, P.H., SUSMEL, P. e MCBRIDE B.W., 1998. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on nitrogen balance and milk protein production in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **81**:784-793.

WU. Z. e SATTER, L.D., 2000. Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. *J. Dairy Sci.*, **83**:1042-1051.

WU, Z., FISHER, R.J., POLAN, C.E. e SCHWAB, C.G., 1997. Lactational performance of cows fed low or high ruminally undegradable protein prepartum and supplemental methionine and lysine postpartum. *J. Dairy Sci.*, **80**:722-729.

YANG, C.-M., e VARGA, G.A., 1989. Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **72**:950-957.

YANG, C.-M.J. e VARGA, G.A., 1993. The effects of continuous ruminal dosing with diocetyl sodium sulphosuccinate on ruminal and metabolic characteristics of lactating Holstein cows. *Br. J. Nutr.*, **69**:397-408.

YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A., KOENIG, K.M. e RODE, L.M., 1997. Comparison of hull-less barley, or corn for lactating cows: effects on extent of digestion and milk production. *J. Dairy Sci.*, **80**:2475-2486.

YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A. e RODE, L.M., 2001. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **84**:2203-2216.

YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A. e VEDRES, D.D., 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **102**:137-150.

YANG, Z., LIU, S., CHEN, X., HUANG, M. e ZHENG, J., 2000. Induction of apoptotic cell death and *in vivo* growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer Res.* **60**:505-509.

YANKE, L.J., DONG, Y., MCALLISTER, T.A., BAE, H.D. e CHENG, K.J., 1993. Comparison of amylolytic and proteolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Can. J. Microbiol.*, **39**:817-820.

ZIMMERMAN, C.A., RAKES, A.H., JAQUETTE, R.D., HOPKINS, B.A. e CROOM JR., W.J., 1991. Effects of protein level and forage source on milk production and composition in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **74**:980-990.

ZIMMERMAN, C.A., RAKES, A.H., DANIEL, T.E. e HOPKINS, B.A., 1992. Effect of total and rumen undegradable protein on the performance of cows fed low fiber diets. *J. Dairy Sci.*, **75**:1954-1964.

ZINN, R.A., 1990. Influence of flake density on the comparative feeding value of steam-flaked corn for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*, **68**:767-775.

ZINN, R.A. e OWENS, F.N., 1983. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. *J. Anim. Sci.*, **56**:471-475.

ZORRILLA-RIOS, J., HORN, G.W. e MCNEW, R.W., 1989. Effect of ammoniation and energy supplementation on the utilization of wheat straw by sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **22**:305-320.

Anexo I

QUADRO 1.1.A – Constituição dos quadrados segundo o número de lactação, dias em lactação e produção de leite (kg dia^{-1}; média ± desvio padrão).

	Número de lactação	Dias em lactação	Produção de leite
Experiência 1			
Quadrado 1	1,0 ± 0,00	151,0 ± 11,14	29,0 ± 4,30
Quadrado 2	2,0 ± 0,00	151,7 ± 11,50	30,4 ±1,67
Quadrado 3	2,7 ± 1,15	145,3 ± 19,50	28,2 ±7,66
Experiência 2			
Quadrado 1	4,0 ± 1,00	83,7 ± 16,44	34,8 ±4,04
Quadrado 2	1,0 ± 0,00	75,0 ± 35,54	30,6 ± 6,70
Quadrado 3	4,0 ± 1,00	31,3 ± 5,77	36,6 ± 3,03
Experiência 3			
Quadrado 1	3,3 ± 0,58	118,3 ± 24,38	34,9 ± 4,60
Quadrado 2	1,0 ± 0,00	116,3 ± 47,52	28,3 ± 1,10
Quadrado 3	1,0 ± 0,00	145,7 ± 13,61	23,0 ± 3,52

QUADRO 1.2.A – Composição química (g kg^{-1} MS) das amostras de silagem de milho e de feno de azevém recolhidas antes do início das experiências.

Alimento	MS†	pH	Cinza	PB	GB	NDF	ADF	ADL	Amido
Silagem de milho									
Exp. 1	321,4	3,6	41,2	74,2	34,2	500,7	310,3	40,6	325,2
Exp. 2 e 3	328,9	3,6	32,6	68,2	24,9	450,0	256,2	47,0	284,8
Feno de azevém									
Exp. 1	908,0	ND	72,1	89,2	11,3	748,2	451,9	66,4	ND
Exp. 2 e 3	834,0	ND	71,3	64,3	16,5	685,3	457,2	85,0	ND

†g kg^{-1}.

QUADRO 1.3.A – Composição química dos refugos das experiências 1, 2 e 3 (g kg^{-1} MS). Desvio padrão entre parêntesis.

	n	MS†	Cinza	PB	NDF	ADF	ADL	Amido
Experiência 1								
RL	8	418,6	69,9	116,1	464,5	260,8	45,9	146,6
		(50,00)	(10,28)	(26,43)	(35,88)	(47,68)	(11,63)	(26,69)
RM	8	400,9	71,2	115,2	490,9	267,5	50,8	134,3
		(58,11)	(4,53)	(15,57)	(32,85)	(40,75)	(6,63)	(21,48)
RH	8	388,2	74,3	125,5	473,5	278,2	50,7	142,2
		(69,29)	(7,19)	(12,61)	(21,64)	(34,47)	(5,03)	(27,53)
Experiência 2								
U0	9	395,1	68,5	130,3	409,7	231,9	422,4	190,4
		(60,33)	(4,55)	(21,71)	(52,15)	(37,65)	(8,41)	(39,79)
U5	9	413,6	69,1	131,8	427,2	236,3	42,1	177,3
		(43,18)	(2,36)	(15,01)	(30,90)	(22,94)	(5,86)	(23,55)
U10	7	401,7	68,6	134,0	428,8	243,7	43,8	180,9
		(57,33)	(3,46)	(12,04)	(25,20)	(19,06)	(6,30)	(10,45)
Experiência 3								
DU	7	373,7	60,0	106,8	500,5	300,2	54,9	154,8
		(19,72)	(5,77)	(11,59)	(46,20)	(29,84)	(12,50)	(21,03)
D2	7	343,9	58,1	86,5	491,8	291,5	47,8	193,8
		(41,17)	(2,95)	(4,85)	(31,73)	(20,94)	(4,91)	(34,09)
D1	7	374,6	59,3	97,7	504,3	296,0	46,7	161,6
		(23,62)	(5,13)	(29,30)	(39,24)	(21,11)	(3,61)	(10,13)

†g kg^{-1}.

QUADRO 1.4.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria seca da dieta da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,078	0,005	1,41	0,320
Erro	8	0,029	0,004		
Total corrigido	23	0,107			
Tipo III					
Quadrado	2	0,008	0,004	1,04	0,398
Vaca (Quadrado)	5	0,024	0,005	1,31	0,350
Período (Quadrado)	6	0,022	0,004	1,00	0,485
Dieta	2	0,021	0,011	2,91	0,113

QUADRO 1.5.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria orgânica da dieta da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,074	0,005	1,44	0,308
Erro	8	0,027	0,003		
Total corrigido	23	0,101			
Tipo III					
Quadrado	2	0,007	0,004	1,09	0,380
Vaca (Quadrado)	5	0,024	0,005	1,38	0,326
Período (Quadrado)	6	0,020	0,003	0,99	0,490
Dieta	2	0,020	0,010	2,92	0,111

Quadro 1.6.A – Análise de variância da digestibilidade da fibra de detergente neutro da dieta da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,265	0,018	1,40	0,323
Erro	8	0,101	0,013		
Total corrigido	23	0,365			
Tipo III					
Quadrado	2	0,023	0,011	0,90	0,444
Vaca (Quadrado)	5	0,074	0,015	1,17	0,401
Período (Quadrado)	6	0,074	0,012	0,99	0,492
Dieta	2	0,079	0,039	3,14	0,099

QUADRO 1.7.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria seca da dieta da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,082	0,005	2,09	0,147
Erro	8	0,020	0,002		
Total corrigido	24	0,101			
Tipo III					
Quadrado	2	0,001	0,001	0,04	0,958
Vaca (Quadrado)	6	0,022	0,004	1,52	0,286
Período (Quadrado)	6	0,046	0,008	3,15	0,069
Dieta	2	0,003	0,001	0,52	0,612

QUADRO 1.8.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria orgânica da dieta da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,077	0,005	2,15	0,137
Erro	8	0,018	0,002		
Total corrigido	24	0,095			
Tipo III					
Quadrado	2	0,002	0,001	0,04	0,964
Vaca (Quadrado)	6	0,021	0,004	1,57	0,271
Período (Quadrado)	6	0,044	0,007	3,25	0,063
Dieta	2	0,002	0,001	0,51	0,618

QUADRO 1.9.A – Análise de variância da digestibilidade da fibra de detergente neutro da dieta da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,243	0,015	1,78	0,206
Erro	8	0,068	0,009		
Total corrigido	24	0,311			
Tipo III					
Quadrado	2	0,004	0,002	0,21	0,815
Vaca (Quadrado)	6	0,076	0,013	1,49	0,292
Período (Quadrado)	6	0,128	0,021	2,51	0,114
Dieta	2	0,004	0,002	0,21	0,818

QUADRO 1.10.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria seca da dieta da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,052	0,003	2,92	0,155
Erro	4	0,004	0,001		
Total corrigido	20	0,056			
Tipo III					
Quadrado	2	0,002	0,001	0,83	0,501
Vaca (Quadrado)	6	0,014	0,002	2,17	0,237
Período (Quadrado)	6	0,021	0,003	3,14	0,144
Dieta	2	0,004	0,002	1,86	0,269

QUADRO 1.11.A – Análise de variância da digestibilidade da matéria orgânica da dieta da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,044	0,003	3,00	0,148
Erro	4	0,004	0,001		
Total corrigido	20	0,047			
Tipo III					
Quadrado	2	0,002	0,001	0,86	0,488
Vaca (Quadrado)	6	0,012	0,002	2,13	0,243
Período (Quadrado)	6	0,017	0,003	3,04	0,150
Dieta	2	0,003	0,001	1,44	0,339

QUADRO 1.12.A – Análise de variância da digestibilidade da fibra de detergente neutro da dieta da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,122	0,008	3,11	0,141
Erro	4	0,010	0,002		
Total corrigido	20	0,132			
Tipo III					
Quadrado	2	0,003	0,002	0,71	0,545
Vaca (Quadrado)	6	0,040	0,007	2,72	0,176
Período (Quadrado)	6	0,043	0,007	2,93	0,158
Dieta	2	0,009	0,005	1,85	0,270

QUADRO 1.13.A – Análise de variância da ingestão de matéria seca da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	99,568	6,638	11,18	0,001
Erro	8	4,749	0,594		
Total corrigido	23	104,318			
Tipo III					
Quadrado	2	54,838	27,419	46,19	0,001
Vaca (Quadrado)	5	20,759	4,152	6,99	0,009
Período (Quadrado)	6	4,433	0,739	1,24	0,377
Dieta	2	15,554	7,777	13,10	0,003

QUADRO 1.14.A – Análise de variância da produção de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	336,199	22,413	13,91	0,001
Erro	8	12,893	1,612		
Total corrigido	23	349,091			
Tipo III					
Quadrado	2	110,556	55,278	34,30	0,001
Vaca (Quadrado)	5	181,160	36,232	22,48	0,001
Período (Quadrado)	6	21,160	3,527	2,19	0,151
Dieta	2	24,118	12,059	7,48	0,015

QUADRO 1.15.A – Análise de variância da produção de leite corrigida para 4% de gordura da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	307,865	20,524	6,34	0,006
Erro	8	25,879	3,235		
Total corrigido	23	333,744			
Tipo III					
Quadrado	2	212,198	106,099	32,80	0,001
Vaca (Quadrado)	5	63,064	12,613	3,90	0,044
Período (Quadrado)	6	17,181	2,863	0,89	0,546
Dieta	2	18,306	9,153	2,83	0,118

QUADRO 1.16.A – Análise de variância do teor em gordura do leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	9,460	0,631	4,27	0,022
Erro	8	1,180	0,148		
Total corrigido	23	10,641			
Tipo III					
Quadrado	2	0,815	0,408	2,76	0,122
Vaca (Quadrado)	5	7,599	1,520	10,30	0,003
Período (Quadrado)	6	0,475	0,079	0,54	0,768
Dieta	2	0,650	0,325	2,20	0,173

QUADRO 1.17.A – Análise de variância do teor em proteína do leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	1,975	0,132	9,32	0,002
Erro	8	0,113	0,014		
Total corrigido	23	2,088			
Tipo III					
Quadrado	2	0,244	0,122	8,64	0,010
Vaca (Quadrado)	5	1,510	0,302	21,37	0,001
Período (Quadrado)	6	0,193	0,032	2,27	0,140
Dieta	2	0,025	0,012	0,87	0,456

QUADRO 1.18.A – Análise de variância do teor em lactose do leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,538	0,036	3,31	0,046
Erro	8	0,087	0,011		
Total corrigido	23	0,625			
Tipo III					
Quadrado	2	0,018	0,009	0,83	0,470
Vaca (Quadrado)	5	0,424	0,085	7,83	0,006
Período (Quadrado)	6	0,036	0,006	0,56	0,753
Dieta	2	0,053	0,027	2,45	0,148

QUADRO 1.19.A – Análise de variância da produção diária de gordura do leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,805	0,054	4,60	0,018
Erro	8	0,093	0,012		
Total corrigido	23	0,899			
Tipo III					
Quadrado	2	0,478	0,239	20,47	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,246	0,049	4,21	0,036
Período (Quadrado)	6	0,042	0,007	0,60	0,724
Dieta	2	0,050	0,025	2,14	0,180

QUADRO 1.20.A – Análise de variância da produção diária de proteína do leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,300	0,020	9,10	0,002
Erro	8	0,018	0,002		
Total corrigido	23	0,318			
Tipo III					
Quadrado	2	0,260	0,130	59,05	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,013	0,003	1,20	0,390
Período (Quadrado)	6	0,008	0,001	0,63	0,707
Dieta	2	0,016	0,008	3,73	0,072

QUADRO 1.21.A – Análise de variância da produção diária de lactose do leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,765	0,051	23,88	0,001
Erro	8	0,017	0,002		
Total corrigido	23	0,782			
Tipo III					
Quadrado	2	0,260	0,130	60,97	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,422	0,084	39,53	0,001
Período (Quadrado)	6	0,051	0,009	3,99	0,038
Dieta	2	0,034	0,017	7,96	0,013

QUADRO 1.22.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite e a ingestão de matéria seca, da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,672	0,045	3,96	0,028
Erro	8	0,090	0,011		
Total corrigido	23	0,762			
Tipo III					
Quadrado	2	0,001	0,001	0,06	0,942
Vaca (Quadrado)	5	0,566	0,113	10,00	0,003
Período (Quadrado)	6	0,095	0,016	1,40	0,323
Dieta	2	0,002	0,001	0,09	0,917

QUADRO 1.23.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a ingestão de matéria seca, da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,206	0,014	0,91	0,586
Erro	8	0,121	0,015		
Total corrigido	23	0,328			
Tipo III					
Quadrado	2	0,049	0,025	1,63	0,254
Vaca (Quadrado)	5	0,057	0,011	0,75	0,611
Período (Quadrado)	6	0,075	0,012	0,82	0,582
Dieta	2	0,031	0,016	1,03	0,400

QUADRO 1.24.A – Análise de variância da eficiência de utilização da proteína da dieta na síntese de proteína do leite, medida como a relação entre a produção de proteína do leite e a ingestão de proteína bruta, da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,032	0,002	2,96	0,063
Erro	8	0,006	0,001		
Total corrigido	23	0,038			
Tipo III					
Quadrado	2	0,004	0,002	2,55	0,139
Vaca (Quadrado)	5	0,004	0,001	0,99	0,479
Período (Quadrado)	6	0,003	0,001	0,57	0,743
Dieta	2	0,019	0,010	13,29	0,003

QUADRO 1.25.A – Análise de variância do peso vivo da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	89856,533	5990,436	83,28	0,001
Erro	8	575,467	71,933		
Total corrigido	23	90432,000			
Tipo III					
Quadrado	2	40394,500	20197,250	280,78	0,001
Vaca (Quadrado)	5	45378,833	9075,767	126,17	0,001
Período (Quadrado)	6	3964,450	660,742	9,19	0,003
Dieta	2	360,867	180,433	2,51	0,143

QUADRO 1.26.A – Análise de variância da ingestão de matéria seca da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	219,969	13,748	25,75	0,001
Erro	8	4,271	0,534		
Total corrigido	24	224,240			
Tipo III					
Quadrado	2	125,895	62,947	117,91	0,001
Vaca (Quadrado)	6	82,327	13,721	25,70	0,001
Período (Quadrado)	6	9,869	1,645	3,08	0,072
Dieta	2	1,284	0,642	1,20	0,350

QUADRO 1.27.A – Análise de variância da produção de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	347,934	21,746	5,64	0,009
Erro	8	30,864	3,858		
Total corrigido	24	378,797			
Tipo III					
Quadrado	2	238,752	119,376	30,94	0,001
Vaca (Quadrado)	6	88,549	14,758	3,83	0,042
Período (Quadrado)	6	47,867	7,978	2,07	0,168
Dieta	2	3,365	1,683	0,44	0,661

QUADRO 1.28.A – Análise de variância da produção de leite corrigida para 4% de gordura da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	769,919	48,120	6,80	0,005
Erro	8	56,624	7,078		
Total corrigido	24	826,544			
Tipo III					
Quadrado	2	514,308	257,154	36,33	0,001
Vaca (Quadrado)	6	88,608	14,768	2,09	0,166
Período (Quadrado)	6	139,559	23,260	3,29	0,062
Dieta	2	2,966	1,483	0,21	0,815

QUADRO 1.29.A – Análise de variância do teor em gordura do leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	7,763	0,485	3,52	0,038
Erro	8	1,101	0,138		
Total corrigido	24	8,864			
Tipo III					
Quadrado	2	2,380	1,190	8,64	0,010
Vaca (Quadrado)	6	1,770	0,295	2,14	0,157
Período (Quadrado)	6	2,268	0,378	2,75	0,094
Dieta	2	0,309	0,154	1,12	0,372

QUADRO 1.30.A – Análise de variância do teor em proteína do leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,882	0,055	19,53	0,001
Erro	8	0,023	0,003		
Total corrigido	24	0,904			
Tipo III					
Quadrado	2	0,168	0,084	29,73	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,478	0,080	28,25	0,001
Período (Quadrado)	6	0,165	0,027	9,72	0,003
Dieta	2	0,006	0,003	1,00	0,409

QUADRO 1.31.A – Análise de variância do teor em lactose do leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	1,426	0,089	17,81	0,001
Erro	8	0,040	0,005		
Total corrigido	24	1,466			
Tipo III					
Quadrado	2	0,002	0,001	0,19	0,832
Vaca (Quadrado)	6	0,336	0,056	11,18	0,002
Período (Quadrado)	6	0,966	0,161	32,16	0,001
Dieta	2	0,007	0,004	0,71	0,521

QUADRO 1.32.A – Análise de variância da produção diária de gordura do leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	2,095	0,131	5,75	0,009
Erro	8	0,182	0,023		
Total corrigido	24	2,277			
Tipo III					
Quadrado	2	1,210	0,605	26,57	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,254	0,042	1,86	0,205
Período (Quadrado)	6	0,451	0,075	3,30	0,061
Dieta	2	0,021	0,011	0,46	0,646

QUADRO 1.33.A – Análise de variância da produção diária de proteína do leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,333	0,021	5,10	0,013
Erro	8	0,033	0,004		
Total corrigido	24	0,365			
Tipo III					
Quadrado	2	0,201	0,100	24,58	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,149	0,025	6,10	0,011
Período (Quadrado)	6	0,039	0,006	1,58	0,267
Dieta	2	0,003	0,001	0,36	0,706

QUADRO 1.34.A – Análise de variância da produção diária de lactose do leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	1,485	0,093	7,01	0,004
Erro	8	0,106	0,013		
Total corrigido	24	1,591			
Tipo III					
Quadrado	2	0,641	0,320	24,20	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,454	0,076	5,71	0,014
Período (Quadrado)	6	0,377	0,063	4,74	0,024
Dieta	2	0,010	0,005	0,38	0,697

QUADRO 1.35.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite e a ingestão de matéria seca, da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,705	0,044	6,53	0,006
Erro	8	0,054	0,007		
Total corrigido	24	0,759			
Tipo III					
Quadrado	2	0,133	0,067	9,88	0,007
Vaca (Quadrado)	6	0,462	0,077	11,40	0,002
Período (Quadrado)	6	0,039	0,007	0,97	0,500
Dieta	2	0,014	0,007	1,07	0,387

QUADRO 1.36.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a ingestão de matéria seca, da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,537	0,034	3,20	0,050
Erro	8	0,084	0,010		
Total corrigido	24	0,621			
Tipo III					
Quadrado	2	0,245	0,123	11,69	0,004
Vaca (Quadrado)	6	0,129	0,022	2,05	0,171
Período (Quadrado)	6	0,103	0,017	1,64	0,253
Dieta	2	0,001	0,001	0,01	0,993

QUADRO 1.37.A – Análise de variância da eficiência de utilização da proteína da dieta na síntese de proteína do leite, medida como a relação entre a produção de proteína do leite e a ingestão de proteína bruta, da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,022	0,001	7,53	0,004
Erro	8	0,001	0,001		
Total corrigido	24	0,023			
Tipo III					
Quadrado	2	0,001	0,001	3,06	0,103
Vaca (Quadrado)	6	0,015	0,002	13,41	0,001
Período (Quadrado)	6	0,003	0,001	3,02	0,076
Dieta	2	0,002	0,001	6,02	0,025

QUADRO 1.38.A – Análise de variância do peso vivo da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	60979,260	3811,204	23,02	0,001
Erro	8	1324,500	165,563		
Total corrigido	24	62303,760			
Tipo III					
Quadrado	2	20327,159	10163,580	61,39	0,001
Vaca (Quadrado)	6	23376,167	3896,028	23,53	0,001
Período (Quadrado)	6	16454,071	2742,345	16,56	0,001
Dieta	2	224,944	112,472	0,68	0,534

QUADRO 1.39.A – Análise de variância da ingestão de matéria seca da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	171,009	11,401	42,00	0,001
Erro	5	1,357	0,271		
Total corrigido	20	172,366			
Tipo III					
Quadrado	2	144,666	72,333	266,45	0,001
Vaca (Quadrado)	5	14,345	2,869	10,57	0,011
Período (Quadrado)	6	3,658	0,610	2,25	0,196
Dieta	2	0,672	0,336	1,24	0,366

QUADRO 1.40.A – Análise de variância da produção de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	394,299	26,287	51,81	0,001
Erro	5	2,538	0,507		
Total corrigido	20	396,836			
Tipo III					
Quadrado	2	342,374	171,187	337,41	0,001
Vaca (Quadrado)	5	40,921	8,184	16,13	0,004
Período (Quadrado)	6	9,364	1,561	3,08	0,119
Dieta	2	6,865	3,433	6,77	0,038

QUADRO 1.41.A – Análise de variância da produção de leite corrigida para 4% de gordura da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	624,840	41,656	27,24	0,001
Erro	5	7,646	1,529		
Total corrigido	20	632,486			
Tipo III					
Quadrado	2	511,912	255,956	167,39	0,001
Vaca (Quadrado)	5	72,627	14,525	9,50	0,014
Período (Quadrado)	6	20,925	3,488	2,28	0,192
Dieta	2	10,589	5,294	3,46	0,114

QUADRO 1.42.A – Análise de variância do teor em gordura do leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	5,163	0,344	4,26	0,059
Erro	5	0,404	0,081		
Total corrigido	20	5,567			
Tipo III					
Quadrado	2	1,628	0,814	10,08	0,018
Vaca (Quadrado)	5	1,289	0,258	3,19	0,114
Período (Quadrado)	6	1,740	0,290	3,59	0,091
Dieta	2	0,071	0,036	0,44	0,666

QUADRO 1.43.A – Análise de variância do teor em proteína do leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	1,973	0,132	9,18	0,011
Erro	5	0,072	0,014		
Total corrigido	20	2,044			
Tipo III					
Quadrado	2	0,948	0,474	33,10	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,543	0,109	7,57	0,022
Período (Quadrado)	6	0,394	0,066	4,59	0,058
Dieta	2	0,013	0,007	0,46	0,656

QUADRO 1.44.A – Análise de variância do teor em lactose do leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	1,455	0,097	17,40	0,003
Erro	5	0,028	0,006		
Total corrigido	20	1,483			
Tipo III					
Quadrado	2	0,440	0,220	39,42	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,164	0,033	5,87	0,037
Período (Quadrado)	6	0,721	0,120	21,54	0,002
Dieta	2	0,002	0,001	0,17	0,847

QUADRO 1.45.A – Análise de variância da produção diária de gordura do leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	1,398	0,093	14,42	0,004
Erro	5	0,032	0,006		
Total corrigido	20	1,431			
Tipo III					
Quadrado	2	1,037	0,518	80,19	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,191	0,038	5,90	0,037
Período (Quadrado)	6	0,106	0,018	2,74	0,144
Dieta	2	0,022	0,011	1,73	0,269

QUADRO 1.46.A – Análise de variância da produção diária de proteína do leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,270	0,018	12,47	0,006
Erro	5	0,007	0,001		
Total corrigido	20	0,277			
Tipo III					
Quadrado	2	0,161	0,080	55,63	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,056	0,011	7,70	0,021
Período (Quadrado)	6	0,035	0,006	4,06	0,073
Dieta	2	0,011	0,006	3,91	0,095

QUADRO 1.47.A – Análise de variância da produção diária de lactose do leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,792	0,053	33,53	0,001
Erro	5	0,008	0,002		
Total corrigido	20	0,800			
Tipo III					
Quadrado	2	0,632	0,316	200,67	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,081	0,016	10,24	0,012
Período (Quadrado)	6	0,076	0,013	7,99	0,019
Dieta	2	0,016	0,008	5,18	0,061

QUADRO 1.48.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite e a ingestão de matéria seca, da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,522	0,035	10,08	0,009
Erro	5	0,017	0,003		
Total corrigido	20	0,539			
Tipo III					
Quadrado	2	0,258	0,129	37,34	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,249	0,050	14,44	0,005
Período (Quadrado)	6	0,022	0,004	1,07	0,481
Dieta	2	0,008	0,004	1,14	0,390

QUADRO 1.49.A – Análise de variância da eficiência bruta da produção de leite, medida como a relação entre a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a ingestão de matéria seca, da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,530	0,035	21,55	0,002
Erro	5	0,008	0,002		
Total corrigido	20	0,538			
Tipo III					
Quadrado	2	0,254	0,127	77,58	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,213	0,043	25,94	0,001
Período (Quadrado)	6	0,078	0,013	7,91	0,019
Dieta	2	0,011	0,006	3,39	0,117

QUADRO 1.50.A – Análise de variância da eficiência de utilização da proteína da dieta na síntese de proteína do leite, medida como a relação entre a produção de proteína do leite e a ingestão de proteína bruta, da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	0,019	0,001	3,39	0,092
Erro	5	0,002	0,001		
Total corrigido	20	0,021			
Tipo III					
Quadrado	2	0,004	0,002	5,60	0,053
Vaca (Quadrado)	5	0,008	0,002	4,11	0,074
Período (Quadrado)	6	0,006	0,001	2,73	0,145
Dieta	2	0,001	0,001	1,38	0,333

QUADRO 1.51.A – Análise de variância do peso vivo da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	50813,716	3387,581	19,26	0,002
Erro	5	879,236	175,847		
Total corrigido	20	51692,952			
Tipo III					
Quadrado	2	27420,484	13710,242	77,97	0,001
Vaca (Quadrado)	5	16988,153	3397,631	19,32	0,003
Período (Quadrado)	6	6719,995	1119,999	6,37	0,030
Dieta	2	481,031	240,515	1,37	0,336

QUADRO 1.52.A – Análise de variância da concentração de alantoína nas amostras de urina da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	41786,071	2458,004	5,65	0,001
Erro	53	23044,488	434,802		
Total corrigido	70	64830,559			
Tipo III					
Quadrado	2	2676,947	1338,474	3,08	0,054
Vaca (Quadrado)	5	17149,081	3429,816	7,89	0,001
Período (Quadrado)	6	14010,903	2335,150	5,37	0,001
Dieta	2	3638,720	1819,360	4,18	0,021
Hora	2	1523,897	761,949	1,75	0,183

QUADRO 1.53.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol l^{-1}) nas amostras de urina da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	1792,372	105,434	4,99	0,001
Erro	53	1119,781	21,128		
Total corrigido	70	2912,153			
Tipo III					
Quadrado	2	112,494	56,247	2,66	0,079
Vaca (Quadrado)	5	771,333	154,267	7,30	0,001
Período (Quadrado)	6	502,420	83,737	3,96	0,002
Dieta	2	193,535	96,768	4,58	0,015
Hora	2	56,630	28,315	1,34	0,271

QUADRO 1.54.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,135	0,008	5,09	0,001
Erro	53	0,083	0,002		
Total corrigido	70	0,217			
Tipo III					
Quadrado	2	0,014	0,007	4,51	0,016
Vaca (Quadrado)	5	0,054	0,011	6,89	0,001
Período (Quadrado)	6	0,037	0,006	3,99	0,002
Dieta	2	0,015	0,007	4,70	0,013
Hora	2	0,004	0,002	1,27	0,290

QUADRO 1.55.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$) nas amostras de urina da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	11,200	0,659	1,74	0,064
Erro	53	20,087	0,379		
Total corrigido	70	31,287			
Tipo III					
Quadrado	2	0,568	0,284	0,75	0,477
Vaca (Quadrado)	5	3,158	0,632	1,67	0,159
Período (Quadrado)	6	6,223	1,037	2,74	0,022
Dieta	2	0,610	0,305	0,80	0,453
Hora	2	0,040	0,020	0,05	0,948

QUADRO 1.56.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	230804,437	13576,732	2,63	0,004
Erro	53	273774,883	5165,564		
Total corrigido	70	504579,321			
Tipo III					
Quadrado	2	68086,129	34043,064	6,59	0,003
Vaca (Quadrado)	5	44602,849	8920,570	1,73	0,145
Período (Quadrado)	6	105879,281	17646,547	3,42	0,006
Dieta	2	7699,823	3849,911	0,75	0,480
Hora	2	648,971	324,485	0,06	0,939

QUADRO 1.57.A – Análise de variância da estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	4385737,484	292382,499	49,88	0,001
Erro	8	46898,406	5862,301		
Total corrigido	23	4432635,889			
Tipo III					
Quadrado	2	443088,185	221544,092	37,79	0,001
Vaca (Quadrado)	5	174821,473	34964,295	5,96	0,014
Período (Quadrado)	6	60216,861	10036,144	1,71	0,236
Dieta	2	3278263,100	1639131,550	279,61	0,001

QUADRO 1.58.A – Análise de variância da concentração de alantoína nas amostras de urina da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	13211,715	733,984	5,06	0,001
Erro	56	8121,076	145,019		
Total corrigido	74	21332,791			
Tipo III					
Quadrado	2	970,333	485,166	3,35	0,042
Vaca (Quadrado)	6	3989,186	664,864	4,58	0,001
Período (Quadrado)	6	6618,105	1103,018	7,61	0,001
Dieta	2	1630,509	815,255	5,62	0,006
Hora	2	323,969	161,984	1,12	0,334

QUADRO 1.59.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol l^{-1}) nas amostras de urina da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	449,549	24,975	4,35	0,001
Erro	56	321,671	5,744		
Total corrigido	74	771,220			
Tipo III					
Quadrado	2	44,918	22,459	3,91	0,026
Vaca (Quadrado)	6	104,330	17,388	3,03	0,012
Período (Quadrado)	6	254,975	42,496	7,40	0,001
Dieta	2	10,501	5,250	0,91	0,407
Hora	2	79,686	39,843	6,94	0,002

QUADRO 1.60.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	0,035	0,002	4,89	0,001
Erro	56	0,022	0,001		
Total corrigido	74	0,058			
Tipo III					
Quadrado	2	0,005	0,002	6,24	0,004
Vaca (Quadrado)	6	0,007	0,001	2,76	0,020
Período (Quadrado)	6	0,024	0,004	9,86	0,001
Dieta	2	0,001	0,001	0,70	0,500
Hora	2	0,005	0,003	6,27	0,004

QUADRO 1.61.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$) nas amostras de urina da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	20,865	1,159	3,66	0,001
Erro	56	17,755	0,317		
Total corrigido	74	38,620			
Tipo III					
Quadrado	2	2,959	1,480	4,67	0,013
Vaca (Quadrado)	6	7,337	1,223	3,86	0,003
Período (Quadrado)	6	3,953	0,659	2,08	0,070
Dieta	2	5,357	2,679	8,45	0,001
Hora	2	2,534	1,267	4,00	0,024

QUADRO 1.62.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	473046,471	26280,360	5,33	0,001
Erro	56	275889,225	4926,593		
Total corrigido	74	748935,696			
Tipo III					
Quadrado	2	131483,488	65741,744	13,34	0,001
Vaca (Quadrado)	6	197432,182	32905,364	6,68	0,001
Período (Quadrado)	6	53245,433	8874,239	1,80	0,116
Dieta	2	85811,236	42905,618	8,71	0,001
Hora	2	39059,718	19529,859	3,96	0,025

QUADRO 1.63.A – Análise de variância da estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	2800111,633	175006,977	24,85	0,001
Erro	8	56346,624	7043,328		
Total corrigido	24	2856458,256			
Tipo III					
Quadrado	2	1348092,935	674046,467	95,70	0,001
Vaca (Quadrado)	6	885796,896	147632,816	20,96	0,001
Período (Quadrado)	6	97591,309	16265,218	2,31	0,136
Dieta	2	280978,910	140489,455	19,95	0,001

QUADRO 1.64.A – Análise de variância da concentração de alantoína nas amostras de urina da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	20615,381	1212,669	2,27	0,014
Erro	45	24013,984	533,644		
Total corrigido	62	44629,364			
Tipo III					
Quadrado	2	181,394	90,697	0,17	0,844
Vaca (Quadrado)	5	3669,996	733,999	1,38	0,252
Período (Quadrado)	6	14075,621	2345,937	4,40	0,001
Dieta	2	1899,888	949,944	1,78	0,180
Hora	2	1151,261	575,631	1,08	0,349

QUADRO 1.65.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol l^{-1}) nas amostras de urina da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	1583,371	93,139	3,11	0,001
Erro	45	1349,019	29,978		
Total corrigido	62	2932,389			
Tipo III					
Quadrado	2	97,322	48,661	1,62	0,209
Vaca (Quadrado)	5	180,112	36,022	1,20	0,324
Período (Quadrado)	6	625,687	104,281	3,48	0,007
Dieta	2	195,298	97,649	3,26	0,048
Hora	2	393,765	196,883	6,57	0,003

QUADRO 1.66.A – Análise de variância da concentração de creatinina (mmol $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,107	0,006	3,10	0,001
Erro	45	0,092	0,002		
Total corrigido	62	0,200			
Tipo III					
Quadrado	2	0,011	0,006	2,70	0,078
Vaca (Quadrado)	5	0,012	0,002	1,21	0,322
Período (Quadrado)	6	0,039	0,007	3,21	0,010
Dieta	2	0,014	0,007	3,31	0,045
Hora	2	0,026	0,013	6,26	0,004

QUADRO 1.67.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$) nas amostras de urina da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	13,212	0,777	1,06	0,415
Erro	45	32,877	0,731		
Total corrigido	62	46,088			
Tipo III					
Quadrado	2	0,463	0,232	0,32	0,730
Vaca (Quadrado)	5	2,081	0,416	0,57	0,723
Período (Quadrado)	6	4,590	0,765	1,05	0,408
Dieta	2	0,083	0,042	0,06	0,945
Hora	2	5,203	2,601	3,56	0,037

QUADRO 1.68.A – Análise de variância da relação alantoína/creatinina (mmol $mmol^{-1}$ $PV^{-0,75}$) nas amostras de urina da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	312214,890	18365,582	1,74	0,070
Erro	45	474863,996	10552,533		
Total corrigido	62	787078,885			
Tipo III					
Quadrado	2	50385,475	25192,737	2,39	0,103
Vaca (Quadrado)	5	70512,757	14102,551	1,34	0,266
Período (Quadrado)	6	102441,157	17073,526	1,62	0,164
Dieta	2	1619,463	809,732	0,08	0,926
Hora	2	79879,040	39939,520	3,78	0,030

QUADRO 1.69.A – Análise de variância da estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	1350981,105	90065,407	42,00	0,001
Erro	5	10723,004	2144,601		
Total corrigido	20	1361704,109			
Tipo III					
Quadrado	2	1142866,986	571433,493	266,45	0,001
Vaca (Quadrado)	5	113328,494	22665,699	10,57	0,011
Período (Quadrado)	6	28899,785	4816,631	2,25	0,196
Dieta	2	5306,267	2653,133	1,24	0,366

QUADRO 1.70.A – Análise de variância da concentração plasmática de glucose da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	359,290	23,953	2,21	0,130
Erro	8	86,700	10,838		
Total corrigido	23	445,990			
Tipo III					
Quadrado	2	95,712	47,856	4,42	0,051
Vaca (Quadrado)	5	60,611	12,122	1,12	0,422
Período (Quadrado)	6	163,821	27,303	2,52	0,113
Dieta	2	44,272	22,136	2,04	0,192

QUADRO 1.71.A – Análise de variância da concentração plasmática de ureia da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	964,793	64,320	7,61	0,003
Erro	8	67,583	8,448		
Total corrigido	23	1032,376			
Tipo III					
Quadrado	2	5,707	2,853	0,34	0,723
Vaca (Quadrado)	5	71,698	14,340	1,70	0,241
Período (Quadrado)	6	157,203	26,200	3,10	0,071
Dieta	2	654,771	327,385	38,75	0,001

QUADRO 1.72.A – Análise de variância da concentração plasmática de albumina da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	1,736	0,116	2,89	0,067
Erro	8	0,320	0,040		
Total corrigido	23	2,055			
Tipo III					
Quadrado	2	0,804	0,402	10,05	0,007
Vaca (Quadrado)	5	0,760	0,152	3,80	0,046
Período (Quadrado)	6	0,156	0,026	0,65	0,690
Dieta	2	0,024	0,012	0,30	0,746

Quadro 1.73.A – Análise de variância da concentração plasmática de proteínas totais da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	15	4,067	0,271	2,58	0,090
Erro	8	0,842	0,105		
Total corrigido	23	4,909			
Tipo III					
Quadrado	2	1,200	0,600	5,70	0,029
Vaca (Quadrado)	5	1,019	0,204	1,94	0,194
Período (Quadrado)	6	1,336	0,223	2,12	0,161
Dieta	2	0,443	0,222	2,11	0,184

QUADRO 1.74.A – Análise de variância da concentração plasmática de glucose da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	514,061	32,129	1,97	0,166
Erro	8	130,299	16,287		
Total corrigido	24	644,360			
Tipo III					
Quadrado	2	116,638	58,319	3,58	0,078
Vaca (Quadrado)	6	147,146	24,524	1,51	0,289
Período (Quadrado)	6	141,217	23,536	1,45	0,307
Dieta	2	23,688	11,844	0,73	0,513

QUADRO 1.75.A – Análise de variância da concentração plasmática de ureia da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	845,913	52,870	4,38	0,020
Erro	8	96,547	12,068		
Total corrigido	24	942,460			
Tipo III					
Quadrado	2	19,879	9,940	0,82	0,473
Vaca (Quadrado)	6	225,429	37,572	3,11	0,070
Período (Quadrado)	6	463,108	77,185	6,40	0,010
Dieta	2	7,835	3,918	0,32	0,732

QUADRO 1.76.A – Análise de variância da concentração plasmática de albumina da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	3,198	0,200	2,40	0,106
Erro	8	0,667	0,083		
Total corrigido	24	3,865			
Tipo III					
Quadrado	2	0,668	0,334	4,01	0,062
Vaca (Quadrado)	6	0,841	0,140	1,68	0,243
Período (Quadrado)	6	1,502	0,250	3,00	0,077
Dieta	2	0,349	0,174	2,09	0,186

QUADRO 1.77.A – Análise de variância da concentração plasmática de proteínas totais da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	9,945	0,622	3,37	0,043
Erro	8	1,474	0,184		
Total corrigido	24	11,418			
Tipo III					
Quadrado	2	2,779	1,390	7,54	0,014
Vaca (Quadrado)	6	3,275	0,546	2,96	0,079
Período (Quadrado)	6	2,514	0,419	2,27	0,140
Dieta	2	0,330	0,165	0,90	0,446

QUADRO 1.78.A – Análise de variância da concentração plasmática de glucose da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	1689,228	93,846	3,08	0,006
Erro	23	699,683	30,421		
Total corrigido	41	2388,911			
Tipo III					
Quadrado	2	265,857	132,928	4,37	0,025
Vaca (Quadrado)	5	388,385	77,677	2,55	0,056
Período (Quadrado)	6	203,493	33,916	1,11	0,384
Dieta	2	0,816	0,408	0,01	0,987
Hora	1	660,054	660,054	21,70	0,001
Dieta x Hora	2	82,750	41,375	1,36	0,277

QUADRO 1.79.A – Análise de variância da concentração plasmática de ureia da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	1242,540	69,030	10,16	0,001
Erro	23	156,228	6,793		
Total corrigido	41	1398,768			
Tipo III					
Quadrado	2	16,879	8,440	1,24	0,307
Vaca (Quadrado)	5	207,828	41,566	6,12	0,001
Período (Quadrado)	6	206,409	34,401	5,06	0,002
Dieta	2	3,050	1,525	0,22	0,801
Hora	1	628,720	628,720	92,56	0,001
Dieta x Hora	2	146,512	73,256	10,78	0,001

QUADRO 1.80.A – Análise de variância da concentração plasmática de albumina da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	1,197	0,066	9,73	0,001
Erro	23	0,157	0,007		
Total corrigido	41	1,354			
Tipo III					
Quadrado	2	0,176	0,088	12,91	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,555	0,111	16,25	0,001
Período (Quadrado)	6	0,270	0,045	6,58	0,001
Dieta	2	0,002	0,001	0,17	0,842
Hora	1	0,026	0,026	3,84	0,062
Dieta x Hora	2	0,004	0,002	0,31	0,734

QUADRO 1.81.A – Análise de variância da concentração plasmática de proteínas totais da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	18	7,430	0,413	9,16	0,001
Erro	23	1,037	0,045		
Total corrigido	41	8,466			
Tipo III					
Quadrado	2	1,850	0,925	20,53	0,001
Vaca (Quadrado)	5	1,972	0,394	8,75	0,001
Período (Quadrado)	6	3,112	0,519	11,51	0,001
Dieta	2	0,299	0,150	3,32	0,054
Hora	1	0,115	0,115	2,56	0,124
Dieta x Hora	2	0,049	0,025	0,54	0,588

Anexo II

QUADRO 2.1.A – Análise de variância do teor em $C_{4:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,803	0,050	0,66	0,807
Erro	31	2,347	0,076		
Total corrigido	47	3,149			
Tipo III					
Quadrado	2	0,002	0,001	0,02	0,985
Vaca (Quadrado)	5	0,216	0,043	0,57	0,722
Período (Quadrado)	6	0,406	0,068	0,89	0,512
Dieta	2	0,125	0,063	0,83	0,447
Ordenha	1	0,093	0,093	1,23	0,277

QUADRO 2.2.A – Análise de variância do teor em $C_{6:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,926	0,058	1,56	0,140
Erro	31	1,148	0,037		
Total corrigido	47	2,074			
Tipo III					
Quadrado	2	0,024	0,012	0,33	0,723
Vaca (Quadrado)	5	0,351	0,070	1,89	0,124
Período (Quadrado)	6	0,370	0,062	1,67	0,163
Dieta	2	0,183	0,091	2,47	0,101
Ordenha	1	0,046	0,046	1,23	0,276

QUADRO 2.3.A – Análise de variância do teor em $C_{8:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,992	0,062	3,77	0,001
Erro	31	0,510	0,016		
Total corrigido	47	1,502			
Tipo III					
Quadrado	2	0,057	0,028	1,73	0,194
Vaca (Quadrado)	5	0,364	0,073	4,42	0,004
Período (Quadrado)	6	0,339	0,056	3,43	0,010
Dieta	2	0,219	0,109	6,66	0,004
Ordenha	1	0,051	0,051	3,08	0,089

QUADRO 2.4.A – Análise de variância do teor em $C_{10:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	22,016	1,376	2,90	0,005
Erro	31	14,708	0,474		
Total corrigido	47	36,724			
Tipo III					
Quadrado	2	4,498	2,249	4,74	0,016
Vaca (Quadrado)	5	7,010	1,402	2,95	0,027
Período (Quadrado)	6	8,492	1,415	2,98	0,020
Dieta	2	3,092	1,546	3,26	0,052
Ordenha	1	0,086	0,086	0,18	0,674

QUADRO 2.5.A – Análise de variância do teor em $C_{11:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,167	0,010	5,35	0,001
Erro	31	0,061	0,002		
Total corrigido	47	0,228			
Tipo III					
Quadrado	2	0,026	0,013	6,58	0,004
Vaca (Quadrado)	5	0,067	0,013	6,88	0,001
Período (Quadrado)	6	0,055	0,009	4,66	0,002
Dieta	2	0,019	0,009	4,79	0,015
Ordenha	1	0,003	0,003	1,71	0,201

QUADRO 2.6.A – Análise de variância do teor em $C_{12:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	16,478	1,030	4,84	0,001
Erro	31	6,595	0,213		
Total corrigido	47	23,074			
Tipo III					
Quadrado	2	3,434	1,717	8,07	0,002
Vaca (Quadrado)	5	8,153	1,631	7,66	0,001
Período (Quadrado)	6	2,764	0,461	2,17	0,074
Dieta	2	2,482	1,241	5,83	0,007
Ordenha	1	0,002	0,002	0,01	0,928

QUADRO 2.7.A – Análise de variância do teor em $C_{14:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	45,508	2,844	5,29	0,001
Erro	31	16,652	0,537		
Total corrigido	47	62,160			
Tipo III					
Quadrado	2	5,556	2,778	5,17	0,012
Vaca (Quadrado)	5	15,046	3,009	5,60	0,001
Período (Quadrado)	6	8,840	1,473	2,74	0,030
Dieta	2	19,186	9,593	17,86	0,001
Ordenha	1	0,711	0,711	1,32	0,259

QUADRO 2.8.A – Análise de variância do teor em $C_{14:1}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	4,278	0,267	7,73	0,001
Erro	31	1,073	0,035		
Total corrigido	47	5,350			
Tipo III					
Quadrado	2	0,368	0,184	5,31	0,010
Vaca (Quadrado)	5	3,251	0,650	18,79	0,001
Período (Quadrado)	6	0,562	0,094	2,71	0,031
Dieta	2	0,002	0,001	0,03	0,973
Ordenha	1	0,083	0,083	2,38	0,133

QUADRO 2.9.A – Análise de variância do teor em $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,930	0,058	1,98	0,050
Erro	31	0,908	0,029		
Total corrigido	47	1,838			
Tipo III					
Quadrado	2	0,130	0,065	2,22	0,126
Vaca (Quadrado)	5	0,152	0,030	1,04	0,413
Período (Quadrado)	6	0,518	0,086	2,95	0,022
Dieta	2	0,055	0,027	0,94	0,402
Ordenha	1	0,029	0,029	0,99	0,327

QUADRO 2.10.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,565	0,035	1,47	0,175
Erro	31	0,745	0,024		
Total corrigido	47	1,310			
Tipo III					
Quadrado	2	0,109	0,055	2,27	0,120
Vaca (Quadrado)	5	0,095	0,019	0,79	0,567
Período (Quadrado)	6	0,154	0,026	1,07	0,404
Dieta	2	0,176	0,088	3,66	0,037
Ordenha	1	0,026	0,026	1,09	0,305

QUADRO 2.11.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,754	0,047	1,22	0,305
Erro	31	1,193	0,038		
Total corrigido	47	1,947			
Tipo III					
Quadrado	2	0,097	0,049	1,26	0,297
Vaca (Quadrado)	5	0,230	0,046	1,20	0,334
Período (Quadrado)	6	0,365	0,061	1,58	0,189
Dieta	2	0,011	0,006	0,15	0,827
Ordenha	1	0,014	0,014	0,36	0,556

QUADRO 2.12.A – Análise de variância do teor em $C_{16:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	253,514	15,845	13,26	0,001
Erro	31	37,032	1,195		
Total corrigido	47	290,546			
Tipo III					
Quadrado	2	68,511	34,255	28,68	0,001
Vaca (Quadrado)	5	113,278	22,656	18,97	0,001
Período (Quadrado)	6	11,083	1,847	1,55	0,196
Dieta	2	40,752	20,376	17,06	0,001
Ordenha	1	17,678	17,678	14,80	0,001

QUADRO 2.13.A – Análise de variância do teor em $C_{16:1}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	6,168	0,385	12,82	0,001
Erro	31	0,932	0,030		
Total corrigido	47	7,100			
Tipo III					
Quadrado	2	1,160	0,580	19,28	0,001
Vaca (Quadrado)	5	4,522	0,904	30,07	0,001
Período (Quadrado)	6	0,340	0,057	1,89	0,115
Dieta	2	0,087	0,043	1,44	0,252
Ordenha	1	0,058	0,058	1,93	0,175

QUADRO 2.14.A – Análise de variância do teor em $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,357	0,022	4,31	0,001
Erro	31	0,161	0,005		
Total corrigido	47	0,518			
Tipo III					
Quadrado	2	0,052	0,026	5,05	0,013
Vaca (Quadrado)	5	0,076	0,015	2,95	0,027
Período (Quadrado)	6	0,062	0,010	2,01	0,095
Dieta	2	0,160	0,080	15,48	0,001
Ordenha	1	0,001	0,001	0,19	0,662

QUADRO 2.15.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,055	0,003	2,91	0,005
Erro	31	0,036	0,001		
Total corrigido	47	0,091			
Tipo III					
Quadrado	2	0,003	0,001	1,22	0,310
Vaca (Quadrado)	5	0,020	0,004	3,43	0,014
Período (Quadrado)	6	0,026	0,004	3,69	0,007
Dieta	2	0,001	0,001	0,13	0,875
Ordenha	1	0,005	0,005	4,61	0,040

Quadro 2.16.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,160	0,010	2,74	0,008
Erro	31	0,113	0,004		
Total corrigido	47	0,273			
Tipo III					
Quadrado	2	0,019	0,010	2,61	0,089
Vaca (Quadrado)	5	0,099	0,020	5,41	0,001
Período (Quadrado)	6	0,030	0,005	1,38	0,252
Dieta	2	0,004	0,002	0,55	0,582
Ordenha	1	0,008	0,008	2,20	0,148

QUADRO 2.17.A – Análise de variância do teor em $C_{17:1}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	8,582	0,536	1,11	0,389
Erro	31	15,004	0,484		
Total corrigido	47	23,586			
Tipo III					
Quadrado	2	1,165	0,583	1,20	0,314
Vaca (Quadrado)	5	1,786	0,357	0,74	0,601
Período (Quadrado)	6	3,996	0,666	1,38	0,255
Dieta	2	0,705	0,352	0,73	0,491
Ordenha	1	0,723	0,723	1,49	0,231

Quadro 2.18.A – Análise de variância do teor em $C_{18:0}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	147,324	9,208	3,71	0,001
Erro	31	76,949	2,482		
Total corrigido	47	224,273			
Tipo III					
Quadrado	2	8,751	4,375	1,76	0,188
Vaca (Quadrado)	5	100,099	20,020	8,07	0,001
Período (Quadrado)	6	30,472	5,079	2,05	0,089
Dieta	2	6,233	3,117	1,26	0,299
Ordenha	1	6,171	6,171	2,49	0,125

QUADRO 2.19.A – Análise de variância do teor em $C_{18:1}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	494,172	30,886	8,73	0,001
Erro	31	109,627	3,536		
Total corrigido	47	603,799			
Tipo III					
Quadrado	2	120,243	60,121	17,00	0,001
Vaca (Quadrado)	5	254,046	50,809	14,37	0,001
Período (Quadrado)	6	8,124	1,354	0,38	0,884
Dieta	2	107,193	53,596	15,16	0,001
Ordenha	1	3,548	3,548	1,00	0,324

QUADRO 2.20.A – Análise de variância do teor em $C_{18:2}$ das amostras de leite da Experiência 1.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	28,523	1,783	11,20	0,001
Erro	31	4,932	0,159		
Total corrigido	47	33,455			
Tipo III					
Quadrado	2	0,278	0,139	0,87	0,428
Vaca (Quadrado)	5	1,270	0,254	1,60	0,190
Período (Quadrado)	6	3,671	0,612	3,85	0,006
Dieta	2	21,147	10,573	66,46	0,001
Ordenha	1	0,008	0,008	0,05	0,827

QUADRO 2.21.A – Análise de variância do teor em $C_{4:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	2,597	0,153	1,96	0,049
Erro	32	2,489	0,078		
Total corrigido	49	5,087			
Tipo III					
Quadrado	2	0,193	0,097	1,24	0,303
Vaca (Quadrado)	6	0,627	0,105	1,34	0,267
Período (Quadrado)	6	1,363	0,227	2,92	0,022
Dieta	2	0,091	0,045	0,58	0,564
Ordenha	1	0,152	0,152	1,96	0,171

QUADRO 2.22.A – Análise de variância do teor em $C_{6:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	1,455	0,086	2,06	0,039
Erro	32	1,332	0,042		
Total corrigido	49	2,787			
Tipo III					
Quadrado	2	0,039	0,019	0,47	0,631
Vaca (Quadrado)	6	0,583	0,097	2,33	0,056
Período (Quadrado)	6	0,553	0,092	2,21	0,067
Dieta	2	0,111	0,056	1,33	0,278
Ordenha	1	0,076	0,076	1,83	0,186

QUADRO 2.23.A – Análise de variância do teor em $C_{8:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,585	0,034	2,12	0,033
Erro	32	0,521	0,016		
Total corrigido	49	1,106			
Tipo III					
Quadrado	2	0,001	0,001	0,03	0,973
Vaca (Quadrado)	6	0,303	0,050	3,10	0,017
Período (Quadrado)	6	0,184	0,031	1,89	0,114
Dieta	2	0,059	0,029	1,80	0,181
Ordenha	1	0,025	0,025	1,51	0,228

QUADRO 2.24.A – Análise de variância do teor em $C_{10:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	4,438	0,261	2,63	0,009
Erro	32	3,174	0,099		
Total corrigido	49	7,612			
Tipo III					
Quadrado	2	0,304	0,152	1,53	0,231
Vaca (Quadrado)	6	2,293	0,382	3,85	0,005
Período (Quadrado)	6	1,127	0,188	1,89	0,113
Dieta	2	0,417	0,208	2,10	0,139
Ordenha	1	0,013	0,013	0,14	0,715

QUADRO 2.25.A – Análise de variância do teor em $C_{11:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,099	0,006	3,25	0,002
Erro	32	0,057	0,002		
Total corrigido	49	0,156			
Tipo III					
Quadrado	2	0,014	0,007	4,03	0,028
Vaca (Quadrado)	6	0,036	0,006	3,32	0,012
Período (Quadrado)	6	0,042	0,007	3,91	0,005
Dieta	2	0,007	0,003	1,94	0,160
Ordenha	1	0,002	0,002	1,29	0,264

QUADRO 2.26.A – Análise de variância do teor em $C_{12:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	6,390	0,376	3,55	0,001
Erro	32	3,387	0,106		
Total corrigido	49	9,777			
Tipo III					
Quadrado	2	0,804	0,402	3,80	0,033
Vaca (Quadrado)	6	2,917	0,486	4,59	0,002
Período (Quadrado)	6	1,398	0,233	2,20	0,069
Dieta	2	0,673	0,336	3,18	0,055
Ordenha	1	0,012	0,012	0,11	0,737

QUADRO 2.27.A – Análise de variância do teor em $C_{14:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	17,634	1,037	4,65	0,001
Erro	32	7,139	0,223		
Total corrigido	49	24,773			
Tipo III					
Quadrado	2	0,391	0,195	0,88	0,426
Vaca (Quadrado)	6	9,940	1,657	7,43	0,001
Período (Quadrado)	6	3,020	0,503	2,26	0,063
Dieta	2	0,926	0,463	2,08	0,142
Ordenha	1	2,394	2,394	10,73	0,003

QUADRO 2.28.A – Análise de variância do teor em $C_{14:1}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	5,066	0,298	66,15	0,001
Erro	32	0,144	0,005		
Total corrigido	49	5,210			
Tipo III					
Quadrado	2	1,273	0,637	141,36	0,001
Vaca (Quadrado)	6	2,836	0,473	104,95	0,001
Período (Quadrado)	6	0,378	0,063	13,98	0,001
Dieta	2	0,051	0,026	5,67	0,008
Ordenha	1	0,006	0,006	1,39	0,247

QUADRO 2.29.A – Análise de variância do teor em $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	6,042	0,355	19,44	0,001
Erro	32	0,585	0,018		
Total corrigido	49	6,627			
Tipo III					
Quadrado	2	0,268	0,134	7,33	0,002
Vaca (Quadrado)	6	5,106	0,851	46,55	0,001
Período (Quadrado)	6	0,529	0,088	4,82	0,001
Dieta	2	0,021	0,010	0,57	0,572
Ordenha	1	0,044	0,044	2,43	0,129

QUADRO 2.30.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,088	0,005	1,94	0,052
Erro	32	0,085	0,003		
Total corrigido	49	0,173			
Tipo III					
Quadrado	2	0,001	0,001	0,06	0,941
Vaca (Quadrado)	6	0,046	0,008	2,89	0,023
Período (Quadrado)	6	0,027	0,004	1,67	0,160
Dieta	2	0,011	0,006	2,15	0,133
Ordenha	1	0,001	0,001	0,08	0,786

QUADRO 2.31.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,037	0,002	1,83	0,068
Erro	32	0,038	0,001		
Total corrigido	49	0,075			
Tipo III					
Quadrado	2	0,008	0,004	3,21	0,054
Vaca (Quadrado)	6	0,005	0,001	0,75	0,614
Período (Quadrado)	6	0,013	0,002	1,89	0,113
Dieta	2	0,003	0,002	1,48	0,243
Ordenha	1	0,001	0,001	0,04	0,838

QUADRO 2.32.A – Análise de variância do teor em $C_{16:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	210,233	12,367	15,18	0,001
Erro	32	26,064	0,815		
Total corrigido	49	236,297			
Tipo III					
Quadrado	2	13,833	6,916	8,49	0,001
Vaca (Quadrado)	6	121,958	20,326	24,96	0,001
Período (Quadrado)	6	20,477	3,413	4,19	0,003
Dieta	2	7,107	3,554	4,36	0,021
Ordenha	1	39,605	39,605	48,62	0,001

QUADRO 2.33.A – Análise de variância do teor em $C_{16:1}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	11,969	0,704	52,05	0,001
Erro	32	0,433	0,014		
Total corrigido	49	12,402			
Tipo III					
Quadrado	2	2,475	1,238	91,50	0,001
Vaca (Quadrado)	6	7,554	1,259	93,07	0,001
Período (Quadrado)	6	1,019	0,170	12,56	0,001
Dieta	2	0,009	0,005	0,33	0,719
Ordenha	1	0,173	0,173	12,78	0,001

QUADRO 2.34.A – Análise de variância do teor em $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,327	0,019	7,85	0,001
Erro	32	0,079	0,002		
Total corrigido	49	0,406			
Tipo III					
Quadrado	2	0,041	0,021	8,40	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,245	0,041	16,65	0,001
Período (Quadrado)	6	0,053	0,009	3,58	0,008
Dieta	2	0,002	0,001	0,37	0,691
Ordenha	1	0,001	0,001	0,36	0,553

QUADRO 2.35.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,064	0,004	5,71	0,001
Erro	32	0,021	0,001		
Total corrigido	49	0,085			
Tipo III					
Quadrado	2	0,023	0,012	17,48	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,016	0,003	3,99	0,004
Período (Quadrado)	6	0,017	0,003	4,38	0,002
Dieta	2	0,003	0,001	1,90	0,166
Ordenha	1	0,001	0,001	2,05	0,162

QUADRO 2.36.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,152	0,009	7,57	0,001
Erro	32	0,038	0,001		
Total corrigido	49	0,189			
Tipo III					
Quadrado	2	0,037	0,018	15,58	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,061	0,010	8,57	0,001
Período (Quadrado)	6	0,028	0,005	4,01	0,004
Dieta	2	0,010	0,005	4,30	0,022
Ordenha	1	0,003	0,003	2,20	0,148

QUADRO 2.37.A – Análise de variância do teor em $C_{17:1}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	0,156	0,009	10,69	0,001
Erro	32	0,027	0,001		
Total corrigido	49	0,183			
Tipo III					
Quadrado	2	0,040	0,020	23,58	0,001
Vaca (Quadrado)	6	0,096	0,016	18,64	0,001
Período (Quadrado)	6	0,009	0,002	1,81	0,129
Dieta	2	0,001	0,001	0,36	0,704
Ordenha	1	0,011	0,011	12,78	0,001

QUADRO 2.38.A – Análise de variância do teor em $C_{18:0}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	194,120	11,419	29,88	0,001
Erro	32	12,227	0,382		
Total corrigido	49	206,347			
Tipo III					
Quadrado	2	67,275	33,637	88,03	0,001
Vaca (Quadrado)	6	101,204	16,867	44,14	0,001
Período (Quadrado)	6	12,268	2,045	5,35	0,001
Dieta	2	2,086	1,043	2,73	0,081
Ordenha	1	0,689	0,689	1,80	0,189

QUADRO 2.39.A – Análise de variância do teor em $C_{18:1}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	252,685	14,864	7,45	0,001
Erro	32	63,869	1,996		
Total corrigido	49	316,554			
Tipo III					
Quadrado	2	68,994	34,497	17,28	0,001
Vaca (Quadrado)	6	60,117	10,019	5,02	0,001
Período (Quadrado)	6	67,020	11,170	5,60	0,001
Dieta	2	5,892	2,946	1,48	0,244
Ordenha	1	39,837	39,837	19,96	0,001

QUADRO 2.40.A – Análise de variância do teor em $C_{18:2}$ das amostras de leite da Experiência 2.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	17	5,294	0,311	4,55	0,001
Erro	32	2,191	0,068		
Total corrigido	49	7,484			
Tipo III					
Quadrado	2	1,494	0,747	10,91	0,001
Vaca (Quadrado)	6	1,658	0,276	4,04	0,004
Período (Quadrado)	6	1,160	0,193	2,82	0,026
Dieta	2	0,463	0,231	3,38	0,047
Ordenha	1	0,102	0,102	1,49	0,231

QUADRO 2.41.A – Análise de variância do teor em $C_{4:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	1,031	0,064	2,08	0,049
Erro	25	0,775	0,031		
Total corrigido	41	1,805			
Tipo III					
Quadrado	2	0,226	0,113	3,65	0,041
Vaca (Quadrado)	5	0,288	0,058	1,86	0,138
Período (Quadrado)	6	0,315	0,052	1,69	0,164
Dieta	2	0,295	0,148	4,76	0,018
Ordenha	1	0,001	0,001	0,00	0,952

QUADRO 2.42.A – Análise de variância do teor em $C_{6:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,629	0,039	2,48	0,020
Erro	25	0,396	0,016		
Total corrigido	41	1,025			
Tipo III					
Quadrado	2	0,173	0,087	5,47	0,011
Vaca (Quadrado)	5	0,228	0,046	2,87	0,035
Período (Quadrado)	6	0,167	0,028	1,75	0,150
Dieta	2	0,113	0,056	3,55	0,044
Ordenha	1	0,003	0,003	0,16	0,689

QUADRO 2.43.A – Análise de variância do teor em $C_{8:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,515	0,032	3,92	0,001
Erro	25	0,205	0,008		
Total corrigido	41	0,720			
Tipo III					
Quadrado	2	0,121	0,061	7,39	0,003
Vaca (Quadrado)	5	0,260	0,052	6,34	0,001
Período (Quadrado)	6	0,098	0,016	2,00	0,103
Dieta	2	0,051	0,026	3,13	0,061
Ordenha	1	0,008	0,008	1,01	0,324

QUADRO 2.44.A – Análise de variância do teor em $C_{10:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	5,806	0,363	6,20	0,001
Erro	25	1,464	0,059		
Total corrigido	41	7,270			
Tipo III					
Quadrado	2	0,833	0,416	7,11	0,004
Vaca (Quadrado)	5	3,681	0,736	12,57	0,001
Período (Quadrado)	6	1,065	0,177	3,03	0,023
Dieta	2	0,153	0,076	1,31	0,289
Ordenha	1	0,080	0,080	1,36	0,254

QUADRO 2.45.A – Análise de variância do teor em $C_{11:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,159	0,010	7,08	0,001
Erro	25	0,035	0,001		
Total corrigido	41	0,194			
Tipo III					
Quadrado	2	0,047	0,023	16,57	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,077	0,015	10,91	0,001
Período (Quadrado)	6	0,019	0,003	2,25	0,072
Dieta	2	0,001	0,001	0,31	0,737
Ordenha	1	0,002	0,002	1,15	0,295

QUADRO 2.46.A – Análise de variância do teor em $C_{12:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	13,183	0,824	9,15	0,001
Erro	25	2,252	0,090		
Total corrigido	41	15,436			
Tipo III					
Quadrado	2	1,018	0,509	5,65	0,010
Vaca (Quadrado)	5	8,570	1,714	19,03	0,001
Período (Quadrado)	6	2,367	0,395	4,38	0,004
Dieta	2	0,054	0,027	0,30	0,744
Ordenha	1	0,229	0,229	2,54	0,124

QUADRO 2.47.A – Análise de variância do teor em $C_{14:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	50,855	3,178	7,07	0,001
Erro	25	11,239	0,450		
Total corrigido	41	62,095			
Tipo III					
Quadrado	2	1,719	0,860	1,91	0,169
Vaca (Quadrado)	5	24,318	4,864	10,82	0,001
Período (Quadrado)	6	11,756	1,959	4,36	0,004
Dieta	2	0,219	0,109	0,24	0,786
Ordenha	1	4,149	4,149	9,23	0,006

QUADRO 2.48.A – Análise de variância do teor em $C_{14:1}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	1,555	0,097	7,85	0,001
Erro	25	0,310	0,012		
Total corrigido	41	1,865			
Tipo III					
Quadrado	2	0,202	0,101	8,16	0,002
Vaca (Quadrado)	5	0,702	0,140	11,34	0,001
Período (Quadrado)	6	0,443	0,074	5,97	0,001
Dieta	2	0,014	0,007	0,55	0,584
Ordenha	1	0,001	0,001	0,01	0,923

QUADRO 2.49.A – Análise de variância do teor em $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	3,586	0,224	8,06	0,001
Erro	25	0,695	0,028		
Total corrigido	41	4,282			
Tipo III					
Quadrado	2	0,099	0,050	1,79	0,188
Vaca (Quadrado)	5	1,826	0,365	13,13	0,001
Período (Quadrado)	6	0,485	0,081	2,91	0,027
Dieta	2	0,306	0,153	5,50	0,011
Ordenha	1	0,028	0,028	1,02	0,323

QUADRO 2.50.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,187	0,012	10,44	0,001
Erro	25	0,028	0,001		
Total corrigido	41	0,215			
Tipo III					
Quadrado	2	0,077	0,038	34,22	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,030	0,006	5,39	0,002
Período (Quadrado)	6	0,027	0,004	3,99	0,006
Dieta	2	0,011	0,006	4,99	0,015
Ordenha	1	0,001	0,001	0,77	0,389

QUADRO 2.51.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{15:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,038	0,002	8,02	0,001
Erro	25	0,007	0,001		
Total corrigido	41	0,046			
Tipo III					
Quadrado	2	0,018	0,009	30,50	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,008	0,002	5,11	0,002
Período (Quadrado)	6	0,002	0,001	1,21	0,332
Dieta	2	0,001	0,001	1,93	0,166
Ordenha	1	0,001	0,001	2,05	0,165

QUADRO 2.52.A – Análise de variância do teor em $C_{16:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	467,660	29,229	16,68	0,001
Erro	25	43,813	1,753		
Total corrigido	41	511,473			
Tipo III					
Quadrado	2	124,871	62,436	35,63	0,001
Vaca (Quadrado)	5	89,913	17,983	10,26	0,001
Período (Quadrado)	6	123,732	20,622	11,77	0,001
Dieta	2	2,394	1,197	0,68	0,514
Ordenha	1	44,455	44,455	25,37	0,001

QUADRO 2.53.A – Análise de variância do teor em $C_{16:1}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	12,396	0,775	16,19	0,001
Erro	25	1,196	0,048		
Total corrigido	41	13,592			
Tipo III					
Quadrado	2	1,896	0,948	19,81	0,001
Vaca (Quadrado)	5	7,415	1,483	30,99	0,001
Período (Quadrado)	6	2,182	0,364	7,60	0,001
Dieta	2	0,274	0,137	2,86	0,076
Ordenha	1	0,151	0,151	3,16	0,088

QUADRO 2.54.A – Análise de variância do teor em $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,198	0,012	3,92	0,001
Erro	25	0,079	0,003		
Total corrigido	41	0,277			
Tipo III					
Quadrado	2	0,007	0,003	1,08	0,353
Vaca (Quadrado)	5	0,072	0,014	4,59	0,004
Período (Quadrado)	6	0,046	0,008	2,42	0,056
Dieta	2	0,048	0,024	7,61	0,003
Ordenha	1	0,001	0,001	0,15	0,704

QUADRO 2.55.A – Análise de variância do teor em *anteiso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,088	0,005	11,03	0,001
Erro	25	0,012	0,001		
Total corrigido	41	0,100			
Tipo III					
Quadrado	2	0,032	0,016	31,95	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,031	0,006	12,59	0,001
Período (Quadrado)	6	0,023	0,004	7,59	0,001
Dieta	2	0,004	0,002	3,86	0,035
Ordenha	1	0,003	0,003	6,57	0,017

QUADRO 2.56.A – Análise de variância do teor em *iso* $C_{17:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,430	0,027	8,20	0,001
Erro	25	0,082	0,003		
Total corrigido	41	0,512			
Tipo III					
Quadrado	2	0,095	0,047	14,43	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,136	0,027	8,32	0,001
Período (Quadrado)	6	0,232	0,039	11,78	0,001
Dieta	2	0,014	0,007	2,10	0,143
Ordenha	1	0,001	0,001	0,35	0,558

QUADRO 2.57.A – Análise de variância do teor em $C_{17:1}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,101	0,006	7,22	0,001
Erro	25	0,022	0,001		
Total corrigido	41	0,123			
Tipo III					
Quadrado	2	0,021	0,011	12,05	0,001
Vaca (Quadrado)	5	0,027	0,005	6,20	0,001
Período (Quadrado)	6	0,027	0,004	5,05	0,002
Dieta	2	0,007	0,003	3,85	0,035
Ordenha	1	0,014	0,014	15,66	0,001

QUADRO 2.58.A – Análise de variância do teor em $C_{18:0}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	189,595	11,850	32,77	0,001
Erro	25	9,041	0,362		
Total corrigido	41	198,636			
Tipo III					
Quadrado	2	28,015	14,008	38,73	0,001
Vaca (Quadrado)	5	80,661	16,132	44,61	0,001
Período (Quadrado)	6	10,280	1,713	4,74	0,002
Dieta	2	2,353	1,176	3,25	0,056
Ordenha	1	3,160	3,160	8,74	0,007

QUADRO 2.59.A – Análise de variância do teor em $C_{18:1}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	608,321	38,020	10,76	0,001
Erro	25	88,364	3,535		
Total corrigido	41	696,685			
Tipo III					
Quadrado	2	208,934	104,467	29,56	0,001
Vaca (Quadrado)	5	169,359	33,872	9,58	0,001
Período (Quadrado)	6	118,582	19,764	5,59	0,001
Dieta	2	9,418	4,709	1,33	0,282
Ordenha	1	33,589	33,589	9,50	0,005

QUADRO 2.60.A – Análise de variância do teor em $C_{18:2}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	13,587	0,849	14,64	0,001
Erro	25	1,450	0,058		
Total corrigido	41	15,037			
Tipo III					
Quadrado	2	3,873	1,937	33,40	0,001
Vaca (Quadrado)	5	3,353	0,671	11,57	0,001
Período (Quadrado)	6	5,111	0,852	14,69	0,001
Dieta	2	0,742	0,371	6,39	0,006
Ordenha	1	0,402	0,402	6,94	0,014

QUADRO 2.61.A – Análise de variância do teor em $C_{18:3}$ das amostras de leite da Experiência 3.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	P
Modelo	16	0,032	0,002	2,78	0,011
Erro	25	0,018	0,001		
Total corrigido	41	0,050			
Tipo III					
Quadrado	2	0,006	0,003	3,99	0,031
Vaca (Quadrado)	5	0,018	0,004	5,00	0,003
Período (Quadrado)	6	0,013	0,002	3,02	0,023
Dieta	2	0,002	0,001	1,10	0,348
Ordenha	1	0,001	0,001	0,33	0,571