

MALBER NATHAN NOBRE PALMA

**ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA PARA BOVINOS
ALIMENTADOS COM FORRAGEM TROPICAL RECEBENDO
SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA INFREQUENTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P171e
2018

Palma, Malber Nathan Nobre, 1990-

Estratégias de suplementação energética para bovinos alimentados com forragem tropical recebendo suplementação proteica infrequente / Malber Nathan Nobre Palma. – Viçosa, MG, 2018.

x, 53 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Edenio Detmann.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 30-36.

1. Bovinos - Alimentação e rações. 2. Alimento aditivos. 3. Suplementos dietéticos. 4. Digestibilidade. 5. Forragem. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2084

MALBER NATHAN NOBRE PALMA

**ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA PARA BOVINOS
ALIMENTADOS COM FORRAGEM TROPICAL RECEBENDO
SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA INFREQUENTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de setembro de 2018.

Erick Darlisson Batista

Eduardo Henrique B. K. de Moraes

Luciana Navajas Rennó

Cláudia Batista Sampaio
(Coorientador)

Edenio Detmann
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade.

A meus familiares, pelo apoio e incentivo.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pelo apoio e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Professor Edenio Detmann, pela excelente orientação, pelos valiosos ensinamentos, incentivo e disposição durante esses anos de trabalho e convivência. Agradeço-o pela constante confiança e pelas várias oportunidades que me foram oferecidas. Agradeço a quem admiro pelo extremo profissionalismo, competência e pelo exemplo de humildade. A ele, por ter acreditado na minha pessoa, a minha eterna admiração e gratidão.

Aos membros da banca por aceitarem participar desta banca e ajudarem a tornar este trabalho melhor.

À professora Luciana, pela execução da cirurgia dos animais e também pela ajuda durante as coletas.

Aos funcionários do Laboratório de Animais, Jojó e Zezé, pela importante ajuda e apoio na realização dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Monteiro, Mário, Mateus, Aline, Fernando, Plínio e ao Mário do Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal, pela colaboração nas análises laboratoriais.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, pelos ensinamentos transmitidos, pela competência, dedicação, apoio e pela prontidão.

Aos amigos do laboratório, Willian, João Paulo, Tadeu, Larissa, João Lovatti, Amanda, Gisele, Cristiane, Aline Naime, Aline Garcia e Ana Carolina pela imprescindível ajuda durante as coletas, amizade e bom convívio na “salinha”.

Aos amigos da república Sapó Cego, Giovanni, Jean, Henrique, Marco Antônio, Marco Aurélio, João Lucas e Anderson, pelo companheirismo.

Aos amigos André, Ana, Israel, Pedro, Edjon, Gustavo, Airton, Thiago, Felipe, Fernando, Heider e Priscila, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

A todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, meu mais sincero: Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Malber Nathan Nobre Palma, filho de Antonio de Sales Palma e Zilma Maria Nobre Batista Palma, nasceu no dia 25 de dezembro de 1990, em Bonfinópolis de Minas, Minas Gerais. Em julho de 2008 ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros, concluindo o curso de graduação em Zootecnia em julho de 2013. Iniciou o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, em agosto de 2013, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de fevereiro de 2015. Em março de 2015, iniciou o curso de doutorado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, submeteu-se à defesa de tese em 19 de setembro de 2018.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

PALMA, Malber Nathan Nobre, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2018. **Estratégias de suplementação energética para bovinos alimentados com forragem tropical recebendo suplementação proteica infrequente.** Orientador: Edenio Detmann. Coorientadores: Cláudia Batista Sampaio e Mário Fonseca Paulino.

Objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes estratégias de suplementação energética em bovinos alimentados com forragem tropical e suplementados infrequentemente com compostos nitrogenados sobre o consumo voluntário, a digestão, a dinâmica ruminal dos compostos fibrosos, as características de excreção urinária, o balanço de nitrogênio (N) e o perfil hormonal e de metabólitos no sangue de novilhas Nelore alimentadas com forragem tropical. Cinco novilhas (332 ± 20 kg) fistuladas no rúmen e no abomaso foram utilizadas em um delineamento em quadrado latino 5×5 . Foram avaliados os seguintes tratamentos: controle, sem suplemento (somente forragem); suplementação infrequente com 660 g de proteína bruta (PB) a cada três dias PB; suplementação infrequente com 660 g de PB a cada três dias e suplementação diária com 440 g de amido; suplementação infrequente e concomitante com 660 g de PB e 1320 g de amido a cada três dias e suplementação infrequente com 660 g de PB e 1320 g de amido a cada três dias, sendo a suplementação com amido realizada no dia posterior à suplementação com PB. Todas as avaliações foram realizadas considerando-se o ciclo de suplementação de três dias. Não foram verificadas diferenças entre tratamentos ($P \geq 0,22$) sobre as características de consumo voluntário. O consumo voluntário de forragem foi avaliado ao longo do ciclo de suplementação considerando-se medidas repetidas no tempo. Verificou-se efeito de interação com os dias do ciclo ($P < 0,04$), a suplementação exclusivamente proteica deprime o consumo de forragem nos dois primeiros dias do ciclo ($P < 0,05$), havendo compensação no terceiro dia do ciclo de suplementação. Com o oferecimento de amido de forma frequente e suplementação proteica infrequente, a depressão no consumo ($P < 0,05$) ocorre somente no primeiro dia do ciclo, havendo compensação no consumo no segundo dia do ciclo de suplementação. Quando o amido foi oferecido de forma infrequente concomitantemente com a proteína, variações no consumo de forragem ao longo do ciclo não foram verificadas ($P > 0,05$). Com a oferta infrequente de amido no dia posterior à suplementação proteica verificou-se depressão no consumo de forragem ($P < 0,05$) no primeiro dia do ciclo, com a posterior compensação nos demais dias do ciclo de suplementação. Verificou-se efeito de interação ($P < 0,01$) entre tratamentos e dias de suplementação sobre a concentração de N

amoniaco ruminal. Em média, a suplementação ampliou as concentrações ($P < 0,01$). O desdobramento da interação indicou que o oferecimento de suplementos, independentemente do esquema de suplementação, levou a maiores concentrações no primeiro dia do ciclo de suplementação, com decréscimos gradativos para o segundo e terceiro dias do ciclo. A concentração de N ureico no soro (NUS) foi superior ($P < 0,01$) nos animais suplementados, havendo, interação ($P < 0,01$) com os dias do ciclo de suplementação. O estudo deste efeito mostrou não haver variação entre dias ($P > 0,05$) para o tratamento controle. A suplementação exclusivamente proteica implicou em pico na concentração de NUS ($P < 0,05$) no dia imediatamente após a suplementação. Com adição de amido, independentemente do esquema de suplementação, não se verificou pico no segundo dia do ciclo de suplementação, havendo concentrações similares ($P > 0,05$) no primeiro e segundo dia e queda no NUS ($P < 0,05$) no terceiro dia do ciclo de suplementação. A excreção urinária de N (EUN) apresentou efeito de interação ($P < 0,01$) entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação. A EUN foi superior ($P < 0,01$) nos animais suplementados. O estudo da interação indicou excreção estável ($P > 0,05$) entre dias para o controle. A suplementação exclusiva com proteína ou simultânea com proteína e amido apresentou EUN similar ($P > 0,05$) nos dois primeiros dias do ciclo, com decréscimo ($P < 0,05$) no terceiro dia do ciclo de suplementação. A suplementação frequente com amido e a suplementação com amido posterior à suplementação proteica causaram decréscimo gradativo ($P < 0,05$) da EUN ao longo dos dias do ciclo de suplementação. A concentração sanguínea de IGF1 foi elevada ($P < 0,05$) pela suplementação, independentemente do esquema adotado. A atividade de alanina amino transferase (ALT) foi ampliada pela suplementação ($P < 0,01$). A concentração sanguínea de glicose apresentou efeito de interação ($P < 0,01$) entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação. Não foi verificada variação entre dias ($P > 0,05$) para o controle e para o oferecimento frequente de amido. A suplementação exclusivamente proteica e a suplementação com amido concomitantemente à proteína propiciaram picos ($P < 0,05$) na concentração de glicose no primeiro dia do ciclo de suplementação, com concentrações estáveis nos demais dias ($P > 0,05$). O fornecimento de amido no dia posterior à suplementação proteica proporcionou concentrações mais elevadas de glicose nos dois primeiros dias do ciclo, com queda no terceiro dia. A concentração sanguínea de insulina foi afetada ($P < 0,01$) pela interação entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação. As concentrações foram superiores nos animais suplementados ($P < 0,05$). Não foi verificada variação entre dias ($P > 0,05$) para o controle

e para a suplementação exclusivamente proteica. A suplementação com amido de forma frequente ampliou as concentrações de insulina ($P<0,05$) no segundo e terceiro dias do ciclo de suplementação. A suplementação infrequente com amido concomitantemente com a proteína promoveu pico ($P<0,05$) na concentração de insulina no primeiro dia do ciclo, com queda gradativa no restante do ciclo de suplementação. O fornecimento infrequente de amido no dia posterior à suplementação proteica implicou em pico ($P<0,05$) de concentração de insulina no segundo dia do ciclo de suplementação. A suplementação proteica infrequente causa impactos negativos sobre o metabolismo hepático e deprime o consumo voluntário de forragem, notadamente no dia de oferecimento dos suplementos. Contudo, esses efeitos negativos sobre o consumo são eliminados com a suplementação energética infrequente concomitantemente à suplementação proteica.

ABSTRACT

PALMA, Malber Nathan Nobre, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2018. **Energy supplementation strategies for cattle fed tropical forage receiving infrequent protein supplementation.** Advisor: Edenio Detmann. Co-Advisors: Cláudia Batista Sampaio and Mário Fonseca Paulino.

The aim of this study was to evaluate the effects of different energy supplementation strategies in cattle fed tropical fodder supplemented infrequently with nitrogen compounds on the voluntary consumption, digestion, ruminal dynamics of the fibrous compounds, urinary excretion characteristics, nitrogen balance (N) and the hormonal and metabolic profile in the blood of Nelore heifers fed with tropical forage. Five heifers (332 ± 20 kg, Body Weight, BW) were rumen and abomasum fistulated and design on latin square 5×5 . Treatements were control: without supplements (only forage); infrequent supplementation with 660 g CP (crude protein) every three days; infrequent supplementation with 600 g CP every three days and daily supplementation with 440 g of starch; infrequent supplementation with 660 g CP and 1320 g of starch every three days; and infrequent supplementation with 660 g CP and 1320 g of starch every three days with starch supplementation the day after CP supplementation. Voluntary intake was similar ($P \geq 0.22$) among treatments, and was evaluated over supplementation cycle as repeated measures on time. Interaction between supplementation cycle days were observed ($P < 0.04$). Exclusive protein supplementation decrease forage voluntary intake on two first supplementation days ($P < 0.05$), with an increase on third day. Daily starch supplementation and infrequent protein supplementation decrease forage voluntary intake ($P < 0.05$) only on first day, and increase on second day. For treatment with infrequent starch supplementation and protein, forage voluntary intake was similar ($P > 0.05$) for all supplementation cycle. Treatment with infrequent starch supplementation after protein supplementation had a decrease ($P < 0.05$) on forage voluntary intake on the first day, and increase on remaining cycle. Interaction between treatments and supplementation days were observed with increase ($P < 0.01$) RAN concentrations when supplements were offered. Study of this interaction showed that all treatments with some supplement, independent of supplementation frequency, increase RAN concentrations on first cycle day, and gradual decrease on the following days. SUN concentrations were greater ($P < 0.01$) for animals that receive supplementation, with interaction ($P < 0.01$) between this concentration and supplementation cycle days, except for control treatment ($P > 0.05$). However, protein

supplementation showed greater value ($P < 0.05$) on SUN concentration on day after supplementation. When starch was added, independent of supplementation frequency, there was no greater value on SUN concentration, with similar ($P > 0.05$) concentrations and decrease ($P < 0.05$) on third cycle day. Urinary nitrogen excretion (UNE) showed interaction ($P < 0.01$) between treatments and supplementation cycle day, with greater ($P < 0.01$) values for supplemented animals. For control UNE was stable ($P > 0.05$) among cycle days. Protein supplementation or protein and starch supplementation showed similar ($P > 0.05$) UNE at two first cycle days, and decrease ($P < 0.05$) on third day. Frequent starch supplementation and starch supplementation after protein were gradual lower ($P < 0.05$) on supplement cycle days. IGF1 blood concentrations increase ($P < 0.05$) with supplementation. ALT activity was affected by treatments ($P < 0.01$), with greater values ($P < 0.05$) for infrequent protein and starch supplementation and frequent protein and starch supplementation, with starch on day after protein. ALT intermediary values were observed for protein supplementation and for starch supplemented a day after protein. Glucose blood concentrations shows interaction ($P < 0.01$) between treatments and supplementation cycle days, except ($P > 0.05$) for control and frequent starch supplementation. Protein and protein with starch supplementation showed greater values ($P < 0.05$) on first day and stable ($P > 0.05$) concentrations on following days. Starch supplementation on day after protein had greater glucose concentrations on two first supplementation cycle days, and decrease on third day. Insulin blood concentration was affected ($P < 0.01$) by interaction between treatments and supplementation cycle days. Greater concentrations were observed ($P < 0.05$) on supplemented animals. For control and protein supplementation, insulin concentrations were similar ($P > 0.05$). Frequent starch supplementation increase ($P < 0.05$) insulin concentrations on second and third supplementation days. Infrequent protein and starch supplementation had greater value ($P < 0.05$) of insulin concentration on first day, and decrease on following days. Infrequent starch supplementation a day after protein had greater value ($P < 0.05$) of insulin concentration on second day. Therefore, infrequent protein supplementation has as consequence negative effects over hepatic metabolism and decrease forage voluntary intake on supplementation day. Thus, these negative effects over intake were cut out with infrequent protein and energetic supplementation.

INTRODUÇÃO

Em ambientes tropicais, as gramíneas sob pastejo apresentam variações quantitativas (i.e., crescimento e disponibilidade de forragem) e, principalmente, qualitativas (i.e., composição do alimento disponível) ao longo do ano em função de oscilações climáticas. Durante a época da seca observa-se declínio na qualidade nutricional da pastagem, com redução na concentração de proteína bruta (PB) e aumento na lignificação da parede celular, o que pode implicar limitações para o crescimento microbiano ruminal, principalmente sobre os carboidratos fibrosos (Detmann et al., 2010). Por outro lado, na época das águas as gramíneas tropicais sob pastejo exibem intenso crescimento e a forragem produzida possui valor nutritivo superior àqueles observados durante a época seca. Contudo, mesmo apresentando maior qualidade, a dieta ofertada aos animais apresentará desequilíbrios nutricionais, comumente evidenciada por excesso relativo de energia em relação à proteína disponível (Detmann et al., 2014a). Dessa forma, ao longo de todo o ano, as forragens disponíveis aos animais raramente constituirão dietas equilibradas para o adequado atendimento das exigências microbianas e/ou do animal, o que demanda o fornecimento de suplementos, notadamente de natureza proteica, a fim de viabilizar o ajuste nutricional e otimizar a produção animal a partir dos recursos nutricionais dos pastos tropicais (Detmann et al., 2010).

Nesse contexto, os compostos nitrogenados/proteicos devem constituir a base para os programas de suplementação, mesmo quando as forragens sob pastejo são consideradas de média ou alta qualidade. Efeitos positivos da PB suplementar sobre a produção animal em pastejo são atribuídos tanto ao suprimento de compostos nitrogenados para o crescimento microbiano (o que é qualificado como deficiências

dietéticas de compostos nitrogenados) quanto para a adequação da utilização metabólica dos nutrientes absorvidos (o que é qualificado como deficiências metabólicas de compostos nitrogenados) (Detmann et al., 2017). Contudo, a despeito da prioridade de utilização de compostos nitrogenados nos suplementos, em trabalhos conduzidos sob condições tropicais evidenciou-se que a associação entre compostos proteicos e energéticos (e.g., amido) nos suplementos pode implicar efeitos positivos sobre o metabolismo de compostos nitrogenados. Esse efeito se manifestaria tanto por intermédio da ampliação na assimilação de nitrogênio microbiano no rúmen (Souza et al., 2010; Lazzarini et al., 2013), como pela otimização de utilização da proteína metabolizável (PM), o que implica melhorias na retenção de compostos nitrogenados no organismo animal gerando, conseqüentemente, ganhos em produção (Detmann et al., 2014b; c; Figueiras et al., 2016). Adicionalmente, o fornecimento de compostos energéticos associados a compostos nitrogenados nos suplementos são capazes de promover melhores perfis de concentração de hormônios e metabólitos sanguíneos relacionados ao anabolismo animal (Franco et al., 2017; Reis, 2018).

Além de fatores como a associação entre compostos nitrogenados e energéticos no suplemento, variações na frequência de fornecimento podem viabilizar programas de suplementação para animais manejados em pastagens tropicais. Em ruminantes, a viabilidade de suplementação proteica infrequente se dá pela ação dos mecanismos de reciclagem do nitrogênio (N) suplementar, o que resultaria na manutenção da disponibilidade de N amoniacal ruminal (NAR) e N ureico no soro (NUS) em dias que os animais não são suplementados (Rufino, 2015; Reis, 2018). No entanto, os efeitos da associação de compostos suplementares energéticos sobre a dinâmica de aproveitamento do nitrogênio suplementar ofertado infrequentemente carecem ainda de avaliação e entendimento em condições tropicais.

Em trabalhos recentes conduzidos em condições tropicais demonstrou-se que existe retardo na excreção de compostos nitrogenados na urina com animais suplementados de forma infrequente com proteína. Embora os picos de concentração de NAR sejam observados concomitantemente à suplementação, a máxima concentração de NUS somente é observada aproximadamente 24 horas após a suplementação (Rufino, 2015; Reis, 2018). Isso indica que mecanismos de retardo na excreção de compostos nitrogenados podem agir na conservação de N no metabolismo animal, preservando parte dos compostos nitrogenados suplementares ofertados de forma infrequente para utilização em dias nos quais a suplementação não é realizada. Nesse sentido, considerando os efeitos previamente definidos dos compostos energéticos suplementares, ergue-se a questão da possibilidade de melhorias no aproveitamento da proteína suplementar ofertada infrequentemente a partir de estratégias de suplementação simultaneamente energética e proteica. Contudo, tais elucidações ainda carecem de avaliação em condições tropicais. Portanto, estudar os efeitos da inclusão estratégica de energia em programas de suplementação proteica infrequente pode trazer novas evidências que impliquem melhorias nas matrizes dietéticas, na retenção de N no organismo animal e na redução da excreção de nutrientes no meio ambiente, tornado os sistemas de produção animal em pastejo mais produtivos e viáveis economicamente.

Nesse sentido, definiu-se como hipótese no presente estudo que a introdução de compostos energéticos de forma estratégica em sistemas de suplementação proteica infrequente pode ampliar a retenção de compostos nitrogenados no organismo em bovinos alimentados com gramíneas tropicais.

Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes estratégias de suplementação energética em bovinos alimentados com forragem tropical e suplementados infrequentemente com compostos nitrogenados sobre o consumo

voluntário, a digestão, a dinâmica ruminal dos compostos fibrosos, as características de excreção urinária, o balanço de N e o perfil hormonal e de metabólitos no sangue de novilhas Nelore alimentadas com forragem tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Animais e no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV; protocolo 32/2018).

Foram utilizadas cinco novilhas Nelore, com peso corporal (PC) médio inicial de 332 ± 20 kg, fistuladas no rúmen e no abomaso. Os animais foram mantidos em baias individuais (2×5 m) cobertas, com piso de concreto, dispostas com comedouro e acesso irrestrito a água e mistura mineral comercial (80 g/kg de fósforo). A alimentação volumosa basal foi constituída por feno de tifton (*Cynodom* sp.) com teor médio de PB de 77,7 g/kg de matéria seca (MS; Tabela 1), o qual foi fornecido diariamente *ad libitum*, às 6h00 e 18h00, permitindo-se sobras de aproximadamente 100 g/kg de forragem fornecida.

Foram avaliados os seguintes tratamentos: controle, sem suplementação (somente forragem); suplementação infrequente com 660 g de PB a cada três dias (PI); suplementação infrequente com 660 g de PB a cada três dias e suplementação diária (frequente) com 440 g de amido (PIEF); suplementação infrequente e concomitante com 660 g de PB e 1320 g de amido a cada três dias (PIEI); e suplementação infrequente com 660 g de PB e 1320 g de amido a cada três dias, sendo a suplementação com amido realizada no dia posterior à suplementação com PB (PIEI+1). O suplemento nitrogenado foi composto de farelo de soja, ureia e sulfato de amônio (relação de 74:23,4:2,6,

respectivamente), formulado para conter, aproximadamente, 1000 g PB/kg de matéria natural (Tabela 1).

A suplementação equivalente diária de PB foi baseada nas exigências estabelecidas pelo sistema BR-CORTE (Valadares filho et al., 2016), considerando-se uma novilha Nelore, com 350 kg de PC e ganho esperado de 500 g/dia. A proporção entre a massa de PB e amido suplementar (1:2) foi estabelecida com base nas observações descritas por Franco et al. (2017), que encontraram maior retenção corporal de N ao utilizarem essa relação em suplementos ofertados para bovinos alimentados com dieta à base de forragem tropical.

O experimento foi constituído de cinco períodos experimentais com 27 dias de duração cada. Devido à suplementação infrequente ocorrer a cada três dias, todas as mensurações foram realizadas em ciclos múltiplos de três dias (cada ciclo é doravante denominado como ciclo de suplementação). Os primeiros quinze dias de cada período experimental foram destinados à adaptação dos animais aos suplementos e às frequências de fornecimento (Machado et al., 2016). A suplementação respectiva de cada tratamento foi iniciada no primeiro dia de cada período experimental. O suplemento total foi fracionado em duas porções de mesmo peso, acondicionado em sacos de papel e fornecido diretamente no rúmen dos animais simultaneamente ao fornecimento da forragem (6h00 e 18h00).

O consumo e os coeficientes de digestibilidade total e ruminal foram avaliados por dois ciclos de suplementação do 16º ao 22º dia de cada período. Neste sentido, foi computado o consumo médio do 16º ao 21º dias e as sobras e excreção fecal obtidas do 17º ao 22º dias. Amostras do feno fornecido e das sobras deste período foram compostas proporcionalmente por animal e período experimental. As amostras foram processadas em moinho de facas com peneira de porosidade 2 mm. Posteriormente, metade das

amostras foram novamente processadas em moinho de facas com peneira de porosidade 1 mm.

A excreção fecal foi avaliada por intermédio de coleta total de fezes, realizadas do 17º ao 22º dias de cada período experimental, iniciando-se às 6h00 de cada dia. Ao final de cada período de 24 horas, as fezes foram pesadas e homogeneizadas manualmente e uma alíquota (50 g/kg) foi tomada e seca em estufa com circulação forçada de ar (55°C). As amostras fecais foram então moídas como previamente descrito, sendo produzidas amostras compostas proporcionais, com base no peso seco ao ar, por animal e período experimental.

O fluxo abomasal foi estimado por meio sistema de indicador duplo [fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e Co-EDTA como indicadores de fluxo de partículas e de líquidos, respectivamente]. Anteriormente ao início das coletas, os animais foram adaptados por seis dias ao Co-EDTA. Foram diluídos 5 g/dia desse indicador em 5 L de água e infundidos continuamente no rúmen do 10º ao 22º dias em cada período usando uma bomba peristáltica (BP 600/4, Milan[®] Equipamentos Científicos, Inc., Colombo, Paraná, Brasil).

Seis amostras de digesta abomasal (1200 mL por amostra) foram coletadas do 16º ao 22º dia de cada período experimental. Cada coleta ocorreu em intervalos de 28 horas de forma a se obter conjunto de amostras representativas a cada período de quatro horas em um ciclo de 24 horas. O cronograma de amostragem diária foi: 16º às 06h00, 17º às 10h00, 18º às 14h00; 19º às 18h00, 20º às 22h00 e 22º às 02h00. Em cada coleta as amostras de digesta abomasal foram divididas em duas partes. A primeira parte (600 mL) foi utilizada para se estimar o fluxo abomasal de digesta, sendo as amostras filtradas em tecido náilon (malha com porosidade de 100 µm) para separação das fases líquida e sólida, as quais foram avaliadas separadamente. A segunda parte (600 mL) foi

imediatamente conduzida ao laboratório para o isolamento de bactérias de fase sólida e líquida conforme descrição de Reynal et al. (2005). As amostras de digesta abomasal e de bactérias foram congeladas (-80°C) e sequencialmente liofilizadas. As amostras de digesta foram então processadas em moinho de facas, como previamente descrito.

Do 22º ao 24º dias de cada período experimental (um ciclo de suplementação) foram realizadas coletas totais de urina, utilizando-se sondas de Foley de duas vias (nº 26, Rush Amber, Kamuting, Malásia), a qual foi acoplada a mangueira de polietileno que direcionava a urina a reservatórios de polietileno mantidos em caixas de isopor com gelo. As coletas foram iniciadas às 6h00 do 22º dia de cada período. Ao final de cada período de 24 horas, o total de urina foi mensurado. Alíquota de 50 mL foi obtida e imediatamente analisada quanto aos teores de N total (método INCT-CA N-001/1; Detmann et al., 2012), amônia (método INCT-CA N-006/1; Detmann et al., 2012) e creatinina (método enzimático-colorimétrico, Bioclin® K067). A concentração de creatinina na urina foi obtida por intermédio de analisador bioquímico automático (BS200E, Mindray, China).

Nos 22º, 23º e 24º dias de cada período experimental (um ciclo de suplementação) foram coletadas amostras de sangue dos animais às 6h00, 12h00, 18h00 e 24h00, diretamente da veia jugular utilizando tubos com vácuo e gel acelerador de coagulação (BD Vacutainer®, SST II Advance). A final do período de coleta foram produzidas amostras compostas por animal e dia do ciclo de suplementação (volumes iguais para cada horário de coleta). As concentrações séricas de glicose (método enzimático glicose oxidase-peroxidase, Bioclin® K082), ureia (método enzimático-colorimétrico, Bioclin® K056), creatinina (método enzimático-colorimétrico, Bioclin® K067), proteína total (método biureto, Bioclin® K031), albumina (método verde de bromocresol, Bioclin® K040), aspartato aminotransferase (AST; método cinético UV-

IFCC – sem piridoxal fosfato, Bioclin® K048), alanina aminotransferase (ALT; método cinético UV–IFCC – sem piridoxal fosfato, Bioclin® K049) e gamaglutamiltransferase (GGT; método SZASZ IFCC, Bioclin® K080) foram quantificadas utilizando-se analisador bioquímico automático (BS200E, Mindray, China). A insulina foi analisada por quimiluminescência com reagente de insulina ultrasensível no sistema de imunoenensaio (Ref. Number 33410, Access® 2, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A concentração sérica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) foi analisada por quimioluminescência em laboratório comercial (Laboratório Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG). A concentração sanguínea de globulinas foi estimada pela diferença entre as concentrações de proteína totais e albumina.

Simultaneamente às coletas de sangue foram coletadas amostras de conteúdo ruminal para avaliação do pH, da concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) e de ácidos graxos voláteis (AGV; acetato, propionato e butirato). As amostras foram coletadas manualmente na interface líquido:sólido do ambiente ruminal, filtradas por uma camada tripla de gaze e submetidas à avaliação do pH por intermédio de potenciômetro digital. Em seguida, foi separada uma alíquota de 20 mL foi fixada com 5 mL de ácido meta-fosfórico (250 g/L) e congelada (-20°C) para avaliação posterior da concentração de AGV. Uma segunda alíquota de 40 mL, fixada com 1 mL de H₂SO₄ (1:1) e congelada (-20°C) para posterior análise da concentração de NAR.

A concentração de NAR foi quantificada pelo método colorimétrico INCT-CA N-006/1 (Detmann et al., 2012). A avaliação da concentração de AGV foi obtida por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC; cromatógrafo Shimadzu, modelo SPD-10A VP), utilizando-se coluna de fase reversa (fase móvel de ácido orto-fosfórico em água, 0,15M) e detector ultra-violeta em comprimento de onda de 210 nm. As concentrações de NAR e AGV e os valores de pH ruminal obtidos nos diferentes

tempos de amostragem foram combinadas por animal e período dentro de cada dia de coleta, produzindo-se, ao final, valor único, representativo da média diária.

No 25º e 27º dias foram realizados os esvaziamentos ruminais para quantificação das taxas de degradação e passagem e da massa residente de fibra no rúmen. No 25º dia, o conteúdo ruminal foi retirado às 12h00 (seis horas após a alimentação matinal) e no 27º dia, às 6h00 (antes da alimentação matinal). O material coletado foi acondicionado em recipiente de polietileno e pesado. Após homogeneização, alíquota de aproximadamente 50 g/kg do material foi retirada, sendo o material restante retornado ao rúmen dos animais. Ressalta-se que o esvaziamento ruminal não foi realizado durante os três dias do ciclo de suplementação, como preconizado para os demais procedimentos, devido ao grande estresse provocado nos animais. As amostras foram secas e moídas como previamente descrito, sendo produzidas amostras compostas proporcionais por animal e período experimental com base no peso ao ar.

As amostras de feno, sobras, fezes e digesta abomasal processadas em peneira de porosidade 1 mm foram avaliadas quanto aos teores de MS (método INCT-CA G-003/1), matéria orgânica (MO; método INCT-CA M-001/1), PB (método INCT-CA N-001/1) e fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN_{cp}; métodos INCT-CA F-002/1, INCT-CA M-002/1 e INCT-CA N-004/1), conforme métodos normatizados pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (Detmann et al., 2012).

As amostras de feno, sobras, fezes, digesta abomasal (fase sólida) e do esvaziamento ruminal processadas em peneira com porosidade de 2 mm foram avaliadas quanto ao teor de FDN indigestível (FDN_i) por intermédio de procedimento de incubação *in situ* por 288 horas utilizando-se sacos F57 (Ankom®), conforme

descrições de Valente et al. (2011). A FDN potencialmente digestível (FDN_{pd}) foi obtida pela diferença entre a FDN_{cp} e a FDN_i.

As amostras de digesta abomasal (fases líquida e sólida) foram avaliadas quanto à sua concentração de cobalto por intermédio de espectrofotometria de absorção atômica (espectrofotômetro GBC Avanta Σ , Scientific Equipment, Braeside, Victoria, Australia), após digestão nitro-perclórica das amostras, conforme descrições de Palma et al. (2015).

O fluxo abomasal de matéria seca foi estimado utilizando a FDN_i como indicador da fase sólida e o Co-EDTA como indicador de fase líquida. Para este procedimento, pressupôs-se que a FDN_i constituiu indicador ideal, estando, portanto concentrada apenas na fase sólida, ao passo que o Co-EDTA foi considerado indicador não ideal, concentrando-se na fase líquida, mas podendo ser parcialmente deslocado para a fase sólida. Os fatores de reconstituição da digesta foram obtidos segundo France & Siddons (1986). As taxas de ingestão e passagem ruminal da FDN, FDN_{pd} e FDN_i foram estimadas pelas razões entre massa consumida e fluxo abomasal sobre a massa residente no rúmen, respectivamente. A taxa de degradação da FDN_{pd} foi obtida pela diferença entre as taxas de ingestão e passagem (Allen & Linton, 2007).

As amostras de digesta abomasal (ambas as fases) e das bactérias associadas às fases líquida e sólida da digesta abomasal foram avaliadas quanto aos teores de nitrogênio (Método INCT- CA N-001/1; Detmann et al., 2012) e bases púricas (Ushida et al., 1985). As bases púricas foram utilizadas como indicador para avaliação da concentração microbiana na digesta abomasal, tomando-se como base a relação $N_{RNA}:N_{total}$ nas bactérias isoladas em cada fase. A produção ruminal de compostos nitrogenados microbianos foi quantificada por intermédio do produto entre concentração microbiana e fluxo diário de digesta abomasal.

As estimativas do balanço aparente de compostos nitrogenados foram obtidas pela subtração das excreções fecais e urinárias do consumo de nitrogênio. Para este cálculo considerou-se a média de excreção urinária de nitrogênio nos três dias de avaliação.

A carga de nitrogênio ureico filtrada pelos rins foi estimada adaptando-se as proposições de Reece (2006) por intermédio da equação:

$$\text{CNUF} = \frac{\text{EUC}}{\text{CSC}} \times \text{NUS} \quad (1);$$

em que: CNUF = carga de nitrogênio ureico filtrada pelos rins (g/dia); EUC = excreção urinária de creatinina (g/dia); CSC = concentração sanguínea de creatinina (g/dL); e NUS = concentração de nitrogênio ureico no soro (g/dL).

Os experimento foi implementado e analisado segundo delineamento em quadrado latino 5×5 , com cinco tratamentos, cinco animais e cinco períodos experimentais. Os efeitos de tratamentos foram assumidos como fixos, ao passo que os efeitos de animal e período experimental foram assumidos como aleatórios. Quando necessário, as médias de tratamento foram comparadas usando a diferença mínima significativa de Fisher.

As variáveis mensuradas e avaliadas em função de diferentes dias do ciclo de suplementação foram avaliadas em esquema de medidas repetidas no tempo (Kaps & Lamberson, 2004). Para este caso, foi realizado previamente a escolha da melhor estrutura de matriz de (co)variâncias por intermédio do critério de informação de Akaike com correção. O cômputo dos graus de liberdade foi realizado segundo o critério de Kenward-Roger.

Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do procedimento MIXED do SAS (*Statiscal Analysis System*; versão 9.4) adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

RESULTADOS

Com exceção do consumo de PB, não foram verificadas diferenças entre tratamentos ($P \geq 0,22$) sobre as características de consumo voluntário (Tabela 2). Por sua vez o consumo de PB foi ampliado ($P < 0,05$) pelo fornecimento de suplementação proteica, não havendo, contudo, diferença entre os tratamentos com suplementação. A relação entre PB e matéria orgânica digerida (MOD) foi afetada pelos diferentes tratamentos ($P < 0,01$), sendo superior com a suplementação exclusivamente proteica, mediana com a suplementação simultaneamente proteica e energética e inferior no tratamento controle ($P < 0,05$).

O consumo voluntário de forragem foi também avaliado ao longo do ciclo de suplementação considerando-se medidas repetidas no tempo. Nesse caso, verificou-se efeito de interação com os dias do ciclo ($P < 0,04$), embora sem que haja diferenças médias no consumo de forragem entre tratamentos. O estudo deste efeito indicou que a suplementação exclusivamente proteica deprime o consumo de forragem nos dois primeiros dias do ciclo ($P < 0,05$), havendo compensação no terceiro dia do ciclo de suplementação (Figura 1). Com o oferecimento de amido de forma frequente, a depressão no consumo ($P < 0,05$) ocorre somente no primeiro dia do ciclo, havendo compensação no consumo no segundo dia do ciclo de suplementação. Quando o amido foi oferecido de forma infrequente concomitantemente com a proteína, variações no consumo de forragem ao longo do ciclo não foram verificadas ($P > 0,05$). Com a oferta infrequente de amido no dia posterior à suplementação proteica verificou-se depressão no consumo de forragem ($P < 0,05$) no primeiro dia do ciclo, com a posterior compensação nos demais dias do ciclo de suplementação.

Não houve diferença entre tratamentos ($P \geq 0,32$) quanto aos coeficientes de digestibilidade total da MO e FDNcp e à concentração de MOD na dieta (Tabela 3). O fornecimento de suplementos ampliou ($P < 0,05$) os coeficientes de digestibilidade total da PB, não havendo, contudo, diferenças entre os diferentes esquemas de suplementação (Tabela 3).

Observou-se diferenças ($P < 0,02$) entre tratamentos quanto aos coeficientes de digestibilidade ruminal (Tabela 3). De forma geral, a digestão ruminal da PB e da FDNcp foi ampliada pelo fornecimento de suplementos ($P < 0,05$), não havendo diferenças entre os diferentes esquemas de suplementação ($P > 0,05$). Ressalta-se que os coeficientes de digestibilidade ruminal da PB alteraram-se de negativo no tratamento controle, para positivos em todos os tratamentos com suplementação. Por outro lado, a digestão ruminal da MO foi superior nos tratamentos em que amido suplementar foi fornecido ($P < 0,05$).

O fornecimento de amido suplementar reduziu ($P < 0,05$) o coeficiente de digestibilidade intestinal da MO e da FDNcp (Tabela 3). Além disso, não foi verificada diferença entre tratamentos ($P > 0,06$) quanto ao coeficiente de digestibilidade intestinal da PB (Tabela 3).

De forma geral, o fornecimento de suplementos, independentemente do esquema de suplementação, reduziu ($P < 0,05$) o *pool* ruminal de compostos fibrosos (Tabela 4). Contudo, nenhuma diferença entre tratamentos foi verificada ($P \geq 0,05$) com relação às taxas de consumo, degradação e passagem dos compostos fibrosos.

O consumo de N seguiu o padrão previamente apresentado para o consumo de PB (Tabela 5). Não foram verificadas diferenças entre tratamentos ($P \geq 0,08$) com relação à excreção fecal de nitrogênio, balanço de compostos nitrogenados (BN), eficiência do uso do nitrogênio (EFUN), fluxo intestinal de compostos nitrogenados

microbianos (NMIC) e sobre a eficiência de síntese microbiana. O fornecimento de suplementos ampliou ($P < 0,05$) o balanço nitrogenado no rúmen (BNRU), mas sem diferenças ($P > 0,05$) entre os diferentes esquemas de suplementação. Destaca-se que o BNRU verificado no tratamento controle foi negativo, tornando-se positivo com a oferta de suplementos. O oferecimento de suplementos reduziu ($P > 0,05$) a produção relativa de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (NMICR), não havendo diferenças entre os diferentes esquemas de suplementação.

Não foram verificadas diferenças de tratamentos ($P \geq 0,14$) ou interação entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação ($P \geq 0,10$) sobre o pH ruminal e a concentração de AGV no rúmen (Tabela 6). As proporções molares de butirato e acetato apresentaram diferenças entre tratamentos ($P < 0,01$) mas sem efeito de interação entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação ($P > 0,26$). Observou-se que a suplementação frequente com amido proporcionou as maiores ($P < 0,05$) proporções molares de butirato, sendo as menores ($P < 0,05$) verificadas com a suplementação exclusivamente proteica. As maiores proporções molares de acetato ($P < 0,05$) foram verificadas no controle e com a suplementação exclusiva com proteína. A relação acetato:propionato apresentou diferenças entre tratamentos ($P < 0,01$), sendo menor com a suplementação infrequente com amido conjuntamente com a proteína.

A proporção molar de propionato apresentou efeito de interação ($P < 0,01$) entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação (Tabela 6). O estudo deste efeito (Figura 2) indicou que variações entre dias ocorreram somente com a suplementação exclusivamente proteica ou quando amido foi ofertado de forma infrequente. Nesses casos, de forma geral, menores proporções foram verificadas no terceiro dia do ciclo de suplementação.

Verificou-se efeito de interação ($P < 0,01$) entre tratamentos e dias de suplementação sobre a concentração de NAR (Tabela 6). De forma geral, a suplementação ampliou as concentrações ($P < 0,01$). O desdobramento da interação (Figura 3) indicou que o oferecimento de suplementos, independentemente do esquema de suplementação, levou a maiores concentrações no primeiro dia do ciclo de suplementação, com decréscimos gradativos para o segundo e terceiro dias do ciclo.

Não foram verificados efeitos de tratamentos ($P > 0,39$) ou interação entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação ($P > 0,07$) sobre a excreção urinária de nitrogênio amoniacal (Tabela 7). Por outro lado, a excreção urinária de N (EUN) apresentou efeito de interação ($P < 0,01$) entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação. De forma geral, a EUN foi superior ($P < 0,01$) nos animais suplementados (Tabela 7). O estudo da interação indicou excreção estável ($P > 0,05$) entre dias para o controle (Figura 4). A suplementação exclusiva com proteína ou simultânea com proteína e amido apresentou EUN similar ($P > 0,05$) nos dois primeiros dias do ciclo, com decréscimo ($P < 0,05$) no terceiro dia do ciclo de suplementação. Por sua vez, a suplementação frequente com amido e a suplementação com amido posterior à suplementação proteica causaram decréscimo gradativo ($P < 0,05$) da EUN ao longo dos dias do ciclo de suplementação.

A concentração de NUS foi, de forma geral, superior ($P < 0,01$) nos animais suplementados (Tabela 7), havendo, contudo, interação ($P < 0,01$) com os dias do ciclo de suplementação. O estudo deste efeito (Figura 5) mostrou não haver variação entre dias ($P > 0,05$) para o tratamento controle. A suplementação exclusivamente proteica implicou em pico na concentração de NUS ($P < 0,05$) no dia imediatamente após a suplementação. Com adição de amido, independentemente do esquema de suplementação, não se verificou pico no segundo dia do ciclo de suplementação,

havendo concentrações similares ($P>0,05$) no primeiro e segundo dia e queda no NUS ($P<0,05$) no terceiro dia do ciclo de suplementação.

A CNUF apresentou efeito de interação entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação ($P<0,02$), sendo, de forma geral, maior ($P<0,01$) nos tratamentos envolvendo suplementação. O controle e a suplementação exclusivamente proteica não causaram variação em CNUF ($P>0,05$) ao longo dos dias do ciclo de suplementação (Figura 6). Com o oferecimento de amido verificou-se maiores CNUF ($P<0,05$) no primeiro e segundo dia, com queda nos valores ($P<0,05$) no terceiro dia do ciclo de suplementação.

Não foram verificados diferenças entre tratamentos ($P\geq 0,10$) sobre a concentração sanguínea de proteínas totais, albumina e globulina e sobre as atividades de AST e GGT (Tabela 8). Por outro lado, a concentração sanguínea de IGF1 foi elevada ($P<0,05$) pela suplementação, independentemente do esquema adotado. A atividade da ALT foi afetada pelos tratamentos ($P<0,01$), com os maiores valores ($P<0,05$) obtidos com suplementação com proteína e amido infrequente simultaneamente à suplementação proteica e com amido ofertado de forma frequente. Valores intermediários de ALT foram verificados para a suplementação exclusivamente proteica e com a inclusão de amido no dia posterior à suplementação proteica.

A concentração sanguínea de glicose apresentou efeito de interação ($P<0,01$) entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação (Tabela 8). Não foi verificada variação entre dias ($P>0,05$) para o controle e para o oferecimento frequente de amido (Figura 7). A suplementação exclusivamente proteica e a suplementação com amido concomitantemente à proteína propiciaram picos ($P<0,05$) na concentração de glicose no primeiro dia do ciclo de suplementação, com concentrações estáveis nos demais dias ($P>0,05$). Por outro lado, o fornecimento de amido no dia posterior à suplementação

proteica proporcionou concentrações mais elevadas de glicose nos dois primeiros dias do ciclo, com queda no terceiro dia.

A concentração sanguínea de insulina foi afetada ($P < 0,01$) pela interação entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação (Tabela 8). De forma geral, as concentrações foram superiores nos animais suplementados ($P < 0,05$). Não foi verificada variação entre dias ($P > 0,05$) para o controle e para a suplementação exclusivamente proteica (Figura 8). A suplementação com amido de forma frequente ampliou as concentrações de insulina ($P < 0,05$) no segundo e terceiro dias do ciclo de suplementação. De outra forma, a suplementação infrequente com amido concomitantemente com a proteína promoveu pico ($P < 0,05$) na concentração de insulina no primeiro dia do ciclo, com queda gradativa no restante do ciclo de suplementação. Por outro lado, o fornecimento infrequente de amido no dia posterior à suplementação proteica implicou em pico ($P < 0,05$) de concentração de insulina no segundo dia do ciclo de suplementação.

DISCUSSÃO

Em termos médios, o fornecimento de suplementos não alterou o consumo voluntário (Tabela 2). De forma geral, respostas sobre o consumo em função da suplementação proteica deixam de ser evidentes quando a concentração de PB na forragem é superior a 70 g/kg (Lazzarini et al., 2016; Batista et al., 2017), como verificado neste estudo (Tabela 1). Apesar da suplementação não aumentar o consumo de forragem, houve aumento da relação PB:MOD na dieta. A relação proteína:energia tem sido sugerida como uma das principais características dietéticas que afeta o consumo voluntário e que poderia ser adequada por intermédio de programas de suplementação (Egan, 1977; Detmann et al., 2014c). Em condições tropicais a maximização do consumo ocorre com a relação PB:MOD próxima a 210-220 g/kg (Reis et al., 2016). No entanto, neste estudo, os níveis de suplementação não foram suficientes para estabelecer tais relações. Em média, o fornecimento de suplementos ampliou a relação PB:MOD de 123 para 181 g/kg (Tabela 2), o que parece justificar a falta de alterações médias no consumo de forragem.

No entanto, mesmo sem alterações médias no consumo (Tabela 2), o consumo de forragem foi deprimido no dia da suplementação proteica, com exceção feita ao fornecimento de amido infrequente e concomitante à proteína (Figura 1). O consumo voluntário de forragem pode ser inibido por excesso de N no ambiente ruminal (Detmann et al., 2009), o que é atestado pelos picos na concentração de NAR (Figura 3) e NUS (Figura 5) causados pela suplementação proteica infrequente. Em situações nas quais a disponibilidade de N torna-se muito superior à disponibilidade de energia, excesso de amônia circulante pode acarretar em depressões no consumo mediadas por

deficiência de ATP hepático causada por utilização excessiva do ciclo da ureia (Vissek, 1984), aumento da produção de calor corporal (Poppi & McLennan, 1995) e indisposições causadas pelo excesso de amônia no sangue e no interior das células (Detmann et al., 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho permitem indicar que a suplementação proteica infrequente conduziu a um quadro de sobrecarga hepática, notadamente no dia da suplementação. O primeiro desses indicativos é representado pela elevação sistemática causada pela suplementação proteica infrequente nas concentrações séricas de ALT (Tabela 8). A ALT constitui enzima de atividade predominantemente hepática (Panteghini & Bais, 2008) cuja principal função reside na transferência de grupamento amino para o α -cetoglutarato, mediando à formação de glutamato, o qual, por sua vez, pode ser utilizado como doador de grupamento amino para a formação de ureia (Vissek, 1979; Nelson & Cox, 1999). Naturalmente, a atividade de ALT no sangue é extremamente inferior à atividade hepática (Panteghini & Bais, 2008). Assim, o aumento de sua atividade sérica constitui um indicador de danos aos hepatócitos (Giannini et al., 2005).

A hipótese de sobrecarga hepática com a suplementação proteica infrequente pode ser indiretamente percebida por intermédio da excreção urinária de amônia. Embora sem diferenças entre tratamentos ($P > 0,39$), verificou-se tendência de interação ($P < 0,08$) entre tratamentos e dias do ciclo de suplementação para a excreção de nitrogênio amoniacal na urina (Tabela 7). Considerando-se o desdobramento desse efeito (Figura 9), com exceção da suplementação com amido concomitantemente à proteína, verificou-se ampliação da excreção urinária de amônia simultaneamente à suplementação proteica.

A massa de amônia urinária excretada diariamente, por si, não é capaz de indicar quantitativamente a extensão dos danos causados pela suplementação proteica infrequente sobre o metabolismo hepático, possivelmente pelo fato de o maior acúmulo de amônia ocorrer em nível intracelular (Visek, 1984). Dessa forma, em geral, há, mesmo em casos de intoxicação aguda, pouca amônia circulante passível de ser capturada pelos rins. Contudo, o padrão qualitativo da excreção urinária de amônia observado com a sua elevação associada à suplementação proteica (Figura 9) indica consistentemente falhas hepáticas na assimilação de N amoniacal na forma de ureia.

Adicionalmente, o argumento aqui apresentado com relação ao comprometimento do funcionamento hepático com a suplementação proteica infrequente pode ser ainda corroborado pela avaliação isolada do tratamento no qual houve fornecimento exclusivo de suplemento proteico. Embora sem a inclusão de amido, verificou-se pico na concentração de glicose sanguínea no dia do fornecimento do suplemento proteico (Figura 7). Contudo, este pico não foi associado a resposta concomitante na concentração sanguínea de insulina (Figura 8), ao contrário dos tratamentos com fornecimento infrequente de amido, nos quais a variação na glicose sanguínea levou a variações nas concentrações de insulina (Figuras 7 e 8).

Relatos na literatura (Singer & McCarty, 1971; Emmanuel et al., 1982; Antonelli et al., 2009) indicam que a elevação em demasia na concentração de NUS (e, por associação, na concentração de NAR) estão relacionados a intoxicações subagudas ou agudas por amônia, os quais demandam do organismo a mobilização de glicose para manutenção do funcionamento hepático, incluindo o fornecimento de intermediários do ciclo de Krebs e do ciclo da ureia, e para manutenção do funcionamento do tecido nervoso. Nesses casos, o aumento na concentração de glicose no sangue não se associa a um aumento concomitante na concentração de insulina, como verificado neste estudo

para o tratamento com suplementação exclusivamente proteica (Figuras 7 e 8). Nesta situação, o animal torna-se refratário à ação da insulina, sendo a mobilização de glicose mediada por ações simultâneas do glucagon e da adrenalina (Emmanuel et al., 1982).

O objetivo principal da suplementação com amido baseou-se na hipótese de ampliar a assimilação de N no rúmen (Souza et al., 2010), a retenção de N no organismo animal (Franco et al., 2017) e reduzir os possíveis impactos negativos da suplementação proteica infrequente sobre o consumo e metabolismo hepático. Dessa forma, diferentes estratégias foram avaliadas. A suplementação concomitante com amido buscou reproduzir o que seria normalmente verificado em um esquema de suplementação infrequente em sistemas de produção. Por outro lado, a suplementação frequente ou diária com amido buscou verificar os possíveis efeitos com a constância na disponibilidade de energia sobre a proteína ofertada infrequentemente. Adicionalmente, resultados de experimentos conduzidos em condições tropicais (Rufino, 2015; Reis, 2018) indicaram um retardo no pico de concentração de NUS, o qual ocorreria no dia após a suplementação proteica, levantando a hipótese de que o aumento na disponibilidade de energia neste dia em particular poderia ser efetivo em agir sobre a retenção de N no organismo animal. Ressalta-se que esse comportamento de retardo no pico da concentração de NUS foi verificado neste estudo para a suplementação exclusivamente proteica (Figura 5). Contudo, essa última hipótese não foi suportada pelos resultados aqui demonstrados, pois todos os esquemas de suplementação com amido implicaram na não ocorrência de picos na concentração de NUS no segundo dia do ciclo de suplementação (Figura 5), indicando, sob este aspecto, impactos similares sobre o equilíbrio dessa variável.

Cabe ressaltar que nenhuma das estratégias de inclusão de amido complementar surtiram efeito sobre a assimilação de N no ambiente ruminal (Tabela 5), embora a

suplementação, de forma geral, tenha propiciado ambiente ruminal mais equilibrado quanto à disponibilidade de N.

De forma geral, a melhor estratégia de suplementação energética foi aquela no qual o amido foi fornecido de forma simultânea ao suplemento proteico, haja vista que, nesse caso específico, não foram verificados efeitos deletérios sobre o consumo voluntário de forragem, o qual manteve-se estável ao longo do ciclo de suplementação (Figura 1). Embora esse esquema de suplementação tenha também propiciado aumento da atividade sanguínea da ALT (Tabela 8), esse também propiciou, entre os tratamentos com suplementação, o menor pico de NAR (Figura 3). Conseqüentemente, esse esquema culminou na existência de pico de excreção urinária de N no dia da suplementação (Figura 4), em ausência de pico na excreção urinária de N amoniacal (Figura 9) e maior estabilidade entre os tratamentos com suplementação energética e proteica com relação à carga de N ureico filtrada nos rins (Figura 6). Dessa forma, a melhor estratégia de suplementação energética consistiria naquela em que há fornecimento concomitante com a proteína ofertada infrequentemente. Em termos de sistemas de suplementação, cabe ressaltar que essa estratégia consistiria daquela que demandaria menores custos e mão-de-obra para o fornecimento de suplementos.

No entanto, a despeito das particularidades das diferentes estratégias de suplementação, verificou-se alta resiliência dos animais com relação aos impactos negativos da suplementação proteica infrequente sobre o consumo voluntário. A despeito dos impactos negativos do suplemento proteico no dia da suplementação (Figura 1), os animais foram capazes de compensar a baixa ingestão nos dias subsequentes do ciclo de suplementação, levando à similaridade entre tratamentos em termos de consumo voluntário médio de forragem (Tabela 2).

De forma geral, os efeitos da suplementação sobre a digestão da MO foram ocasionados pela adição de amido à dieta (Tabela 3). Com o suprimento de amido, ampliou-se o coeficiente de digestibilidade ruminal da MO, reflexo da alta disponibilidade ruminal deste componente. Paralelamente, a adição de amido implicou em menor digestibilidade intestinal da MO. Esse comportamento possivelmente deriva-se da menor digestibilidade ruminal da MO na ausência de amido, o que provocaria maior escape de material potencialmente digestível para os intestinos. Esse balanço entre as digestibilidades ruminal e intestinal implicou em digestão total da MO similar entre os tratamentos.

Por outro lado, a adição de suplementos à dieta elevou a digestibilidade ruminal da PB (Tabela 3). Ressalta-se que na ausência de suplementos, o coeficiente de digestibilidade ruminal da PB foi negativo, indicando participação proporcionalmente mais proeminente do N reciclado para manutenção do equilíbrio ruminal quanto à disponibilidade de compostos nitrogenados (Detmann et al., 2017). Com a adição de N via suplementos, ampliou-se o *input* dietético de N, o que permite reduzir a participação proporcional do N reciclado no ambiente ruminal e incrementar o coeficiente de digestibilidade ruminal da PB (Detmann et al., 2014c; Batista et al., 2017). Embora não se tenha verificado diferenças entre tratamentos quanto à digestão intestinal, o coeficiente de digestibilidade total da PB foi incrementado pela suplementação. Com a maior disponibilidade dietética de N, promove-se maior consumo de PB e, conseqüentemente, diluição da fração metabólica fecal (Van Soest, 1994), ampliando-se o coeficiente de digestibilidade aparente da PB.

De forma geral, o fornecimento de suplementos ampliou a digestibilidade ruminal da FDN (Tabela 3). Esse comportamento reflete diretamente a maior adequação do ambiente ruminal no tocante à disponibilidade de compostos nitrogenados para o

crescimento de microrganismos fibrolíticos. Em média, a concentração de NAR no controle (Tabela 6) manteve-se abaixo do mínimo necessário a degradação adequada da FDN (8 mg/dL; Detmann et al., 2009), valor esse superado em todas as estratégias de suplementação aqui avaliadas. Ressalta-se que a maior adequação ao crescimento fibrolítico não se associou, contudo, a uma maior produção microbiana no rúmen, como verificado por outros autores em condições tropicais (Figueiras et al., 2016; Lazarinni et al., 2016) e não tropicais (Belanche et al., 2012).

Por outro lado, embora maior digestão ruminal da fibra tenha sido observada com o fornecimento de suplementos (Tabela 3), não foram verificadas variações entre tratamentos no tocante às taxas de ingestão, degradação e passagem dos componentes fibrosos (Tabela 4). Contudo, a maior adequação do ambiente ruminal para a degradação da fibra foi também suportada pela redução do *pool* ruminal de compostos fibrosos com a suplementação (Tabela 4). Caso haja comprometimento da digestão da fibra no rúmen, o animal é capaz de ampliar o *pool* de material residente a fim de tentar manter a massa de material digerido e, por conseguinte, o total de energia extraído a partir da dieta (Schettini et al., 1999). Dessa forma, com a menor digestão ruminal da fibra, os animais não suplementados passaram a exibir maior *pool* ruminal de compostos fibrosos, implicando em similaridade entre tratamentos quanto ao total de fibra digerida (Tabela 2).

Adicionalmente, com a menor digestão ruminal da fibra, propicia-se escape de maior quantidade de FDN não digerida ao intestino, o que pode incrementar sua digestão intestinal, como verificado no tratamento controle (Tabela 3). Embora apresentado digestão ruminal da FDN similar aos demais tratamentos com suplementação, o fornecimento exclusivo de proteína promoveu maior digestão intestinal da FDN. Uma possível explicação para esse comportamento poderia ser

obtida considerando-se que este tratamento promoveu a maior concentração de NUS (Figura 5), o que pode ter implicado em maior transferência de N para o intestino grosso, causando maior crescimento microbiano e maior digestão intestinal da FDN. No entanto, apesar das variações nas digestibilidades ruminal e intestinal entre tratamentos, nenhuma diferença foi verificada no total de fibra digerida no trato gastrintestinal (Tabelas 2 e 3).

Trabalhos conduzidos em condições tropicais permitem evidenciar que efeitos deletérios sobre a digestão da FDN são observados com a suplementação com amido (Souza et al., 2010; Costa et al., 2011; Figueiras et al., 2016). Esse efeito negativo resulta da maior competição por substratos essenciais entre espécies fibrolíticas e não fibrolíticas no rúmen. Contudo, a competição entre espécies pode ser amenizada pelo suprimento de nutrientes essenciais, como o N (Carvalho et al., 2011). Neste trabalho, a suplementação com amido esteve associada à suplementação conjunta com compostos nitrogenados, implicando em suprimento adequado de NAR em todos os tratamentos com suplementação (Tabela 6), o que suporta a ausência de efeitos negativos do amido sobre a digestão ruminal da FDN (Tabela 3).

O consumo de N foi ampliado pela suplementação, não havendo variação entre os esquemas de fornecimento de suplementos adotados (Tabela 5). Considerando-se a constância entre tratamentos quanto à excreção fecal de N (Tabela 5), o principal determinante para a eficiência de uso do N no organismo animal residiu sobre a perda urinária. Nesse sentido, independentemente da adição de amido, as perdas urinárias de N foram elevadas pela suplementação proteica (Tabela 5; Figura 4), o que culminou em eficiência de uso do N similar entre todos os tratamentos (Tabela 5). No entanto, considerando-se valor médio de 0,104 g N retido/g N ingerido, seria esperado maior balanço de N nos animais com maior consumo. Apesar de não observar-se diferenças

entre tratamentos ($P>0,72$), os animais suplementados apresentaram, de forma consistente, balanço de N aproximadamente 3,7 g/d ou 60% superiores aos animais controle (Tabela 5). Isso parece refletir diretamente a maior disponibilidade de N no organismo (Figura 5) que pode potencialmente ser direcionado para fins anabólicos (Detmann et al., 2014c), a despeito dos impactos negativos verificados sobre o metabolismo hepático, como previamente discutido. A ideia de melhorias nas condições anabólicas é reiterada pela elevação na concentração sanguínea de IGF1 consistentemente causada pelo fornecimento de suplementos (Tabela 8). O IGF1 atua como regulador endócrino do crescimento muscular no qual, além de sua ação independente, constitui ligação importante entre o hormônio do crescimento e o processo metabólico de crescimento (Pell & Bates, 1990), principalmente no músculo esquelético (Lobley, 1992).

Apesar dos efeitos anabólicos gerais da suplementação, a adição de amido à dieta não causou nenhum efeito aparente sobre o anabolismo animal (Tabela 8). De certa forma, isso agrega às colocações de Detmann et al. (2014b), os quais afirmaram que existe associação entre a eficiência animal e o equilíbrio ruminal com relação à disponibilidade de compostos nitrogenados. Não se observou um padrão de influência sobre o equilíbrio ruminal de compostos nitrogenados em função da suplementação com amido, embora a adição de suplementos, tendo como elemento comum os compostos nitrogenados tenha propiciado balanço de N positivos no rúmen (Tabela 5). Novamente, isso agrega às colocações de Detmann et al. (2014c) de que o equilíbrio ruminal em termos de compostos nitrogenados está associado à disponibilidade de N e é independente da energia dietética.

A partir dos resultados discutidos nesse trabalho, entende-se que a adição de energia em suplementos proteicos ofertados de forma infrequente possui poucos efeitos

sobre a eficiência de uso do N suplementar, sendo seu principal papel atribuído à manutenção de equilíbrio metabólico do animal, minimizando os impactos negativos da alta carga de N ofertada nos dias da suplementação, principalmente em termos de metabolismo hepático e depressão no consumo voluntário de forragens. Entre as alternativas avaliadas nesse estudo, o oferecimento de energia concomitante à suplementação proteica mostrou-se ser a melhor estratégia de suplementação.

CONCLUSÃO

A suplementação proteica infrequente causa impactos negativos sobre o metabolismo hepático e deprime o consumo voluntário de forragem, notadamente no dia de oferecimento dos suplementos. Contudo, esses efeitos negativos sobre o consumo são eliminados com a suplementação energética infrequente concomitantemente à suplementação proteica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.S.; LINTON J.A.V. *In vivo* methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 1, 2007. **Anais...** Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2007, p.72-89.

ANTONELLI, A.C.; TORRES, G.A.S.; MORI, C.S.; SOARES, P.C.; MARUTA, C.A.; ORTOLANI, E.L. Intoxicação por amônia em bovinos que receberam ureia extrusada ou granulada: alterações em alguns componentes bioquímicos do sangue. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 69-76, 2009.

BATISTA, E.D.; DETMANN, E.; GOMES, D.I.; RUFINO, L.M.A.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; FRANCO, M.O.; SAMPAIO, C.B.; REIS, W.L.S. Effect of protein supplementation in the rumen, abomasum, or both on intake, digestibility, and nitrogen utilization in cattle fed high-quality tropical forage. **Animal Production Science**, v.50, p.1993-2000, 2017.

BELANCHE, A.; DOREAU, M.; EDWARDS, J.E.; MOORBY, J.M.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C.J. Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. **Journal of Nutrition**, v.142, p.1684-1692, 2012.

CARVALHO, I.P.C.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; COSTA, V.A.C.; GOMES, D.I. Growth and antimicrobial

activity of lactic acid bacteria from rumen fluid according to energy or nitrogen source.

Revista Brasileira de Zootecnia, v.40, p.1260-1265, 2011.

COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; HENRIQUES, L.T.; CARVALHO, I.P.C.; VALENTE, T.N.P. Digestibilidade total e parcial e balanço nitrogenado em bovinos em pastejo no período das águas recebendo suplementos com nitrogênio não-proteico e/ou proteína verdadeira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2815-2826, 2011.

DETMANN, E.; PAULINO, M.P.; VALADARES FILHO, S.C.; LANA, R.P. Fatores controladores de consumo em suplementos múltiplos fornecidos ad libitum para bovinos manejados a pasto. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.73-93, 2007.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SAMPAIO, C.B.; SOUZA, M.A.; LAZZARINI, I.; DETMANN, K.S.C. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using *Michaelis-Menten* kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136-146, 2009.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Otimização do uso dos recursos forrageiros basais. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7, 2010, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SIMCORTE, 2010. p.191-240.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; BATISTA, E.D.; RUFINO, L.M.A. Aspectos nutricionais aplicados a bovinos em pastejo nos trópicos. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 9, 2014, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2014a. p.239-268.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; HUHTANEN, P. Nutritional aspects applied to grazing cattle in tropics: a review based on Brazilian results. **Semina Ciências Agrárias**, v.35, p.2829-2854, 2014b.

DETMANN, E.; VALENTE, E.E.L.; BATISTA, E.D.; HUHTANEN, P. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science**, v.162, p.141-153, 2014c.

DETMANN, E.; BATISTA, E.D.; SILVA, T.E.; REIS, W.L.S.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Nutrição de bovinos de corte sob sistema de pastejo com foco na eficiência de utilização de nitrogênio. In: SIMPOSIO DE PECUARIA DE CORTE, 10, 2017. **Anais...** Lavras: SIMPEC, 2017. p.43-72.

EGAN, A.R. Nutritional status and intake regulation in sheep. VIII. Relationships between voluntary intake of herbage by sheep and the protein/energy ratio in the digestion products. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.28, p.907-915, 1977.

EMMANUEL, B.; THOMPSON, J.R.; CHRISTOPGERSON, R.J.; MILLIGAN, L.P.; BERZINS, R. Interrelationships between urea, ammonia, glucose, insulin and adrenaline during ammonia-urea toxicosis in sheep (*Ovis aries*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.72, p.697-702, 1982.

FIGUEIRAS, J.F.; DETMANN, E.; FRANCO, M.O.; BATISTA, E.D.; REIS, W.L.S.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Effects of supplements with different protein contents on nutritional performance of grazing cattle during the rainy season. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.29, p.1710-1718, 2016.

FRANCE, J.; SIDDON, R.C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. **Journal of Theoretical Biology**, v.121, p.105-120, 1986.

FRANCO, M.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; BATISTA, E.D.; RUFINO, L.M.A.; BARBOSA, M.M.; LOPES, A.R. Intake, digestibility, and rumen and metabolic characteristics of cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and different levels of starch. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.30, p. 797-803, 2017.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v.172, p.367–379, 2005.

KAPS, A.M.; LAMBERSON, W.R. **Biostatistics for animal science**. London: CABI Publishing, 2004. 445p.

LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; OLIVEIRA, F.A.; SILVA, P.T.; REIS, W.L.S. Nutritional performance of cattle grazing on low-quality tropical forage supplemented with nitrogenous compounds and/or starch. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p.664-674, 2013.

LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F., BATISTA, E.D.; RUFINO, L.M.A.; REIS, W.L.S.; FRANCO, M.O. Nutritional performance of cattle grazing during rainy season with nitrogen and/or starch

supplementation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.29, p.1120-1128, 2016.

LOBLEY, G.E. Control of the metabolic fate of amino acids in ruminants: a review. **Journal of Animal Science**, v.70; p.64-75, 1992.

MACHADO, M.G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C.; BENTO, C.B.; MARCONDES, M.I.; ASSUNÇÃO, A.S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.222, p.132-148, 2016.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry** 3 ed. Worth Publishers, New York, 1999. 1152p.

PALMA, M.N.N.; ROCHA, G.C.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E. Evaluation of acid digestion procedures to estimate mineral contents in materials from animal trials. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.28, p.1624- 1628, 2015.

PANTEGHINI, M.; BAIS, R. **Fundamentos de química clínica**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 446p.

PELL, J. M.; BATES, P. C. The nutritonal regulation of growth hormone action. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.163-192, 1990.

POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.

REECE, W.O. Função renal nos mamíferos. In: REECE, W.O. (Ed.) **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.67-96.

REIS, W.L.S. **Investigation on daily or every three days supplementation with protein or protein and starch of cattle fed tropical grass**. 2018. 47f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

REIS, W.L.S.; DETMANN, E.; BATISTA, E.D.; RUFINO, L.M.A.; GOMES, D.I.; BENTO, C.B.P.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C. Effects of ruminal and post-ruminal protein supplementation in cattle fed tropical forages on insoluble fiber degradation, activity of fibrolytic enzymes, and the ruminal microbial community profile. **Animal Feed Science and Technology**, v.218, p.1-16, 2016.

REYNAL, S.M.; BRODERICK, G.A.; BEARZI, C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4065-4082, 2005.

RUFINO, L.M.A. **Desempenho nutricional e características metabólicas em bovinos alimentados com forragens tropicais em respostas à suplementação infrequente com compostos nitrogenados**. 2015. 99f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

SCHETTINI, M.A.; PRIGGE, E.C.; NESTOR, E.L. Influence of mass and volume of ruminal contents on voluntary intake and digesta passage of a forage diet in steers. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1896-1904, 1999.

SINGER, R.H.; MCCARTY, R.T. Acute ammonium salt poisoning in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, p.1229-1238, 1971.

SOUZA, M.A.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; SAMPAIO, C.B.; LAZZARINI, I.; VALADARES FILHO, S.C. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p.1299-1310, 2010.

USHIDA, K.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of treatment and preservation. **Reproduction Nutrition Development**, v.25, p.1037-1046, 1985.

VALADARES FILHO, S.C.; COSTA E SILVA, L.F.; LOPES, S.A.; PRADOS L.F.; CHIZZOTTI, M.L.; MACHADO P.A.S.; BISSARO, L.Z.; FURTADO, T. **Nutritional requirements of Zebu and Crossbred cattle BR-CORTE**. 3 ed. Viçosa: DZO-UFV, 2016. 314p.

VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C.; VALADARES FILHO, S.C.; GOMES, D.I.; FIGUEIRAS, J.F. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2565-2573, 2011.

Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VISEK, W.J. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.481-498, 1984.

VISEK, W.J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v.3, p.273-282, 1979.

Tabela 1 - Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), lignina e FDN indigestível (FDNi) na forragem e nos compostos suplementares

Item	Feno ³	Suplemento proteico	Amido
MS ¹	888,7±2,0	902,2	874,9
MO ²	936,3±1,8	951,5	996,1
PB ²	77,7±0,8	1130,0	5,0
FDNcp ²	791,5±4,2	-	-
PIDN ²	37,2±1,2	-	-
Lignina ²	80,3±1,6	-	-
FDNi ²	240,8±3,7	16,2	-

¹ g/kg de matéria natural. ² g/kg de matéria seca. ³ Média ± erro padrão.

Tabela 2 - Consumo voluntário de matéria seca (MS), MS de forragem (MSF), matéria orgânica (MO) proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), MO digerida (MOD), FDNcp digerida (FDNcpD), FDNcp não digerida (FDNcpND) e relação PB:MOD na dieta em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos ^{1,2}					EPM	Valor-P
	C	PI	PIEF	PIEI	PIEI+1		
	kg/dia						
MS	4,81	4,61	5,22	5,06	4,93	0,387	0,530
MSF	4,81	4,42	4,65	4,48	4,36	0,387	0,744
MO	4,51	4,33	4,93	4,77	4,65	0,361	0,481
PB	0,370b	0,568a	0,585a	0,569a	0,567a	0,0344	<0,001
FDNcp	3,77	3,47	3,65	3,53	3,42	0,300	0,776
FDNi	1,064	0,930	0,979	1,002	0,935	0,1045	0,572
MOD	2,99	2,94	3,36	3,20	2,89	0,233	0,514
FDNcpD	2,59	2,40	2,45	2,32	2,25	0,210	0,727
FDNcpND	1,19	1,07	1,21	1,21	1,16	0,135	0,229
PB:MOD ³	123c	193a	176b	170b	186ab	5,5	<0,001
	g/kg de peso corporal						
MS	14,0	13,6	15,3	14,8	14,6	0,91	0,495
MSF	14,0	13,0	13,6	13,1	12,9	0,92	0,780
MO	13,1	12,7	14,5	14,0	13,8	0,85	0,440
FDNcp	11,0	10,2	10,8	10,3	10,1	0,72	0,829
FDNi	3,10	2,72	2,88	2,91	2,77	0,258	0,607

¹C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior à suplementação proteica. ²Médias na linha seguida por letras diferentes são diferentes (P<0,05). ³ g PB/kg MOD.

Tabela 3 - Coeficientes de digestibilidade (g/g) ruminal, intestinal e total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) e concentração dietética de matéria orgânica digerida (MOD; g/kg MS) em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos ^{1,2}					EPM	Valor-P
	C	PI	PIEF	PIEI	PIEI+1		
Ruminal ³							
MO	0,444b	0,476b	0,537a	0,525a	0,515a	0,0122	0,001
PB	-0,374b	0,085a	0,088a	0,079a	0,087a	0,0321	<0,001
FDNcp	0,589b	0,631a	0,642a	0,642a	0,653a	0,0167	0,015
Intestinal ³							
MO	0,395a	0,401a	0,313b	0,362b	0,318b	0,0320	0,013
PB	0,707	0,731	0,679	0,692	0,689	0,0209	0,068
FDNcp	0,241a	0,179a	0,013b	0,093b	-0,003b	0,0446	0,005
Total							
MO	0,663	0,685	0,681	0,686	0,663	0,0190	0,387
PB	0,596b	0,752a	0,707a	0,720a	0,702a	0,0235	0,004
FDNcp	0,689	0,689	0,669	0,684	0,665	0,0218	0,420
MOD	622	644	643	657	625	18,288	0,321

¹C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior à suplementação proteica. ²Médias na linha seguida por letras diferentes são diferentes (P<0,05). ³Calculado como fração do que chegou ao local de digestão.

Tabela 4 – Massa ruminal de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro potencialmente digestível (FDNpd) e de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e taxas de ingestão (ki), de degradação (kd) e de passagem (kp) das diferentes frações fibrosas em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos ^{1,2}					EPM	Valor-P
	C	PI	PIEF	PIEI	PIEI+1		
	g/kg de peso corporal						
FDN	14,2a	11,2b	11,7b	12,3b	11,8b	0,5973	0,027
FDNpd	6,2a	4,9b	4,8b	5,3b	5,3b	0,3311	0,037
FDNi	8,0a	6,6b	6,8b	7,1b	6,6b	0,4386	0,028
	/h						
ki FDN	0,0327	0,0359	0,0393	0,0349	0,0547	0,00353	0,550
ki FDNpd	0,0529	0,0616	0,0760	0,0598	0,0547	0,00598	0,070
kd FDNpd	0,0435	0,0493	0,0620	0,0515	0,0485	0,00552	0,160
kp FDNpd	0,0094	0,0071	0,0082	0,0074	0,0062	0,00109	0,057
kp FDNi	0,0167	0,0168	0,0183	0,0166	0,0179	0,00185	0,736

¹ C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior à suplementação proteica. ²Médias na linha seguida por letras diferentes são diferentes (P<0,05).

Tabela 5 - Consumo de nitrogênio (CN, g/dia), excreção fecal de nitrogênio (EFN, g/dia), balanço aparente de compostos nitrogenados (BN, g/dia), eficiência de uso do nitrogênio (EFUN, g/g N ingerido), balanço de nitrogênio no rúmen (BNRU, g/dia), fluxo intestinal de compostos nitrogenados microbianos (NMIC, g/dia), produção relativa de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (NMICR, g N microbiano/g N ingerido) e eficiência de síntese microbiana (EFM, g PB microbiana/kg de MO digerida) em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos ^{1 2}					EPM	Valor-P
	C	PI	PIEF	PIEI	PIEI+1		
CN	60,4b	90,9a	87,8a	91,0a	88,8a	5,56	<0,001
EFN	23,9	23,1	27,3	28,6	28,0	3,29	0,083
BN ³	6,2	10,6	11,7	9,6	7,6	4,09	0,729
EFUN ³	0,10	0,11	0,13	0,10	0,08	0,045	0,854
BNRU	-22,0c	7,1ab	8,4a	0,0b	3,8ab	3,20	<0,001
NMIC	51,9	45,3	55,6	46,8	47,1	6,40	0,700
NMICR	0,86a	0,56b	0,59b	0,55b	0,54b	0,052	0,002
EFM	106	99	109	89	100	8,0	0,456

¹C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior à suplementação proteica. ²Médias na linha seguida por letras diferentes são diferentes (P<0,05). ³Calculado utilizando-se a média de excreção urinária de nitrogênio ao longo do ciclo de suplementação (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR, mg/dL), pH ruminal, concentração ruminal de ácidos graxos voláteis (AGV, mmol/dL), proporção molar de acetato, propionato e butirato (mmol/100mmol) e relação acetato:propionato (A:P) em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos ^{1,2}					EPM	Valor-P ³	
	C	PI	PIEF	PIEI	PIEI+1		T×D	T
NAR	4,39	13,30	13,34	11,81	13,36	1,390	<0,001	<0,001
pH	6,46	6,60	6,43	6,36	6,43	0,139	0,101	0,315
AGV	11,1	10,6	11,7	11,9	11,9	0,66	0,429	0,148
Acetato	74,5a	74,4a	73,9ab	72,6c	73,5b	0,39	0,262	<0,001
Propionato	16,0	16,4	15,6	17,8	16,7	0,35	0,022	<0,001
Butirato	9,4bc	9,1c	10,5a	9,6b	9,8b	0,23	0,267	0,004
A:P	4,68a	4,56ab	4,74a	4,12c	4,42b	0,116	0,069	<0,001

¹C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior à suplementação proteica. ²Médias na linha seguida por letras diferentes são diferentes (P<0,05). ³T×D, interação entre tratamento e dia de amostragem; T, efeito de tratamento.

Tabela 7 - Excreção urinária de nitrogênio (EUN, g/dia), excreção urinária de nitrogênio amoniacal (EUNA, g/dia), concentração de nitrogênio ureico no soro (NUS, mg/dL) e carga de nitrogênio ureico filtrada pelos rins (CNUF, g/dia) em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos ¹					EPM	Valor-P ²	
	C	PI	PIEF	PIEI	PIEI+1		T × D	T
EUN	29,5	56,4	52,6	51,7	53,3	2,69	<0,001	<0,001
EUNA	0,327	0,800	0,639	0,505	0,678	0,1996	0,074	0,394
NUS	8,78	18,86	15,32	16,23	15,76	1,241	<0,001	<0,001
CNUF	36,8	73,5	72,6	71,0	68,3	8,48	0,012	<0,001

¹C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior à suplementação proteica. ²T×D, interação entre tratamento e dia de amostragem; T, efeito de tratamento.

Tabela 8 - Concentração sanguínea do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1, ng/mL), glicose (mg/dL), insulina (μ IU/mL), aspartato aminotransferase (AST, U/L), alanina aminotransferase (ALT, U/L), gamaglutamiltransferase (GGT, U/L), proteína total (PT, g/dL), albumina (g/dL) e globulina (g/dL) em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos ^{1,2}					EPM	Valor-P ³	
	C	PI	PIEF	PIEI	PIEI+1		T × D	T
IGF1	22,8b	29,3a	27,6a	28,2a	26,9a	3,69	0,969	0,007
Glicose	70,2	74,6	74,7	74,0	74,2	2,01	0,003	0,005
Insulina	2,38	3,29	4,16	4,18	3,75	0,959	0,008	0,048
AST	57,2	58,8	57,9	60,5	60,7	5,17	0,886	0,904
ALT	14,0c	15,3b	16,3a	16,6a	15,3b	2,18	0,670	<0,001
GGT	15,1	15,3	15,3	16,3	17,3	3,29	0,212	0,876
PT	6,55	6,53	6,64	6,53	6,53	0,098	0,248	0,102
Albumina	3,02	3,13	3,05	3,07	3,04	0,172	0,193	0,244
Globulina	3,53	3,40	3,59	3,46	3,49	0,150	0,191	0,145

¹C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior à suplementação proteica. ²Médias na linha seguida por letras diferentes são diferentes (P<0,05). ³T×D, interação entre tratamento e dia de amostragem; T, efeito de tratamento.

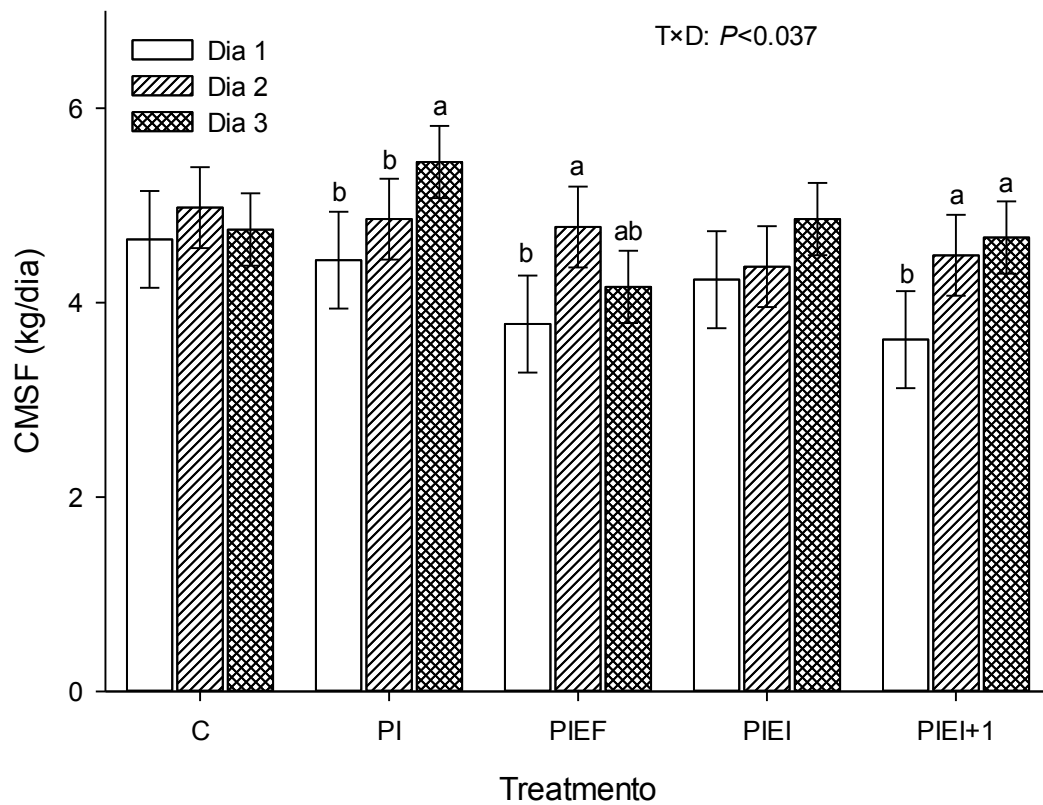


Figura 1 - Consumo voluntário de matéria seca de forragem (MSF) em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$)

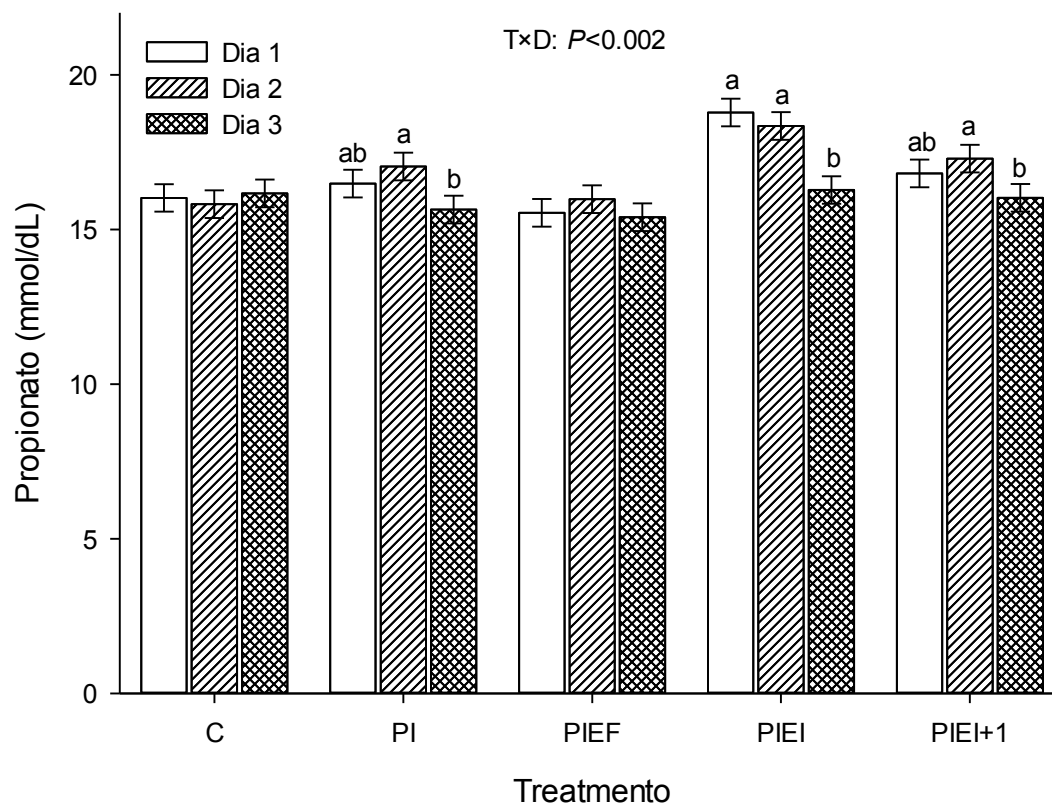


Figura 2 – Proporção molar de propionato em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 6). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$).

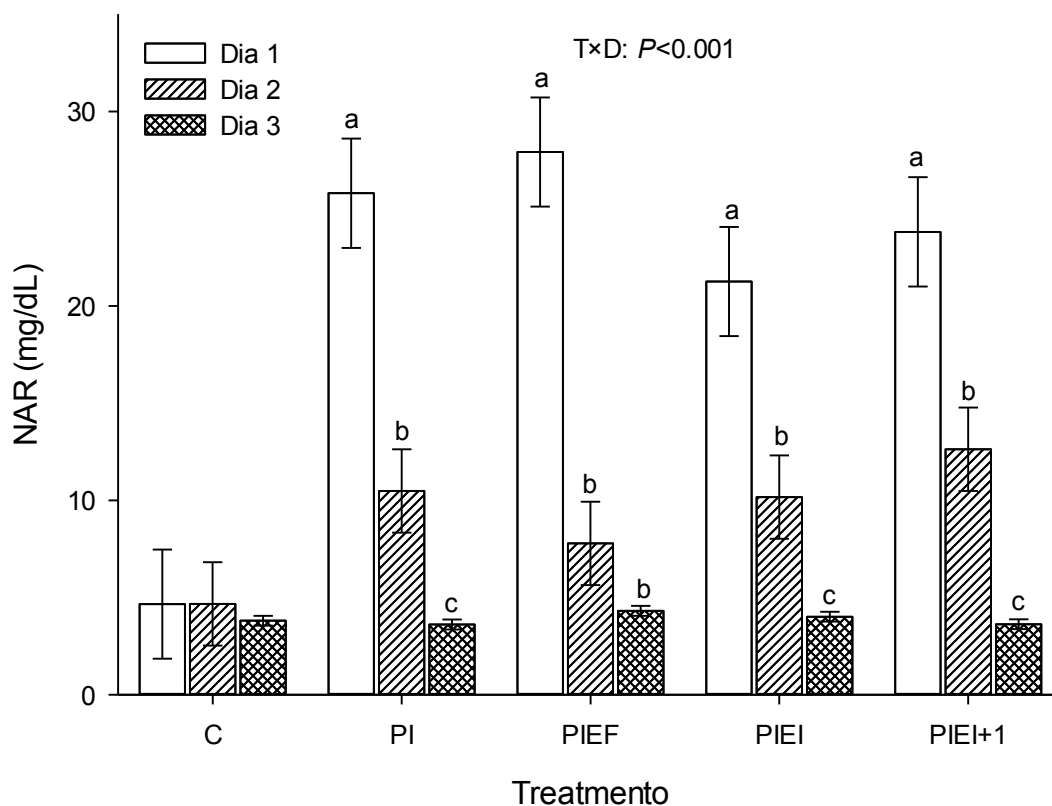


Figura 3 - Concentração média diária de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) em em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 6). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$).

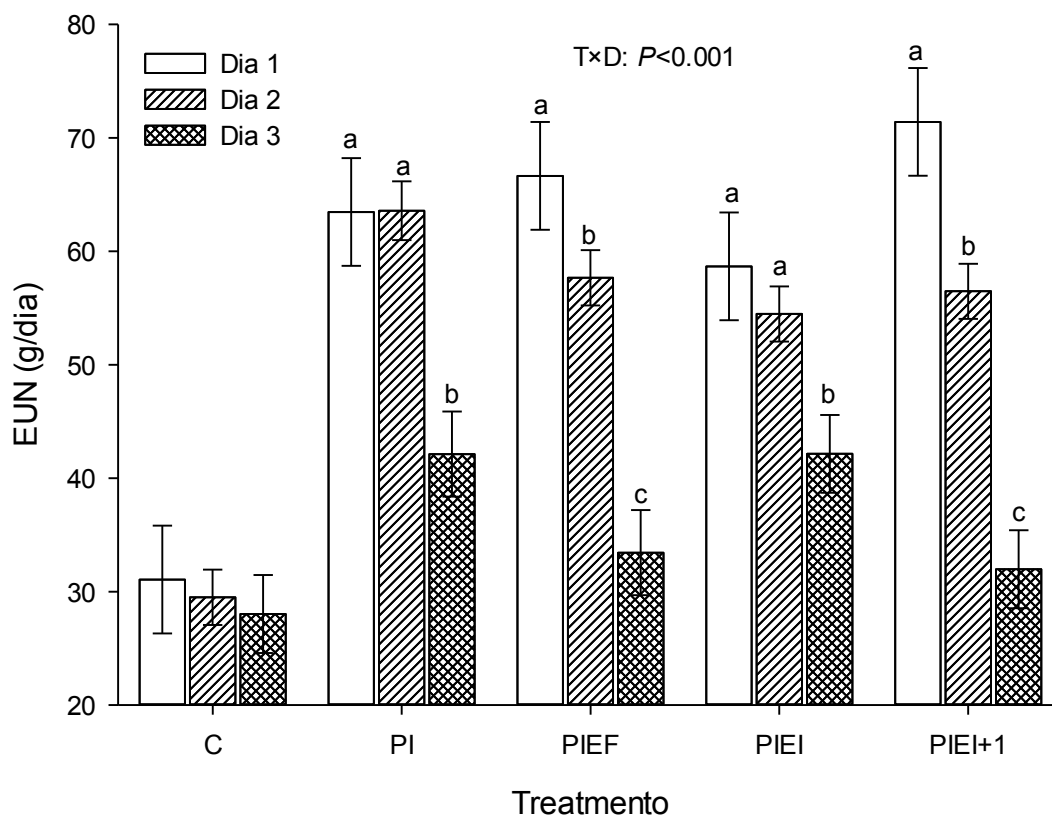


Figura 4 – Excreção urinária de nitrogênio (EUN) em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 7). Médias, dentro dos tratamentos seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$).

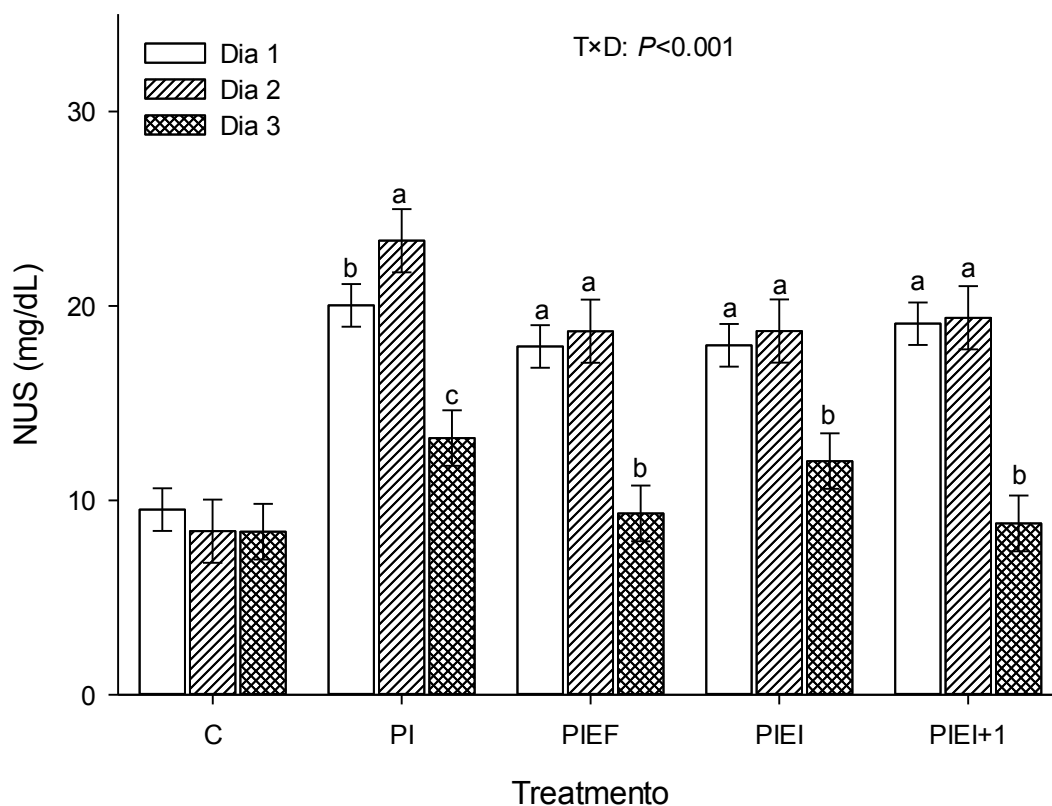


Figura 5 - Concentração média diária de nitrogênio ureico no soro (NUS) em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 7). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$).

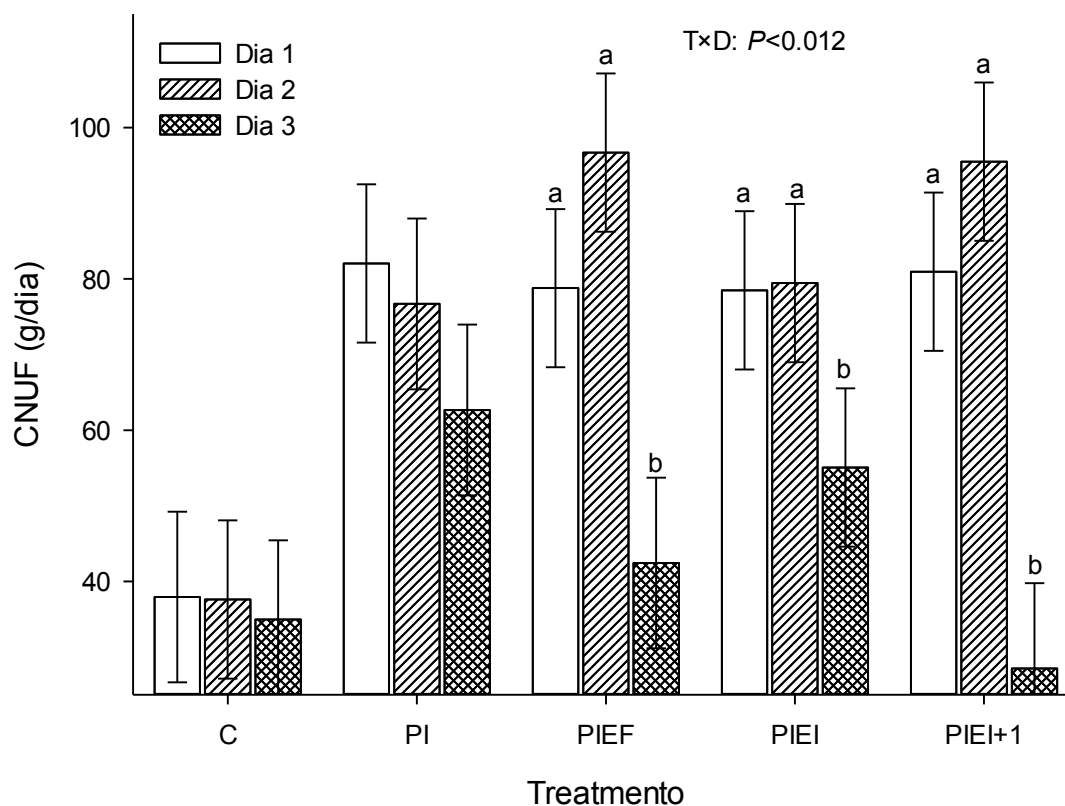


Figura 6 - Carga de nitrogênio ureico filtrada pelos rins (CNUF) em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 7). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$).

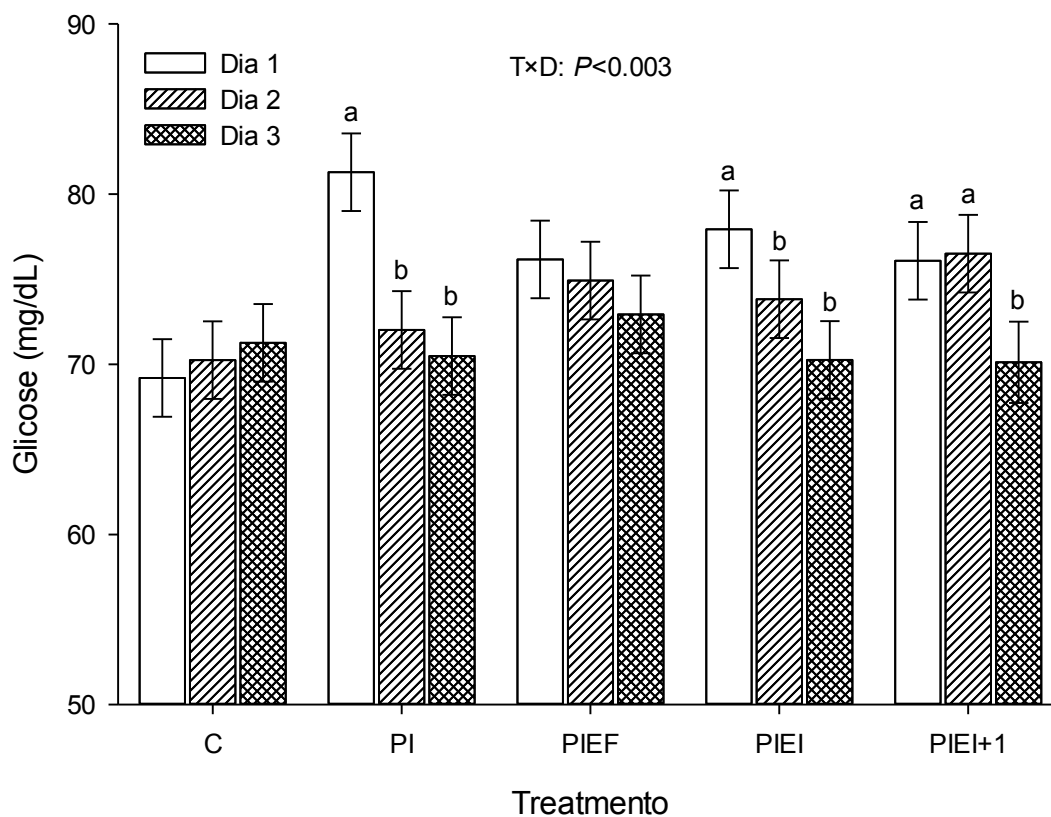


Figura 7 - Concentração sanguínea de glicose em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 8). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$).

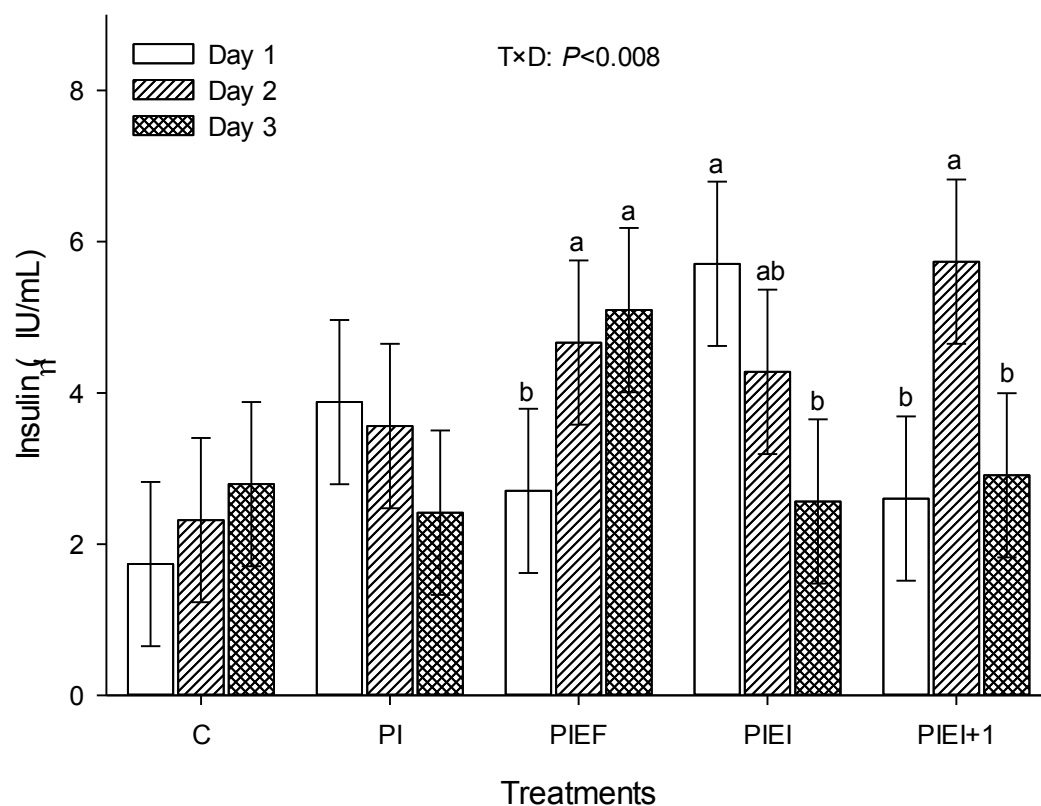


Figura 8 - Concentração sanguínea de insulina em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 8). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,05$).

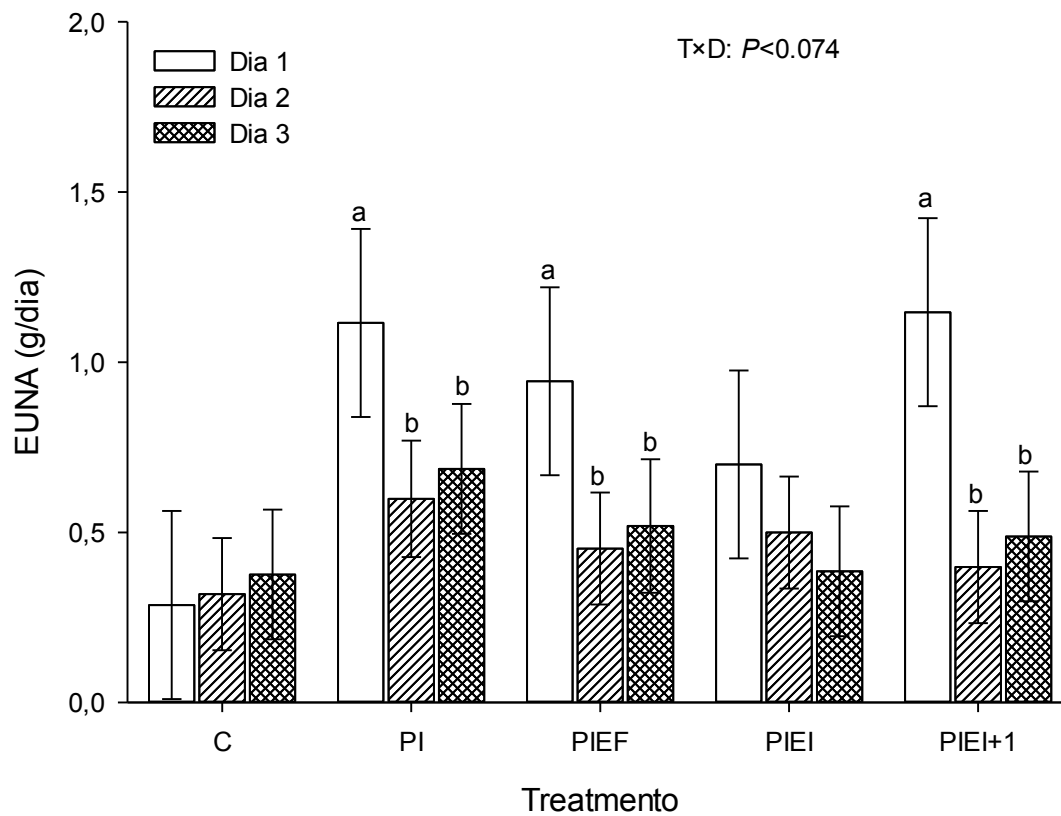


Figura 9 – Excreção urinária de nitrogênio amoniacal (EUNA) em função dos diferentes tratamentos e dos dias do ciclo de suplementação (C = controle; PI = proteína infrequente; PIEF = proteína infrequente e energia frequente; PIEI = proteína infrequente e energia infrequente; PIEI+1 = proteína infrequente e energia infrequente no dia posterior a suplementação proteica, respectivamente; para maiores detalhes, consultar a Tabela 7). Médias, dentro dos tratamentos, seguidas por letras diferentes, são diferentes ($P < 0,10$).