

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

HELENA NOGUEIRA FROTA

**SUPLEMENTAÇÃO DE LISINA E METIONINA  
EM ASSOCIAÇÃO OU NÃO COM O ÓLEO DE SOJA  
NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS**

**BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG**

**2014**

**HELENA NOGUEIRA FROTA**

**SUPLEMENTAÇÃO DE LISINA E METIONINA EM ASSOCIAÇÃO OU  
NÃO COM O ÓLEO DE SOJA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS**

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia. Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof.: Dr. Ronaldo Braga Reis

Co-orientador: Dr. Bolivar Nóbrega de Faria

**BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG**

**2014**

Frota, Helena Nogueira, 1984-

F941s Suplementação de lisina e metionina em associação ou não com o óleo de soja na dieta de vacas leiteiras / Helena Nogueira Frota. – 2014.

60 p. : il.

Orientador: Ronaldo Braga Reis

Co-orientador: Bolivar Nóbrega de Faria

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Vaca – Alimentação e rações – Teses. 2. Lisina na nutrição animal – Teses.

3. Metionina – Teses. 4. Dieta em veterinária – Teses. 5. Nutrição animal – Teses. I. Reis, Ronaldo Braga. II. Faria, Bolivar Nóbrega de. III. Universidade Federal de Minas Gerais.

Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.214 085 2

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Ronaldo Braga Reis**

---

**Breno Mourão de Sousa**

---

**Sandra Gesteira Coelho**

---

**Norberto Mario Rodriguez****Belo Horizonte, 8 de abril de 2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço esta vitória a todos que com carinho lutaram para que mais esta etapa fosse concluída. Ao meu pai pela sabedoria, confiança, dedicação e apoio em todos os momentos. À minha mãe pelo amor incondicional e companheirismo. À Quequel, Luisa, Tia Priscila, Helberth, Amanda e Alexandre por estarem sempre ao meu lado. À Vó Helena por fazer parte desta conquista. Ao Dani pela paciência, amor e companhia. A Eieia e amigos por torcerem sempre por mim. Ao Professor Ronaldo e Bolivar pelo aprendizado. A Deus, por iluminar sempre o meu caminho. E Por fim, agradeço à empresa Vaccinar pelos serviços prestados ao experimento e a todos os funcionários da Fazenda Baixadão.

---

**SUMÁRIO**

---

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Proteína e Aminoácidos.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Degradação Ruminal de Proteína e Aminoácidos.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Proteína Microbiana.....	14
<b>2.3 Exigência em Aminoácidos.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Relação entre a Exigência de Aminoácidos e o Teor de Proteína Bruta da Dieta.....	18
2.3.2 Exigências de Lisina e Metionina.....	20
<b>2.4 Proteção de Aminoácidos Essenciais.....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Relação entre a Proteção de Aminoácidos Essenciais e a Síntese de Proteína do Leite.....	24
2.4.1.1 Síntese de proteína do leite.....	25
2.4.1.2 Relação entre a suplementação com lisina e metionina protegidas e síntese de proteína do leite.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Animais e Formulação de Dieta.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Alimentação e Manejo.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Amostragem e Processos Analíticos.....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Amostragem e Análise do Leite.....	30
3.3.2 Amostragem e Análise do Sangue.....	31
3.3.3 Amostragem e Análise da Urina.....	32
3.3.4 Amostragem e Análise dos Alimentos.....	32
<b>3.4 Análise Estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>6. ANEXO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1: Composição das dietas experimentais.....	28
Tabela 2: Composição química das dietas experimentais.....	29
Tabela 3: Esquema da análise de variância para as variáveis de produção e composição do leite, consumo, urina, diferença arteriovenosa e extração de glicose do sangue.....	34
Tabela 4: Esquema da análise de variância para as concentrações dos metabólitos sanguíneos.....	34
Tabela 5: Produção e composição de leite de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja.....	36
Tabela 6: Consumo de matéria seca e eficiência alimentar de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja.....	41
Tabela 7: Derivados de purinas e relação alantóina/creatinina na urina de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja.....	43
Tabela 8: Metabólitos do sangue em dois diferentes tempos de coleta em vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja.....	45
Tabela 9: Diferença arteriovenosa e extração de glicose na glândula mamária de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja.....	47

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a suplementação de lisina e metionina em associação ou não ao óleo de soja na dieta de vacas leiteiras e seus efeitos sobre a produção e a composição do leite.

Doze vacas holandesas foram distribuídas em quadrado latino 4x4, com quatro períodos experimentais, consecutivos, de 21 dias cada. As dietas experimentais foram O+LM (dieta acrescida de óleo de soja, lisina e metionina misturados na dieta total), OLM (dieta com o complexo óleo de soja/lisina e metionina fornecido separadamente da dieta total), OS (dieta acrescida de óleo de soja fornecido separadamente da dieta total) e LM (dieta acrescida de lisina e metionina fornecidos separadamente da dieta total).

A produção de leite, de proteína e de gordura não foram afetadas pela adição de lisina e metionina associados ou não com óleo de soja. O percentual de gordura do leite, a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e a produção de leite corrigida para sólidos totais reduziram com a adição de óleo de soja na dieta. O percentual de proteína aumentou 0,14% ( $P \leq 0,05$ ) com a adição de óleo na presença de lisina e metionina na dieta. A excreção de derivados de purina reduziu com a adição de óleo na presença de aminoácido em 1,47 mmol/l ( $P \leq 0,05$ ). A diferença arteriovenosa de glicose diferiu em 2,58 mg/dl ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos OS e LM.

Os resultados sugerem efeito protetor do complexo óleo/lisina e metionina da degradação ruminal na condição experimental proposta.

Palavras-chave: Lisina, metionina, complexo óleo de soja/lisina e metionina.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of lysine and methionine supplementation with or without soybean oil in the diet of dairy cows on milk production and composition.

Twelve Holstein cows were randomly distributed in a 4x4 latin square in four consecutive experimental periods of 21 days each. The experimental diets were O+LM (diet with soybean oil, lysine and methionine added in the total mixed ration), OLM (diet with complex soybean oil/ lysine and methionine provided as top dressed), OS (diet with soybean oil provided as top dressed) and LM (diet with lysine and methionine provided as top dressed).

The milk production, milk protein and milk fat production were not affected by the addition of lysine and methionine in association or not with soybean oil in the diet. The milk fat percentage, 3.5% fat-corrected milk and solids corrected milk were reduced with increasing soybean oil in the diet. The milk protein percentage increased in 0.14% ( $P \leq 0.05$ ) when soybean oil was added to the diet in presence of the lysine and methionine. Excretion of purine derivatives were reduced by the addition of soybean oil in the presence of amino acids by 1.47 mmol/l ( $P \leq 0.05$ ). The blood glucose concentration difference between coccygeal and mammary vein showed 2.58 mg/dl reduction for OS compared to LM ( $P \leq 0.05$ ).

The results suggest protection effect of oil/lysine and methionine complex from the rumen degradation in this experimental condition.

Key-words: Lysine, methionine, soybean oil/lysine e methionine complex.

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio do leite no Brasil vem sofrendo grandes transformações nos últimos anos e tem-se observado grande esforço, por parte do governo, empresas e produtores em proporcionar melhor qualidade do leite produzido. A indústria de produtos lácteos tem demonstrado grande interesse não só no volume, mas também na composição do leite, visando sempre o maior rendimento das matérias primas. Dessa forma, programas de pagamento por qualidade de leite vêm se ajustando ao mercado, sendo a proteína, o item mais valorizado. Esses programas de pagamento receberam maior atenção no Brasil após a criação do Conselho Nacional de Qualidade do Leite (Madalena, 2000).

Vários fatores como a genética, saúde das vacas, ambiente, estágio de lactação e dieta podem influenciar a produção e o percentual de proteína do leite. No entanto, a nutrição, em curto prazo, é a principal ferramenta para tentar modular a composição do leite.

O fornecimento de proteína em quantidade e com qualidade adequada na dieta de ruminantes foi, por muito tempo considerado pouco importante para os nutricionistas de vacas de leite, uma vez que a proteína sintetizada pelos micro-organismos ruminais possui excelente qualidade. A proteína microbiana é produzida em quantidade suficiente para suprir parte das necessidades proteicas do ruminante. Segundo Virtanen (1966), pesquisas conduzidas nos anos 60 mostraram que o rúmen foi capaz de suprir toda a proteína necessária para a produção de até 4500 kg de leite/lactação de vacas recebendo ureia como única fonte de nitrogênio.

Como a quantidade de leite produzida por vaca está aumentando, a dificuldade em encontrar o requisito de nutrientes específicos também aumenta consideravelmente. Assim, a preocupação com a qualidade da proteína não degradável no rúmen ou proteína que escapa da fermentação ruminal com disponibilidade de aminoácidos pós ruminal também aumenta.

Para otimizar a produção e a composição do leite, os requisitos do animal devem ser determinados e alcançados com o balanceamento detalhado e fornecimento correto da dieta. A fonte e a qualidade da proteína não degradável no rúmen e dos aminoácidos estão se tornando tão importantes quanto à quantidade de alimento a ser ingerido pelo animal (Broderick *et al.*, 2008).

Muitos esforços têm sido concentrados em aumentar a quantidade de aminoácidos disponíveis no intestino delgado de vacas leiteiras de alta produção, para permitir maior produção de leite e, conseqüentemente, aumento da eficiência de utilização e redução da excreção de nitrogênio para o ambiente.

Há muitos anos é conhecido que os animais requerem dez diferentes aminoácidos essenciais em suas dietas. Entre eles, destacam-se a lisina e a metionina como os principais limitantes para a produção e síntese de proteína do leite de vacas de alta produção.

Uma das maneiras de aumentar o conteúdo de proteína do leite é aumentando a quantidade de energia fermentável na dieta dos animais. Atualmente, o balanceamento de aminoácidos essenciais, como lisina e metionina, tem sido utilizado como estratégia complementar ou alternativa.

O fornecimento de aminoácidos essenciais em dietas de ruminantes é bastante discutido, já que os micro-organismos presentes no rúmen, retículo e omaso degradam parcialmente os ingredientes da dieta e os reutilizam para seu crescimento. Sendo assim, os nutrientes entregues para absorção diferem daqueles presentes na dieta (Lapierre *et al.*, 2006). Além disso, os aminoácidos livres são rapidamente degradados no ambiente ruminal (Rogers *et al.*, 1987). O que não possibilita que a simples adição de um aminoácido na dieta seja opção eficiente para aumentar o fluxo de aminoácidos para o duodeno (Lapierre *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de lisina e metionina, em associação ou não com o óleo de soja, na dieta de vacas leiteiras e seus efeitos sobre a produção e composição do leite.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

As fontes de proteína e aminoácidos adicionadas na dieta de ruminantes precisam ter a composição e o mecanismo de degradação conhecidos para que sejam utilizadas com máxima eficiência. Proteínas e aminoácidos degradados e incorporados pela microbiota ruminal originam a proteína microbiana, que compreende a maior parte da proteína metabolizável disponível no intestino delgado dos ruminantes. O conhecimento da quantidade e do perfil de aminoácidos que chegam ao intestino delgado é importante,

principalmente quando se pretende alta produção de leite, já que a exigência desses animais é por aminoácidos e não por proteína.

O fornecimento adequado de aminoácidos permite reduzir o percentual de proteína bruta da dieta. Portanto, os aminoácidos incorporados à dieta devem ser protegidos da degradação ruminal para estarem disponíveis em quantidade e qualidade suficiente no intestino delgado e permitirem maior produção e síntese de proteína do leite.

Para suprir as exigências de aminoácidos do animal é necessário conhecer as proteínas e os aminoácidos disponíveis nos alimentos fornecidos na dieta.

## **2.1 Proteínas e Aminoácidos**

As proteínas são compostas de unidades formadoras, os aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Apesar de ocorrerem na natureza aproximadamente trezentos aminoácidos distintos, apenas vinte estão presentes nas proteínas de micro-organismos, plantas e animais. Esses vinte aminoácidos são requeridos principalmente para a síntese de proteínas, podendo também ser utilizados como substratos glicogênicos e/ou cetogênicos. Além da síntese de glicose e ácidos graxos, os aminoácidos podem ser oxidados para a produção de energia (Santos, 2006).

Na nutrição de ruminantes os aminoácidos são classificados como aminoácidos essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais não são sintetizados pelo organismo do animal ou são sintetizados em quantidades insuficientes para suprir as exigências do mesmo. Dez aminoácidos são considerados essenciais para ruminantes: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Alves, 2004).

Os aminoácidos não essenciais são aqueles que podem ser sintetizados pelo tecido animal a partir de intermediários do metabolismo, sendo os grupamentos amino provenientes de aminoácidos excedentes. Dessa forma, esses aminoácidos podem ser sintetizados também a partir de outros não essenciais ou mesmo de aminoácidos essenciais, quando necessário (Alves, 2004).

Conhecer a constituição e a cinética de degradação das proteínas e dos aminoácidos dos alimentos se torna essencial para adequar a dieta e suprir as exigências do animal.

## 2.2 Degradação Ruminal de Proteína e Aminoácidos

A proteína bruta contida nos alimentos dos ruminantes é composta por fração de proteína degradável (PDR) e de não degradável no rúmen (PNDR) (NRC, 2001). No rúmen, as proteínas da dieta são hidrolisadas através da ação de enzimas secretadas pelos micro-organismos ruminais em peptídeos e aminoácidos. Espécies de *Bacteroides*, *Butyrivibrio* e *Selenomonas* parecem ser as mais potentes bactérias proteolíticas no rúmen. Os aminoácidos liberados a partir da degradação da proteína da dieta são incorporados à proteína microbiana ou podem também serem transformados em amônia e esqueletos carbônicos a partir da deaminação. As bactérias com maior atividade de deaminação parecem ser *Selenomonas ruminantium*, *Prevotella ruminicola*, *Megasphaera elsdenii* e algumas cepas de *Butyrivibrio fibrosolvens* (Chalupa, 1974).

Os micro-organismos ruminais utilizam peptídeos, aminoácidos e amônia para a síntese de proteína microbiana e multiplicação celular (Santos, 2006). A amônia produzida no rúmen a partir da deaminação é utilizada como fonte de nitrogênio primário para o crescimento bacteriano e pode ser utilizada para a síntese de aminoácidos (Chalupa, 1974). A amônia não utilizada é difundida para fora da célula e é absorvida através da parede ruminal para ser convertida em ureia pelo fígado (Leonardi, 2001).

Os protozoários representam considerável porção da massa microbiana ruminal e são ativos na degradação de proteína, mesmo sendo menos numerosos. Na digestão da proteína ocorre liberação de peptídeos e estes são degradados a aminoácidos livres que são então incorporados na proteína dos protozoários. Apesar de deaminarem os aminoácidos, os protozoários são incapazes de utilizar a amônia para a síntese de novos aminoácidos. A contribuição dos fungos para a degradação de proteínas é considerada insignificante em razão da sua população pequena no rúmen (Santos, 2006).

Apesar da capacidade proteolítica dos micro-organismos ruminais, quantidades de proteína ingerida são resistentes à degradação e escapam do rúmen. A quantificação de proteína dietética degradada no rúmen é complicada devido à dificuldade de distinguir entre proteína microbiana e dietética no rúmen, abomaso ou digesta intestinal (Chalupa, 1974). Além disso, a quantidade de proteína e aminoácidos que escapam da degradação ruminal varia grandemente entre diferentes alimentos, dependendo da sua solubilidade e da sua taxa de passagem para o intestino delgado (Kamalak *et al.*, 2005).

Alguns fatores contribuem diferentemente na aparente degradação ruminal das proteínas, sendo os mais importantes a composição física e química da proteína bruta, a atividade proteolítica microbiana, o acesso microbiano à proteína, o pH ruminal, o processamento do alimento e a temperatura ambiente (Santos, 2006).

Fatores conhecidos que influenciam o tempo de retenção da proteína no rúmen incluem a quantidade de alimento ingerido, a gravidade específica, o tamanho de partícula da dieta, a relação concentrado e volumoso e a taxa de degradação ruminal (Balch e Campling, 1965, citado por Chalupa, 1974).

Quando a velocidade de degradação ruminal da proteína excede a velocidade de utilização dos compostos nitrogenados para a síntese microbiana, passa a existir excesso de amônia produzida no rúmen que poderá ser perdida via urina na forma de ureia (Broderick, 2003). A baixa concentração de aminoácidos livres no rúmen pode sugerir sua rápida utilização (Chalupa, 1974). Os peptídeos e aminoácidos provenientes da degradação ruminal da proteína e não incorporados nas células microbianas podem seguir para o duodeno e serem absorvidos pelos ruminantes (Santos, 2006). As proteínas incorporadas às células microbianas originam a proteína microbiana que supre parte da exigência proteica do ruminante.

### 2.2.1 Proteína Microbiana

A proteína microbiana chega ao intestino do ruminante juntamente com a proteína dietética não degradada no rúmen e se torna fonte de aminoácidos para manutenção, crescimento e produção de leite (Leonardi, 2001). Entre 50 e 90% da proteína microbiana que passa para o duodeno é de origem bacteriana (Santos, 2006).

A síntese de proteína microbiana é regulada pela quantidade de matéria orgânica fermentada no rúmen, desde que a concentração de amônia e elementos minerais não sejam limitantes (Kaufman e Luppig, 1982, citado por Kamalak *et al.*, 2005). A qualidade da proteína microbiana pode ser estimada com base no seu perfil em aminoácidos essenciais. A proteína microbiana é equilibrada na maioria dos aminoácidos essenciais em relação à proteína do leite ou do tecido muscular (Mabjeesh *et al.*, 1997).

Sendo assim, otimizar a síntese de proteína microbiana no rúmen torna-se importante, pois representa uso eficiente da PDR, menor perda de amônia ruminal, menor

excreção de ureia, menor necessidade de PNDR na dieta e maior fluxo de proteína metabolizável com melhor perfil de aminoácidos essenciais para o intestino (NRC, 2001). A proteína microbiana é a principal fonte de proteína metabolizável para ruminantes e pode representar de 45 a 55% da proteína metabolizável no intestino de vacas de alta produção e mais de 65% em bovinos mantidos exclusivamente em pastagens. A PNDR é a segunda fonte proteica para os ruminantes, seguida da proteína endógena (Santos, 2006).

A proteína metabolizável é representada pelo total de aminoácidos fornecidos pela proteína microbiana sintetizada no rúmen, PNDR, aminoácidos protegidos e proteínas das secreções endógenas (Chalupa, 1974).

A mensuração do fornecimento de proteínas para ruminantes é feita a partir do fluxo de proteína que chega ao intestino delgado. Essa mensuração pode ser realizada através de cânula localizada no duodeno proximal, com o objetivo de obter amostras representativas e estimativa do fluxo de matéria seca (Harmon e Richards, 1997). O fluxo duodenal de proteína bruta engloba as três frações principais da proteína metabolizável. A contribuição de cada fração da proteína metabolizável no fluxo total é diretamente relacionada à composição da dieta e à ingestão de matéria seca, e varia grandemente com a fração da proteína microbiana, uma vez que fornece a maioria das proteínas (Clark *et al.*, 1992).

Os aminoácidos absorvidos a partir da PNDR somado aos aminoácidos derivados da proteína microbiana podem ser considerados a fonte disponível de aminoácidos para o animal. A fração endógena é constituída principalmente pelos aminoácidos reciclados absorvidos, que anteriormente foram usados na construção das proteínas do corpo, e que retornaram ao lúmen do intestino antes do duodeno. As proteínas endógenas originam-se de várias fontes, incluindo mucoproteínas, saliva, desprendimento das células epiteliais e secreção de enzimas dentro do abomaso (Tamminga *et al.*, 1995, citado por Lapierre *et al.*, 2006).

O NRC (2001) adotou o valor médio de 1,9 g de nitrogênio/kg de matéria seca ingerida para determinar a contribuição endógena do fluxo duodenal. Esse valor é baseado nos dados obtidos em estudos usando animais recebendo somente infusões intragastricas de ácidos graxos voláteis (Orskov *et al.*, 1986) ou dietas com baixo teor de proteína e com baixa degradabilidade (Hart e Leibholz, 1990; Hannah *et al.*, 1991).

Recentes estudos sugerem que a contribuição endógena pode representar entre 15 e 20% do fluxo de nitrogênio duodenal e, portanto, não pode ser ignorado. A contribuição endógena não representa o fornecimento líquido para o animal, sendo assim, necessita ser removido do fluxo total da proteína duodenal para ser determinado o

fornecimento líquido duodenal vindo da proteína bruta microbiana e da PNDR (Lapierre *et al.*, 2006).

Desde a década de 1980 as estimativas das exigências proteicas são determinadas pelo método fatorial, que consiste em dividir a exigência proteica do animal em exigências de manutenção e de produção. As exigências de manutenção se baseiam no nitrogênio endógeno urinário, nitrogênio de descamação e nitrogênio metabólico fecal. As exigências de produção se baseiam no nitrogênio necessário para o feto, crescimento e lactação. Os sistemas das estimativas de exigências em proteína bruta evoluíram para os atuais modelos de proteína metabolizável, que permitem adequar as exigências da população microbiana ruminal em compostos nitrogenados, bem como as do ruminante em proteína metabolizável (Santos e Greco, 2007).

A precisão dos atuais sistemas, baseados nas exigências em proteína metabolizável, é altamente dependente de informações quanto às frações degradáveis e não degradáveis dos alimentos. O suprimento de quantidades adequadas de PNDR e PDR é fundamental para otimizar e complementar a produção de proteína microbiana e, assim, suprir as exigências em proteína metabolizável dos animais (Santos e Greco, 2007). Além disso, os sistemas de proteína metabolizável têm estimulado e permitido avanços no conhecimento das exigências em aminoácidos dos ruminantes e no balanceamento do perfil de aminoácidos essenciais da proteína metabolizável. O valor nutricional da proteína metabolizável para ruminantes depende, principalmente, do seu perfil em aminoácidos essenciais (NRC, 2001).

O reconhecimento e o entendimento da complexa interação do metabolismo intestinal dos aminoácidos possibilitará o desenvolvimento de melhor modelo para formulação de dietas que reduzam o teor de proteína bruta, e ao mesmo tempo atendam os requisitos de aminoácidos. Essa abordagem melhorará a eficiência da conversão do nitrogênio da dieta em proteína do leite (Lapierre *et al.*, 2006).

A transferência do aminoácido presente na dieta para o leite não é constante (Doepel *et al.*, 2004). Com o aumento do fornecimento de proteína, embora mais aminoácidos sejam transferidos para o leite, existe também notável aumento no catabolismo. O aumento na oxidação dos aminoácidos pode ocorrer em muitos tecidos do corpo. Por exemplo, o catabolismo intestinal da isoleucina, leucina, lisina, e valina ocorre quando estes aminoácidos estão elevados, assim como, a remoção hepática de histidina, metionina, fenilalanina e treonina (Lapierre *et al.*, 2005) e a captação mamária de isoleucina, leucina, lisina e valina também ocorrem quando estes estiverem aumentados (Guinard e Rulquin, 1994; Raggio *et al.*, 2004).



A partição de aminoácidos fornecidos entre a produção de proteína do leite e o catabolismo determina a eficiência de conversão, que é alterada quando a vaca alcança sua máxima produção (Lapierre *et al.*, 2006). Para a obtenção de melhor eficiência de conversão é necessário a determinação da exigência em aminoácidos pelo animal.

### **2.3 Exigência em Aminoácidos**

A exigência metabólica do ruminante não é por proteína bruta, nitrogênio não proteico, PDR ou PNDR, mas sim por aminoácidos (Alves, 2004). Já que as células dos tecidos dos ruminantes necessitam de aminoácidos para seu metabolismo. Os aminoácidos devem estar disponíveis para os tecidos em quantidades e proporções adequadas para eficiência máxima (Santos, 2006).

Atualmente, a literatura que determina o requisito de aminoácidos de vacas leiteiras é extremamente limitada (Socha *et al.*, 2008). Mas sabe-se que aminoácidos presentes em quantidade inadequada no duodeno para subsequente absorção podem limitar a produção de leite e de seus componentes, principalmente, da proteína (Clark, 1975). Desta forma, o principal benefício em melhorar o balanço de aminoácidos na digesta duodenal é elevar a síntese de proteína do leite (Socha *et al.*, 2008).

Várias técnicas têm sido usadas para determinar requisito de aminoácidos, como a comparação do padrão de aminoácido microbiano e da proteína do leite, mudanças no conteúdo de aminoácidos do sangue após a infusão de caseína e diferenças arteriovenosas na glândula mamária. A conclusão desses estudos indica que a metionina sempre é incluída no grupo dos principais aminoácidos limitantes, frequentemente seguido pela lisina, histidina, fenilalanina e aminoácidos de cadeia ramificada (Kaufman e Luppig, 1982, citado por Kamalak *et al.*, 2005).

Para o avanço nas pesquisas em nutrição de aminoácidos é necessário que a predição acurada da composição de aminoácidos essenciais na proteína duodenal seja determinada. O conteúdo da proteína metabolizável e o fluxo duodenal de aminoácidos essenciais digestíveis podem ser calculados a partir do conhecimento da composição de aminoácidos essenciais da proteína duodenal; do total do fluxo de cada aminoácido essencial predito para cada fração da proteína metabolizável; do coeficiente de digestibilidade assumido

para proteína microbiana, para a fração de PNDR e para a proteína endógena e finalmente, do conhecimento do fluxo da proteína metabolizável (NRC, 2001).

Animais com baixa taxa de crescimento e baixa produção de leite atingem o requisito ideal de aminoácidos a partir da proteína microbiana. Em algumas situações, o requisito do animal para aminoácidos não é completamente obtido com fontes normais de proteína dietética. Deficiências de aminoácidos são esperadas principalmente em animais de alto desempenho (Kamalak *et al.*, 2005).

Em vacas de alta produção, a proteína dietética que escapa do rúmen geralmente contribui entre 30 e 50% da proteína total que chega ao intestino delgado. Desta forma, o perfil de aminoácidos da proteína dietética que escapa do rúmen, frequentemente, não consegue complementar o perfil de aminoácidos da proteína microbiana para suprir o requisito de aminoácidos intestinais para as vacas de alta produção (Clark, 1975).

A otimização do balanço do total de aminoácidos na proteína metabolizável é fundamental para maximizar o desempenho da lactação com o mínimo de proteína na dieta. Isso possibilitará a redução da eliminação de nitrogênio urinário por unidade de leite produzido, bem como poupar energia metabólica para a produção de leite ou outras funções do corpo (Socha *et al.*, 2008).

### 2.3.1 Relação entre a Exigência de Aminoácidos e o Teor de Proteína Bruta da Dieta

O teor de aminoácidos essenciais e a proporção entre eles na proteína metabolizável determinam a eficiência de utilização dessa proteína pelo ruminante. Quando a proteína metabolizável for de alto valor biológico (rica e com perfil adequado de aminoácidos essenciais) o teor de proteína bruta da dieta pode ser reduzido, a eficiência de utilização da proteína metabolizável é otimizada, a excreção de ureia e de outros compostos nitrogenados é reduzida e o desempenho animal é maximizado (Santos, 2006).

Vacas de leite secretam cerca de 25 a 35% do nitrogênio consumido como nitrogênio do leite e quase todo o restante do nitrogênio é excretado na urina e nas fezes (Chase, 1994, citado por Leonardi *et al.*, 2003). No estudo realizado por Chen *et al.* (2011), a eficiência de utilização do nitrogênio variou entre 30,2 a 34,5% de acordo com o percentual de proteína bruta da dieta e a suplementação com metionina protegida.

Ao longo dos últimos anos, tem sido renovado o interesse em estratégias para melhorar a eficiência do uso de nitrogênio pelas vacas de leite sem reduzir a sua produtividade. O aumento da eficiência do uso de nitrogênio, ou seja, a redução da excreção do nitrogênio urinário (Broderick, 2003) pode ser alcançado reduzindo-se a quantidade de proteína bruta fornecida na dieta dos animais. Tal redução, portanto, deve ser feita cautelosamente e pode ser realizada de forma mais segura se a suplementação adequada de aminoácidos limitantes for realizada (Lapierre *et al.*, 2006).

Segundo Broderick (2003), a diminuição do percentual da proteína bruta da dieta de 18,4% para 15,1% reduziu linearmente o nitrogênio urinário expresso em gramas por dia ou como porcentagem de nitrogênio ingerido. No entanto, a redução do percentual de proteína bruta da dieta também reduziu a produção de leite em 1,1 kg/dia e a produção de proteína do leite em aproximadamente 30 g/dia.

De acordo com Leonardi *et al.* (2003), o balanço das dietas para aminoácidos limitantes poderá melhorar a resposta em produção de leite nas dietas com baixo percentual de proteína, sem aumentar a perda de nitrogênio na urina. Dinn *et al.* (1998) mostraram que dietas com 16,7 ou 15,3% de proteína bruta suplementada com metionina e lisina protegidas permitiram a mesma produção de leite e proteína do leite que dietas com 18,3% de proteína bruta com ou sem a adição de aminoácidos, e ainda reduziu a excreção de nitrogênio na urina.

Leonardi *et al.* (2003) trabalharam com dois diferentes níveis de proteína bruta na dieta (16,1 e 18,8%) e com o fornecimento ou não de metionina. Nenhuma interação entre o percentual de proteína bruta e a suplementação com metionina foi detectada em qualquer dos parâmetros mensurados. Este resultado contradiz a hipótese que dietas com baixo teor de proteína bruta necessitam de suplementação de metionina. Nenhuma diferença foi observada entre dietas com 16,1 versus 18,8% de proteína bruta sobre a produção e proteína do leite, sugerindo que dietas com menor percentual de proteína reduzem a perda de nitrogênio, aumentam a eficiência da utilização da proteína e mantém a produção de leite e produção de proteína do leite. A adição de metionina aumentou o percentual de proteína do leite em ambos os teores de proteína sem afetar a produção de proteína do leite.

A literatura revisada indica que é possível diminuir a proteína bruta da dieta e reduzir a perda de nitrogênio na urina sem prejudicar a produção e composição do leite (Leonardi *et al.*, 2003; Broderick *et al.*, 2008; Broderick *et al.*, 2009). Uma vez que, a exigência em aminoácidos essenciais, principalmente lisina e metionina, seja atendida.

### 2.3.2 Exigências de Lisina e Metionina

Os aminoácidos lisina e metionina foram identificados como potencialmente limitantes para a síntese de proteína e produção de leite, particularmente quando são utilizadas dietas a base de milho (Schwab *et al.*, 1976; Schwab and Bozak, 1988; Donkin *et al.*, 1989). Além da sua importância na síntese do leite, a metionina também é considerada aminoácido limitante para o crescimento microbiano e fermentação ruminal (Sancanari *et al.*, 2001).

Desta forma, a suplementação de lisina e metionina pós ruminal tem sido extensivamente estudada e resultado em melhores produções de leite (NRC, 2001). Pesquisas mostram que o teor de proteína do leite é a resposta de produção mais sensível à alteração no fornecimento intestinal de lisina e metionina da dieta (Rulquin *et al.*, 1993).

Metionina e lisina podem ser o primeiro, o segundo ou os aminoácidos co-limitantes, dependendo da fonte de PNDR na dieta. Para vacas lactantes, a lisina foi considerada o primeiro aminoácido limitante quando o milho foi a principal fonte de PNDR (King *et al.*, 1991; Polan *et al.*, 1991). Já a metionina foi reconhecida como primeiro aminoácido limitante em dietas a base de soja ou em dietas suplementadas com proteína de origem animal (Casper e Schingoethe, 1988; Armentano *et al.*, 1997; Rulquin e Delaby, 1997). A concentração de lisina na dieta pode restringir a resposta à inclusão de metionina (Munneke *et al.*, 1991).

Armentano *et al.* (1997) mostraram que em dieta a base de soja, a adição de lisina e metionina não aumentou a produção de proteína do leite quando comparado com a suplementação somente da metionina. Esses dados mostram que quando a soja é a fonte principal de proteína da dieta, metionina passa a ser o primeiro aminoácido limitante. E quando parte da soja é substituída por proteína de milho metionina e lisina tornam-se co-limitantes.

De acordo com o NRC (2001), o requisito de metionina e lisina digestível para maximizar o uso da proteína metabolizável para a síntese de proteína é de 2,4% e 7,2% na proteína metabolizável, respectivamente, ou seja, a relação entre esses aminoácidos deve ser de 3:1. Esta relação foi obtida levando-se em consideração as proporções de lisina e metionina observadas no tecido muscular e no leite. Esse modelo utilizado pelo NRC (2001) foi primeiramente desenvolvido por Rulquin *et al.* (1993), onde os requisitos determinados foram de 7,3% e 2,5% na proteína digestível intestinal, para lisina e metionina, respectivamente. A

expressão do requisito de lisina e metionina é, portanto, em percentual de proteína metabolizável e não como g/dia(NRC, 2001).

Pisulewski *et al.* (1996) e Socha *et al.* (2008) indicaram que quando o fornecimento de lisina é presumidamente adequado (7,0% ou mais do total de aminoácidos), a metionina deve contribuir com 2,4% ou mais do total de aminoácidos na digesta duodenal para que a síntese de proteína do leite em vacas no início da lactação seja maximizada. Socha *et al.* (2008) concluiu que, a adição de metionina não afetou ou diminuiu o teor e a produção de proteína do leite quando, as concentrações preditas de lisina e metionina na digesta duodenal foram abaixo de 6,5% e acima de 2,3%, respectivamente, da proteína verdadeira digerida no intestino delgado. Para aumentar o teor de aminoácidos na proteína verdadeira digerida no intestino é necessário reduzir a degradação ruminal através da proteção dos aminoácidos essenciais fornecidos na dieta.

#### **2.4 Proteção de Aminoácidos Essenciais**

Na nutrição de não ruminantes é considerado que o fornecimento e o requisito de aminoácidos devem ser expressos para cada aminoácido individualmente ao invés do total de proteína. Em não ruminantes, o ingerido representa o fornecido e qualquer deficiência pode ser corrigida com a simples adição de qualquer aminoácido individualmente na dieta (Lapierre *et al.*, 2006).

Os ruminantes são diferentes, pois a capacidade de usar forragens baseia-se na presença de micro-organismos no rúmen, retículo e omaso. Sendo assim, durante a passagem do alimento pelo retículo-rúmen os ingredientes da dieta são parcialmente degradados e reutilizados para o crescimento microbiano. Portanto, os nutrientes entregues para absorção diferem daqueles presentes na dieta, ou seja, o conhecimento dos nutrientes fornecidos aos ruminantes é dificultado (Lapierre *et al.*, 2006). Além disso, os aminoácidos livres são rapidamente degradados no ambiente ruminal (Rogers *et al.*, 1987). O que não possibilita que a simples adição de um aminoácido na dieta seja uma eficiente opção para aumentar o fluxo de aminoácidos para o duodeno (Lapierre *et al.*, 2006).

Como aproximadamente 60% dos aminoácidos são absorvidos no jejuno e o restante no íleo, para que aminoácidos limitantes cheguem no duodeno eles têm sido infundidos diretamente no duodeno ou protegidos da degradação ruminal (Leonardi,

2001). Métodos para proteger esses aminoácidos da degradação bacteriana são necessários (Rogers *et al.*, 1987) para que resultem em maior aproveitamento para a síntese de proteína nos tecidos (Socha *et al.*, 2005; Lapierre *et al.*, 2006). A efetividade do uso destes aminoácidos depende da otimização do seu fornecimento e do seu perfil que chegam ao intestino delgado (Kaufman e Lapping, 1982, citado por Kamalak *et al.*, 2005).

O conceito de proteção de proteína da degradação ruminal tem como principal objetivo intensificar o fornecimento de aminoácidos essenciais para a produção animal e reduzir perdas de nitrogênio na urina (Annison, 1981, citado por Kamalak *et al.*, 2005). É possível proteger proteínas usando alguns procedimentos, como o tratamento com calor, tratamento/modificação química, inibição da atividade proteolítica e identificação de proteínas naturalmente protegidas. O óleo parece inibir a degradação da proteína no rúmen e, assim, eleva a quantidade de aminoácidos dietéticos para absorção pós ruminal (Jenkins e Fatouhi, 1990). O uso dessas técnicas em comparação à fonte usual de proteína dietética melhora o fornecimento de aminoácidos sem aumento na produção de amônia, resultando em melhor desempenho animal (Kaufman e Lapping, 1982, citado por Kamalak *et al.*, 2005).

Os aminoácidos podem ser revestidos como forma de proteção contra os micro-organismos ou estarem presentes em formas químicas que são mais resistentes a degradação ruminal ou são mais rapidamente absorvidos através da parede ruminal (hidróxi-análogos) (Lapierre *et al.*, 2006).

Metionina e outros aminoácidos podem ser protegidos da degradação bacteriana no rúmen por métodos mecânicos ou químicos. Os primeiros métodos desenvolvidos para evitar a fermentação digestiva dos aminoácidos foram manipulação estrutural para produzir aminoácidos análogos e proteção com materiais resistentes (Chalupa *et al.*, 1996). Para a proteção física utilizou-se compostos poliméricos, proteína formolizada, gordura, misturas de gordura e cálcio, misturas de gordura e proteína, e com sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (Chalupa and Sniffen, 1991).

Os principais métodos utilizados pela indústria para proteger os aminoácidos são a produção de aminoácidos análogos (metionina hidróxi-análoga; hidroximetil DLmetionina cálcica; monoplus di-N-hidroximetil-L-lisina cálcica, etc) que são mais estáveis nas condições de rúmen. Também, o recobrimento com gordura (misturas de gorduras e proteínas, proteínas tratadas com formoldeído, sabões cálcicos de ácidos graxos de cadeia longa) e o encapsulamento com compostos poliméricos resistentes à degradação ruminal mas que são hidrolisados no abomaso têm sido estudados (Alves, 2004).

A utilização dessas técnicas aumenta a proteína metabolizável principalmente quando vacas de alta produção encontram-se no início da lactação (NRC, 2001).

Para verificar e quantificar o efeito da suplementação de aminoácidos com diferentes fontes de proteína, a interação entre a fonte de proteína e a suplementação de aminoácido deve ser considerada. A interação entre suplementação de aminoácidos e forragem da dieta, estágio de lactação e método pelo qual os aminoácidos foram suplementados também devem ser observados. Já que todas essas formas irão impactar na quantidade de aminoácidos absorvidos no intestino delgado (Leonardi, 2001). Possivelmente, devido a todos esses fatores considerados, os resultados entre experimentos não são consistentes. Outra razão para essa inconsistência de resultados pode estar relacionado ao fato de alguns aminoácidos serem mais deficientes que os em teste (Robinson *et al.*, 1999).

Alguns estudos utilizando somente a suplementação com metionina protegida apresentaram aumento no percentual de proteína do leite (Chilliard e Doreau, 1997; Rulquin e Delaby, 1997; Leonardi *et al.*, 2003; Berthiaume *et al.*, 2006). Já em outros estudos a proteína não foi afetada (Papas *et al.*, 1984; Krober *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2008). Poucos estudos mostraram ainda, aumento na porcentagem de proteína do leite e significativo aumento na produção de proteína do leite como resposta a ingestão de metionina protegida (Armentano *et al.*, 1997; Rulquin e Delaby, 1997; Samuelson *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 2006).

Diversos estudos também têm relatado aumento na porcentagem de gordura do leite com a suplementação de metionina protegida (Overton *et al.*, 1998; Samuelson *et al.*, 2001). Chilliard e Doreau (1997) não encontraram alteração no teor de gordura do leite. Overton *et al.* (1996) encontraram aumento na produção de gordura, enquanto outros encontraram declínio (Socha *et al.*, 2005).

Na maioria dos estudos a produção de leite não foi alterada em resposta a metionina protegida (Chilliard e Doreau, 1997; Benefield *et al.*, 2009). Alguns estudos relataram aumento na produção de leite (Samuelson *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 2006) e outros relataram diminuição significativa na produção de leite (Rulquine Delaby, 1997).

Chen *et al.* (2011) avaliaram o efeito de fontes distintas de metionina (metionina análoga HMBi e metionina protegida da degradação ruminal por métodos físicos RPM) e observaram produção de leite e utilização do nitrogênio semelhantes entre os tratamentos.

Estudo realizado por Leonardi (2001) mostrou que a adição de lisina e metionina resultou em aumento de produção e percentual de proteína do leite quando

comparado ao grupo controle. Metionina e lisina aumentaram 0,08 unidades percentuais e 40 g/dia de proteína do leite, comparado ao grupo controle. Nenhum efeito da suplementação dos aminoácidos foi observado sobre a produção de leite e de gordura e no percentual de gordura do leite. Isso pode ser devido à menor quantidade de metionina suplementada junto com a lisina. O aumento na produção de proteína do leite com a suplementação de lisina e metionina foi maior do que o aumento com apenas a suplementação de metionina. Isso mostra que a lisina pode ser o primeiro aminoácido limitante e a metionina o segundo ou metionina e lisina possam ser co-limitantes. Também pode ser que a lisina seja o segundo aminoácido limitante.

Rogers *et al.* (1987) forneceram lisina e metionina encapsuladas e observaram aumento na produção de proteína do leite, percentual de gordura e sólidos totais. Ainda de acordo com os pesquisadores, o fornecimento da lisina aparentemente melhora a utilização de metionina pelo organismo animal, uma vez que vacas alimentadas com lisina apresentaram menor concentração plasmática de metionina.

Socha *et al.* (2005) também forneceram lisina e metionina protegidas em dietas com percentual de proteína bruta variável (16 e 18,5%). Os resultados revelaram que o percentual de proteína bruta e o fornecimento de aminoácidos protegidos apresentaram respostas variadas de acordo com o estágio da lactação.

Illg *et al.* (1987) utilizaram dietas contendo DL-metionina (metionina análoga) associada ao óleo de soja e relataram aumento de produção e proteína do leite no grupo suplementado com DL-metionina protegida. Os animais que recebiam óleo de soja associado à DL-metionina aumentaram a ingestão de matéria seca quando comparados aos tratados somente com óleo de soja. Segundo o autor, esse aumento de ingestão pode ter sido parcialmente responsável pela elevação na produção de leite. O aumento do teor de proteína do leite ocorreu devido a maior disponibilidade de metionina na glândula mamária para síntese proteica.

Para entender a relação entre a suplementação de aminoácidos essenciais na dieta de ruminantes e a síntese de proteína do leite é necessário compreender o mecanismo da síntese de proteína pela glândula mamária.

#### **2.4.1 Relação entre a Proteção de Aminoácidos Essenciais e a Síntese de Proteína do Leite**



#### 2.4.1.1 Síntese de proteína do leite

O leite é um fluido composto por nutrientes sintetizados na glândula mamária a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo. Dentre estes compostos as proteínas, principalmente caseína e albumina, correspondem entre 3,2 a 3,5% dos principais componentes do leite (Bylund, 1995).

As proteínas presentes no leite são sintetizadas na glândula mamária a partir de aminoácidos retirados do sangue, exceto a albumina e as imunoglobulinas. A síntese proteica (formação de cadeias polipeptídicas) ocorre nas células secretoras sob controle do DNA. A principal fonte de energia utilizada pela glândula mamária para a síntese de proteína é a glicose. O teor de proteína no leite pode aumentar 0,015 unidades para cada megacaloria de energia líquida adicionada a dieta (DePeters e Cant, 1992).

A proteína sintetizada formada por uma cadeia inicial de 10-20 aminoácidos irá alcançar o retículo endoplasmático rugoso. Dependendo da proteína outras substâncias podem aderir a ela, como fosfato e certos tipos de açúcares. A estrutura proteica tridimensional final determinará suas funções e propriedades (Larson, 1995).

Para a formação da proteína do leite são utilizados tanto aminoácidos essenciais como não essenciais. A célula alveolar utiliza os aminoácidos disponíveis e, se necessário, os aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados para suprir a síntese de proteínas. Diferentemente dos aminoácidos não essenciais, os aminoácidos essenciais somente podem ser fornecidos através do sangue. A captação dos aminoácidos pela glândula mamária depende da sua concentração arterial, do fluxo sanguíneo e do transporte através da membrana. A captação é positivamente relacionada à concentração e fluxo sanguíneo (Leonardi, 2001). A alta porcentagem de metionina e lisina extraídas do plasma pela glândula mamária, quando comparados a outros aminoácidos, fazem destes aminoácidos os mais importantes para a síntese de proteína do leite (Rogers *et al.*, 1987).

Com isso, a síntese de proteína do leite pode ser limitada pela quantidade e perfil de aminoácidos disponíveis para a glândula mamária, em particular os aminoácidos essenciais (Clark, 1975). Se um aminoácido essencial é o substrato limitante para síntese de proteína do leite e os sistemas de transporte de aminoácidos estão operando abaixo da saturação na glândula mamária (Schingoethe *et al.*, 1988) o aumento da disponibilidade de aminoácidos limitantes deve aumentar a síntese de proteína do leite (Donkin *et al.*, 1989).

#### 2.4.1.2 Relação entre a suplementação com lisina e metionina protegidas e síntese de proteína do leite

Os principais aminoácidos considerados limitantes em nutrição de vacas de leite são metionina e/ou lisina dependendo da fonte de proteína da dieta (NRC, 2001). De acordo com Donkin *et al.* (1989), o aumento da porcentagem de proteína no leite com a suplementação de lisina e metionina protegida indica que a dieta possui quantidades limitantes de lisina e metionina ou ambos. Além disso, a maior parte dos aminoácidos que limitam a síntese de proteína do leite são grandemente dependentes da qualidade e quantidade de aminoácidos presentes na dieta (Xu *et al.*, 1998).

Pesquisas mostram que a concentração de proteína do leite é a resposta de produção mais sensível à alteração no fornecimento intestinal de lisina e metionina (NRC, 2001). O aumento no conteúdo da proteína do leite parece ocorrer primeiramente na fração de caseína em resposta à concentração de lisina e metionina na digesta duodenal (Donkin *et al.*, 1989; Chow *et al.*, 1990).

A suplementação com 16,9 g/dia de metionina aumentou a produção de proteína do leite em 13 g/dia ( $P=0,04$ ), o percentual de proteína do leite em 0,05 ( $P<0,01$ ) e a gordura do leite em 0,04 ( $P=0,03$ ). O aumento na síntese proteica do leite foi resultado do aumento da síntese de caseína pela glândula mamária (Pisulewski *et al.*, 1996; Rulquin e Delaby, 1997; Overton *et al.*, 1998). Armentano *et al.* (1997) não encontrou relação significativa entre o aumento da proteína do leite e o aumento de N caseína no total de nitrogênio do leite.

Schwab *et al.*, 2001 também sugerem que a mudança na porcentagem de proteína do leite tem sido o método mais sensível de determinar a efetividade da suplementação de metionina protegida. Embora a porcentagem de proteína possa ser importante, a produção de proteína é mais sensível à utilização de metionina, pela possibilidade de alteração na produção de leite (Patton, 2010).

Benfield *et al.* (2009) relataram que a produção de proteína do leite não foi afetada pelo fornecimento de duas fontes comerciais distintas de metionina protegida na dieta. Os autores apresentaram as seguintes justificativas para a falta de efeito: primeiro, os dados do experimento são condizentes com o NRC (2001), a metionina digestível fornecida foi mais relacionada com o percentual da proteína do leite ( $r^2 = 0,76$ ) do que com a produção de proteína do leite ( $r^2 = 0,40$ ); segundo, vacas no terço médio da lactação respondem ao

aumento do fornecimento de metionina por meio do aumento do conteúdo de proteína do leite, sem afetar a produção de proteína do leite (Socha *et al.*, 2008). Isto sugere que a síntese de proteína do leite (g/dia) é mais responsiva para o fornecimento de metionina para vacas de alta produção, no terço médio da lactação, do que para vacas no final de lactação. E, finalmente, a estratégia de formulação de aminoácidos pode interferir na produção de proteína do leite, pois focar somente no fornecimento de metionina como percentual da proteína metabolizável, sem considerar a quantidade de metionina fornecida relativa à quantidade requerida pode levar a perda na resposta real da síntese de proteína do leite.

O uso da metionina protegida tem sido prometido como um produto capaz de aumentar a porcentagem de proteína do leite (Rulquin e Delaby, 1997; Socha *et al.*, 2005), já que a maioria dos trabalhos relata resposta na produção de proteína com o aumento do fornecimento de metionina na dieta (Schwab *et al.*, 2001, Patton, 2010). No entanto, os resultados não têm sido consistentes.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e Formulação de Dieta**

O experimento foi realizado em uma propriedade particular localizada no município de Carmo da Cachoeira, sul de Minas Gerais no período de 31 de julho a 16 de outubro de 2010.

Foram utilizadas 12 vacas da raça Holandesa, sendo oito multíparas e quatro primíparas, em delineamento experimental “Quadrado Latino” 4 x 4, com três repetições. Os períodos experimentais foram de 21 dias cada, sendo que do 1º ao 14º dia foi considerado período de adaptação e do 15º ao 21º dia, período de coletas e avaliações.

A escolha dos animais foi baseada na ordem de parto, dias em lactação (DEL) e produção de leite. O primeiro quadrado foi formado por primíparas, com DEL médio de  $103 \pm 5$  dias no início do experimento, produção média de  $28,5 \pm 1$  kg de leite e o escore de condição corporal médio (ECC) 3,0 na escala de 1 a 5 (WILDMAN *et al.*, 1982). O segundo e

o terceiro quadrados foram formados por vacas multíparas, sendo o DEL, a produção de leite e o ECC médios de  $100\pm 6$  e  $99\pm 11$  dias,  $41,2\pm 1$  kg e  $34,5\pm 2$ kg e 3,0 e 3,0, respectivamente.

As dietas experimentais foram: Controle (O+LM), constituído pela dieta base (Tabela 1) acrescido de óleo de soja (250 ml), lisina (0,11 kg) e metionina (0,05 kg) adicionados, separadamente, e misturados na TMR; dieta aminoácidos complexados com óleo (OLM), constituída pela dieta base mais o complexo óleo de soja (250 ml), lisina (0,11 kg) e metionina (0,05 kg) fornecido sobre a dieta total; dieta óleo de soja (OS), constituída pela dieta base acrescida de óleo de soja (250 ml) fornecido sobre a dieta total; dieta aminoácidos (LM), constituída pela dieta base acrescida de lisina (0,11 kg) e metionina (0,05 kg) fornecidos também sobre a dieta total.

Tabela 1: Composição das dietas experimentais

Ingrediente	Dieta			
	O+LM	OLM	OS	LM
	(% MS)			
Silagem de milho	49,40	49,40	49,62	48,41
Milho moído	16,48	16,48	16,54	19,16
Farelo de soja	21,82	21,82	21,92	21,38
Polpa de citrus	6,18	6,18	6,20	6,05
Protenose	1,07	1,07	1,08	1,05
Prémix mineral vitaminicos <sup>1</sup>	2,26	2,26	2,27	2,22
Farelo de trigo	1,11	1,11	1,12	1,09
Óleo de soja	1,03	1,03	1,04	0,00
Lisina	0,45	0,45	0,00	0,44
Metionina	0,20	0,20	0,00	0,20
Ureia	0,00	0,00	0,21	0,00

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexados com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Aminoácidos.

<sup>1</sup>Prémix mineral vitaminicos: 16,0% Ca; 3,2% P; 10,6% Na; 2,0% K; 1,2% S; 5,1% Mg; 10 ppm Co; 500 ppm Cu; 1580 ppm Fe; 25 ppm I; 1000 ppm Mn; 12 ppm Se; 1800 ppm Zn; 140.000 mg/kg Vit. A; 38.000 mg/kg Vit. D; 1.000 mg/kg Vit. E; 33 mg/kg Biotina; 500mg/kg monensina.

O veículo utilizado para fornecer os constituintes adicionados na forma de *top dressed*, ou seja, fornecidos separadamente da dieta total, foi o farelo de trigo.

As dietas experimentais foram balanceadas segundo o NRC (2001), para serem isoprotéicas e isoenergéticas (Tabela 2). A silagem de milho foi o volumoso base utilizado nas dietas experimentais. Os aminoácidos lisina (Ajinomoto) e metionina (Adisseo) não eram protegidos e possuíam 99% de pureza. A quantidade de lisina e metionina fornecida na dieta foram determinadas a fim de atender a exigência ideal desses aminoácidos no percentual de proteína metabolizável, segundo o NRC (2001).

Tabela 2: Composição química das dietas experimentais

	Dieta			
	O+LM	OLM	OS	LM
IMS estimada, kg	24,3	24,3	24,2	24,8
	(% MS)			
PB	17,4	17,4	17,4	17,3
PDR	10,7	10,7	11,2	10,6
PNDR	6,7	6,7	6,1	6,8
NDT	73,0	73,0	73,0	72,0
FDN	35,6	35,6	35,8	35,7
FDA	18,6	18,6	18,7	18,3
CNF	39,2	39,2	39,0	40,2
EE	4,0	4,0	4,0	3,1
Ca	0,6	0,6	0,7	0,6
P	0,4	0,4	0,4	0,4
	(% PM)			
Aminoácidos				
Arginina	3,89	3,89	3,91	3,86
Histidina	1,50	1,50	1,52	1,49
Isoleucina	3,76	3,76	3,79	3,72
Leucina	6,59	6,59	6,63	6,55
Lisina	7,70	7,70	5,37	7,61
Metionina	2,65	2,65	1,39	2,62
Fenilalanina	4,27	4,27	4,22	4,24
Treonina	3,55	3,55	3,60	3,52
Valina	4,39	4,39	4,38	4,36

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexados com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Aminoácidos.

IMS = ingestão de matéria seca; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; PDR = proteína degradável no rúmen; PNDR = proteína não degradável no rúmen; NDT = nutrientes digestíveis totais; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDA = fibra insolúvel em detergente ácido; CNF = carboidrato não fibroso; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; Ca = cálcio; P = fósforo; PM = proteína metabolizável.

Na dieta OS, que não possuía aminoácidos, foi adicionado ureia para ser feito a correção do nível de proteína. Na dieta LM foi adicionado maior quantidade de milho para ser feito a correção do nível de energia, já que não foi adicionado óleo de soja nesta dieta.

Devido à possibilidade de parte dos aminoácidos fornecidos sofrerem ação das bactérias ruminais, foi adicionada à dieta 30% a mais da quantidade de lisina e metionina. As dietas O+LM e OLM e a dieta LM forneciam aproximadamente 107% e 110% do requerimento de lisina e metionina na proteína metabolizável, respectivamente; e a dieta OS fornecia 75% e 58% do requisito de lisina e metionina, respectivamente. O fornecimento de lisina e metionina foi reajustado diariamente de acordo com o consumo de matéria seca.

### 3.2 Alimentação e Manejo

Os animais foram alimentados em baias individuais, duas vezes ao dia, às seis horas e 30 minutos e 17 horas. A dieta foi fornecida na forma de dieta total, permitindo-se sobra de 5 a 10%. O consumo e a sobra foram monitorados e ajustados diariamente.

Os aditivos (óleo e aminoácidos) das dietas OLM, OS e LM foram fornecidos na alimentação da manhã separados da dieta total (*Top dressed*). Entretanto, na dieta O+LM os mesmos aditivos foram misturados à dieta total e fornecidos também uma vez ao dia.

A ordenha dos animais foi realizada duas vezes ao dia, às seis horas e 16 horas e 30 minutos. Imediatamente após a ordenha os animais foram conduzidos para as baias de alimentação, permanecendo por três horas e em seguida soltos em piquete de área de descanso. Todos os animais tiveram livre acesso à água e suplementação mineral.

### 3.3 Amostragem e Processos Analíticos

#### 3.3.1 Amostragem e Análise do Leite

A produção de leite foi determinada durante o 15º e 16º dia do período experimental. Quatro ordenhas consecutivas foram amostradas para determinação da proteína, gordura, lactose, contagem de células somáticas (CCS), extrato seco total e desengordurado. As amostras de leite foram acondicionadas em frascos com 2-bromo 2-nitropropano 1,3-diol na relação de 10 mg para 50 ml de leite e foram enviadas para análise, sob refrigeração (4°C), ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG) (ChemSpeck 150 de espectrofotometria de trans-reflectância).

Após as análises, a produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (**LCG 3,5%**), sendo obtida pela equação citada por Gravert (1987):  $LCG\ 3,5\% = (0,35 \times PL) + (16,2 \times PG)$ , sendo: **LCG 3,5%** = Produção de leite corrigido para 3,5% de gordura (kg/dia); PL = Produção de leite (kg/dia); PG = Produção de gordura (kg/dia).

A produção de leite corrigida para sólidos totais (*LCST*) foi calculada segundo a equação descrita por Tyrrel e Reid (1965):  $LCST = (12,3 \times PG) + (6,56 \times ESD) - (0,0752 \times PL)$ , sendo: *LCST* = Produção de leite corrigida para teor de sólidos totais; *PG* = Produção de gordura (kg/dia); *ESD* = Produção de extrato seco desengordurado; *PL* = Produção de leite (kg/dia). Todos os cálculos foram feitos para cada ordenha separadamente, e posteriormente para o dia.

### 3.3.2 Amostragem e Análise do Sangue

Foram coletadas amostras individuais de sangue nos vasos coccígeos e veia mamária (veia abdominal superficial caudal) no último dia experimental de cada período (21º dia), utilizando tubo com vácuo e fluoreto (4 ml) e tubo com vácuo e gel separador (5 ml). Assumiu-se que a amostra dos vasos coccígeos é arterial para ser feito o cálculo estimativo da diferença arterial-venosa (A-V), como realizado no experimento de Illg *et al.* (1987).

As colheitas de sangue foram realizadas nos tempos zero e seis horas após alimentação. No tempo zero os animais encontravam-se em média 14 horas após a ordenha e no tempo seis os animais encontravam-se em média seis horas após a ordenha. As amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 minutos logo após a colheita. O plasma e o soro foram acondicionados em microtubos e congelados a -10°C para posterior análises. O plasma foi utilizado para a determinação da concentração de glicose, enquanto o soro foi utilizado para determinação de ureia, albumina e proteínas totais.

A concentração de ureia foi determinada através de kit enzimático comercial (Synermed®), a glicose por kit monoreagente comercial (Synermed®) e proteínas totais e albumina por kits colorimétricos comerciais (Synermed®). As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os procedimentos foram realizados em aparelho automatizado (Cobas Mira -Brasil). De acordo com o manual do kit Synermed®, a concentração de nitrogênio ureico no plasma (NUP) pode ser calculada à partir da concentração de ureia, sendo, 320 mg/dl de ureia correspondem a 150 mg/dl de NUP, ou seja, fator de correção de 2,133.

### 3.3.3 Amostragem e Análise de Urina

As colheitas de urina foram realizadas uma vez ao dia por micção espontânea, nos dias 18, 19 e 20 de cada período experimental, em média quatro horas após alimentação. Uma alíquota de 5ml de cada amostra foi diluída em 45ml de solução contendo ácido sulfúrico 0,036N e armazenada a -10 °C. Uma amostra composta foi formada para cada vaca ao final do período experimental, sendo esta utilizada para a análise de alantoína, ácido úrico e creatinina para avaliação qualitativa da produção de proteína microbiana no retículo-rúmen.

O procedimento adotado para a análise de alantoína foi o sugerido por Chen e Gomes (1992) e a absorvância foi analisada por colorimetria a 522nm no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para as análises de ácido úrico e creatinina foram utilizados kits enzimáticos e colorimétricos comerciais (Synermed®), respectivamente. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo os procedimentos realizados em aparelho automatizado (Cobas Mira -Brasil).

### 3.3.4 Amostragem e Análise dos Alimentos

Amostras de silagem de milho, farelo de soja, polpa de citrus e milho moído foram colhidas antes e durante o estudo para realização de análises bromatológicas e aminograma (Anexo). As análises bromatológicas das amostras foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária de Lavras (UFLA), e os aminogramas no Laboratório CBO Assessoria e Análise, em Campinas - SP. De acordo com esses resultados a composição química das dietas experimentais foi determinada conforme a tabela 2.

Semanalmente as dietas foram ajustadas de acordo com a flutuação da matéria seca da silagem de milho. Amostras de cada dieta experimental foram colhidas nos dias 15, 16 e 17 de cada período. No final de cada período foi obtido um pool correspondente à dieta de cada dieta experimental. As sobras foram coletadas uma única vez ao dia, durante



os mesmos dias, para obtenção do pool de sobras de cada dieta durante cada período experimental.

As amostras da dieta fornecida e sobras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, regulada a 55°C, por 72h. As amostras pré-secas foram moídas em moinho estacionário tipo “Thomas Willey” (modelo 4, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia PA), montado com peneiras com furos de 1mm de diâmetro e armazenadas em recipientes plásticos para posteriores análises bromatológicas.

A determinação da matéria seca foi realizada em estufa a 105°C por cinco horas para determinação da matéria seca total. O teor de cinzas foi determinado pela queima total da matéria orgânica em mufla a 600°C por quatro horas. O teor de matéria orgânica foi calculado pela diferença entre a matéria seca e o conteúdo de cinzas (AOAC, 1997).

A proteína bruta foi analisada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1997) e multiplicando o valor por 6,25 (NRC, 2001). O extrato etéreo foi obtido de acordo com o AOAC (1997). A análise de FDN e FDA foi realizada em aparelho ANKON® Fiber Analyser (ANKON Technology Corporation, Fairport, EUA) de acordo com o método proposto por Van Soest *et al.* (1991). A porcentagem de carboidratos não fibrosos foi calculada utilizando-se a equação proposta pelo NRC (2001):  $100 - ((\% \text{FDN} - \% \text{FDN}_{\text{PB}}) + \% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas})$ , onde: FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro;  $\text{FDN}_{\text{PB}}$  = Proteína bruta insolúvel em detergente neutro; PB = Proteína bruta; EE = Extrato etéreo.

O cálculo de consumo de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e extrato etéreo foi realizado com base no valor da matéria seca a 65°C obtido para dieta oferecida e para a sobra (Broderick, 2003). Com base nos valores obtidos para consumo de matéria seca e consumo de nitrogênio foram estimados os cálculos de eficiência de utilização da matéria seca do alimento (leite produzido dividido pelo consumo de matéria seca) e eficiência da utilização do nitrogênio alimentar. A média de nitrogênio do leite é o total de proteína do leite dividido por 6,38 (Broderick, 2003). A saber:

$$\text{Eficiência de utilização da MS} = \text{Leite produzido} / \text{IMS}$$

$$\text{Eficiência de utilização N} = \text{N produzido no leite} / \text{N ingerido}$$

Em que: MS = Matéria seca; IMS = Ingestão de matéria seca; N = Nitrogênio.

### 3.4 Análise Estatística

O esquema da ANOVA obtida para as variáveis de produção e composição do leite, consumo e urina, que foram colhidas uma única vez e em um único local por período de coleta, pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3: Esquema da análise de variância para as variáveis de produção e composição do leite, consumo, urina, diferença arteriovenosa e extração de glicose do sangue

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Total	47
Tratamentos	3
Períodos	3
Animal	9
Quadrado	2
Erro	30

As variáveis medidas e dependentes foram ajustadas ao seguinte modelo matemático:  $Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + Q_l + \varepsilon_{ijkl}$ , onde:  $Y_{ijkl}$  = variável dependente;  $\mu$  = constante geral presente em todas as observações;  $A_i$  = efeito do animal  $i$  dentro de quadrado;  $P_j$  = efeito do período  $j$ ;  $T_k$  = efeito do tratamento  $k$ ;  $Q_l$  = efeito do quadrado  $l$ ;  $\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório associado à cada observação.

Já o esquema da ANOVA obtida para as variáveis do sangue (repetidas no tempo), que foram coletadas em dois momentos diferentes e em dois locais distintos, pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4: Esquema da análise de variância para as concentrações dos metabólitos sanguíneos

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Total	191
Tratamentos	3
Períodos	3
Animal	9
Quadrado	2
Animal x Período x Tratamento x Quadrado	30
Tempo	1
Animal x Período x Tratamento x Quadrado x Tempo	47
Local	1
Erro	95

As variáveis medidas repetidas no tempo e dependentes foram ajustadas ao seguinte modelo matemático:  $Y_{ijklmn} = \mu + A_i + P_j + T_k + Q_l + \varepsilon_{ijkl} + H_m + \varepsilon_{ijklm} + L_n + \varepsilon_{ijklmn}$ , onde:  $Y_{ijklmn}$  = variável dependente;  $\mu$  = constante geral presente em todas as observações;  $A_i$  = efeito do animal dentro de quadrado;  $P_j$  = efeito do período  $j$ ;  $T_k$  = efeito do tratamento  $k$ ;  $Q_l$  = efeito do quadrado  $l$ ;  $\varepsilon_{ijkl}$  = erro a; animal x período x tratamento x quadrado;  $H_m$  = efeito do tempo  $m$ ;  $\varepsilon_{ijklm}$  = erro b; animal x período x tratamento x quadrado x tempo;  $L_n$  = efeito do local  $n$ ;  $\varepsilon_{ijklmn}$  = erro c; animal x período x tratamento x quadrado x tempo x local.

Para os testes dos fatores de interesse foram realizados os contrastes: LIPÍDEO = compara a média da dieta O+LM e OLM com a média da dieta LM para testar o efeito do óleo na presença de lisina e metionina; AA = compara a média da dieta O+LM e OLM com a média da dieta OS para testar o efeito da lisina e metionina na presença de óleo; LIPxAA = compara a média da dieta OS com a média da dieta LM, comparando assim, o efeito do óleo com o efeito da lisina e metionina; e COMPLEXO = compara a média da dieta O+LM com a média da dieta OLM, para testar o efeito da proteção do aminoácido com a presença do óleo. As fórmulas usadas em cada um dos testes contrastes foram:

$$\text{LIPÍDEO} = (X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{LM}$$

$$\text{AA} = (X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{OS}$$

$$\text{LIPxAA} = X^{OS} - X^{LM}$$

$$\text{COMPLEXO} = X^{O+LM} - X^{OLM}$$

Em que:  $X^{O+LM}$  = média da dieta O+LM;  $X^{OLM}$  = média da dieta OLM;  $X^{OS}$  = média da dieta OS;  $X^{LM}$  = média da dieta LM.

As variáveis testadas foram analisadas pelo programa PROC GLM do programa estatístico SAS (1999). O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado diferente significativamente.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de produção de leite das dietas O+LM; OLM; OS e LM foram respectivamente, 32,1; 31,7; 31,7 e 32,9 kg de leite/dia. Os contrastes para pesquisa dos efeitos

de lipídeos, aminoácidos, interação lipídeo x AA e complexação dos AA não apresentaram diferença significativa para os valores de produção de leite (Tabela 5).

Tabela 5: Produção e composição do leite de vacas em dietas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja

Variável	Dietas				EPM	Estimativas dos contrastes			
	O+LM	OLM	OS	LM		LIPÍDEO	AA	LIPxAA	COMPLEXO
Prod. leite, kg/dia	32,1	31,7	31,7	32,9	0,631	-1,0	0,2	-1,2	0,4
LCG 3,5%, kg/dia	25,3	25,0	26,6	29,0	0,594	-3,9***	-1,5**	-2,4***	0,3
LCST, kg/dia	26,9	26,5	27,8	29,9	0,584	-3,2***	-1,1*	-2,1**	0,4
Gordura, %	2,70	2,65	2,94	3,29	0,078	-0,62***	-0,26***	-0,35***	0,04
Gordura, kg/dia	0,93	0,87	0,91	1,06	0,092	-0,15	-0,01	-0,15	0,06
Proteína, %	3,30	3,33	3,26	3,17	0,049	0,14**	0,05	0,09	-0,03
Proteína, kg/dia	1,04	1,00	0,99	1,07	0,036	-0,06	0,03	-0,09*	0,05
Lactose, %	4,82	4,79	4,85	4,87	0,020	-0,06***	-0,04*	-0,03	0,03
Lactose, kg/dia	1,56	1,48	1,49	1,63	0,068	-0,11	0,03	-0,14*	0,07

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexado com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Lisina e metionina. LIPÍDEO =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{LM}$ ; AA =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{OS}$ ; LIPxAA =  $X^{OS} - X^{LM}$ ; COMPLEXO =  $X^{O+LM} - X^{OLM}$ ; EPM = Erro padrão da média; LCG 3,5% = Produção de leite corrigida para o teor de gordura de 3,5%; LCST = Produção de leite corrigida para sólidos totais.

\*  $P \leq 0,10$

\*\* $P \leq 0,05$

\*\*\*  $P \leq 0,01$

O aumento na produção de leite em resposta à suplementação com aminoácidos protegidos geralmente é limitado a vacas no início da lactação, uma vez que necessitam de maior quantidade de aminoácidos absorvíveis (Polan *et al.*, 1991; Schwab *et al.*, 1992). Canale *et al.* (1990) não encontraram efeito da adição de lisina e metionina protegidas e uma fonte de gordura na dieta de vacas Holandesas com produção média de 30 kg/dia de leite no terço inicial da lactação, sobre a produção de leite. A adição de óleo, de lisina e metionina ou a associação de lipídeo com os aminoácidos não afetou a produção de leite ( $P \geq 0,05$ ).

O mesmo resultado foi observado no presente experimento, onde se trabalhou com vacas Holandesas no terço médio de lactação com média de produção de leite de 32,1 kg/dia no início do período experimental. Sendo assim, a utilização de aminoácidos complexados ou não ao óleo não resultou em aumento na produção de leite, sugerindo a ausência de deficiência em aminoácidos essenciais ou que os aminoácidos metionina e lisina

não foram limitantes para este nível de produção e/ou fase de lactação. Dessa forma tornou-se difícil a avaliação da proteção dos aminoácidos com o óleo, uma vez que pode não ter ocorrido deficiência dos aminoácidos e a maior disponibilidade de aminoácidos limitantes para serem absorvidos no intestino delgado não promoveu mais estímulo para glândula mamária.

Os valores de produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e de produção de leite corrigida para sólidos totais, também, estão descritos na tabela 5. As médias de produção de leite corrigida para gordura para a dieta O+LM foi de 25,3 kg/dia; para OLM de 25,0 kg/dia; para OS de 26,6 kg/dia e para LM de 29,0 kg/dia. No contraste LIPÍDEO, que testa o efeito do óleo na presença de lisina e metionina, observa-se que o óleo na presença de aminoácidos reduziu em 3,9 kg/dia ( $P \leq 0,01$ ) a produção de leite corrigida para gordura. O contraste AA mostra que o aminoácido na presença do óleo também reduziu a produção de leite corrigida para gordura de 1,5 kg/dia ( $P \leq 0,05$ ). No contraste LIPxAA observa-se que o óleo causou queda na produção de leite corrigida para gordura de 2,4 kg/dia ( $P \leq 0,05$ ) quando comparado à suplementação com aminoácidos. O contraste COMPLEXO mostra que não houve diferença entre as diferentes formas de fornecer óleo, lisina e metionina nas dietas.

De acordo com resultados obtidos por Chilliard e Doreu (1997), a utilização de óleo de peixe associado à suplementação com metionina protegida também proporcionou queda na produção de leite corrigida para 4,0% de gordura.

Na dieta sem suplementação com o óleo pode ter ocorrido maior síntese de proteína microbiana, devido a maior disponibilidade de amido, já que maior quantidade de milho foi fornecida nesta dieta para correção do teor de energia. Sendo assim, mais propionato foi disponibilizado no rúmen proporcionando maior produção de leite corrigida para gordura.

O efeito das dietas testadas neste estudo sobre a produção de leite corrigida para 3,5 % de gordura pode estar relacionado também ao efeito da suplementação com óleo diminuindo a concentração de gordura do leite.

A queda no teor de gordura de leite afetou não somente a produção de leite corrigida para gordura, mas também a produção de leite corrigida para sólidos totais, uma vez que ambas as fórmulas propostas para a correção desses dois valores consideram a produção de gordura. A produção de leite corrigida para sólidos totais para as dietas O+LM; OLM; OS e LM foram 26,9; 26,5; 27,8 e 29,9 kg/dia, respectivamente. Os resultados dos testes contrastes para produção de leite corrigida para sólidos totais foram semelhantes aos apresentados para produção de leite corrigida para 3,5% de gordura. O óleo na presença de

aminoácidos reduziu a produção de leite corrigida para sólidos totais em 3,2 kg/dia ( $P \leq 0,01$ ), a lisina e a metionina na presença do óleo reduziram a produção de leite corrigida para sólidos totais em 1,1 kg/dia ( $P \leq 0,10$ ) e a presença do óleo em comparação a presença de lisina e metionina reduziu a produção de leite corrigida para sólidos totais em 2,1 kg/dia ( $P \leq 0,05$ ). Já o efeito de proteção não alterou a produção de sólidos totais (Tabela 5).

Ainda na tabela 5 são apresentados os valores da composição do leite. As médias do teor de gordura foram de 2,17%; 2,65%; 2,94% e 3,29%, respectivamente, para as dietas O+LM; OLM; OS e LM. No contraste LIPÍDEO observa-se que a presença do óleo juntamente com lisina e metionina reduziu o percentual de gordura em 0,62 ( $P \leq 0,01$ ). Lisina e metionina na presença de óleo (contraste AA) também reduziram o teor de gordura do leite em 0,26 ( $P \leq 0,01$ ). Quando se compara a suplementação de óleo com a suplementação de lisina e metionina (contraste LIPxAA) nota-se que a presença do óleo reduziu o percentual de gordura em 0,35 ( $P \leq 0,01$ ).

Esse efeito pode ser explicado através ação do lipídeo prontamente disponível no rúmen sobre o metabolismo ruminal e a síntese de gordura do leite, ou seja, pela teoria da biohidrogenação (Jenkins, 1993). Segundo esta teoria, as alterações na fermentação das dietas impedem a biohidrogenação dos ácidos graxos e resultam em abaixamento do pH ruminal e elevadas concentrações de ácidos graxos do tipo trans (C18:2 e C18:1) no rúmen (Jenkins, 1993), que escapam da biohidrogenação ruminal (Harvatine *et al.*, 2009). Os isômeros CLA *trans*-10 *cis*-12, CLA *trans*-9 *cis*-11 e CLA *trans*-12 *cis*-10 vêm sendo relacionado à redução do teor de gordura em diversos estudos (Chouinard *et al.*, 1999; Baumgard *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2005; Harvatine *et al.*, 2009) devido à sua relação inversa com a concentração e produção de gordura no leite (Chouinard *et al.*, 1999; Baumgard *et al.*, 2001).

Lipídios de rápida disponibilidade ruminal como óleos vegetais livres ou sementes de oleaginosas processadas aumentam a disponibilidade imediata de lipídeos insaturados no rúmen, reduzindo a capacidade de biohidrogenação pelos micro-organismos (Mohamed *et al.*, 1988). Neste experimento utilizou-se o óleo de soja, que possui liberação rápida, adicionado separadamente da dieta total e fornecido uma vez ao dia, que pode ter induzido queda na concentração de gordura do leite. Esse efeito ocorreu mesmo com a utilização de concentrações de gordura na dieta preconizados pelo NRC (2001), ou seja, abaixo de 5% da matéria seca da dieta.

Canale *et al.* (1990) testaram o efeito da suplementação de formas protegidas de lisina e metionina juntamente com uma fonte de gordura (5,6% da matéria seca) na dieta de

vacas leiteiras sobre produção e composição do leite. O efeito combinado entre a gordura e o aminoácido protegido sobre o teor de gordura e a produção de leite foi maior que a adição isolada de cada um, indicando efeito sinérgico desses suplementos. A suplementação apenas com lisina e metionina protegida ou apenas com óleo não afetaram o teor e nem a produção de gordura do leite. Resultado inverso foi encontrado no presente estudo, quando associou-se óleo com aminoácidos na dieta com 4% de extrato etéreo na matéria seca.

Chilliard e Doreau (1997) associaram o uso óleo de peixe com metionina protegida e não encontraram efeito da interação entre a suplementação de óleo e metionina protegida sobre a composição do leite. A suplementação de óleo associada à metionina causou redução no teor de gordura do leite sem alterar o de proteína. No entanto, o fornecimento isolado de óleo e de metionina protegida reduziu e não afetou o teor de gordura, respectivamente. O extrato etéreo da dieta após a adição do óleo de peixe foi 3,6% na matéria seca.

Os resultados para produção de gordura diferem-se dos apresentados para teor de gordura, pois são influenciados pela produção de leite. A produção média de gordura para as dietas O+LM; OLM; OS e LM foram 0,93; 0,87; 0,91 e 1,06 kg/dia, respectivamente. A presença do óleo juntamente com aminoácidos ou a presença de aminoácidos juntamente com óleo não afetaram a produção de gordura. A comparação entre o fornecimento de óleo, o fornecimento de lisina e metionina e a comparação entre as diferentes formas de fornecimento do óleo, lisina e metionina também não afetaram a produção de gordura do leite (Tabela 5).

O teor de proteína médio para as diferentes dietas foi 3,30%, 3,33%, 3,26% e 3,17 para as dietas O+LM, OLM, OS e LM, respectivamente. No contraste LIPÍDEO observa-se que o óleo na presença de aminoácido provocou aumento de 0,14% ( $P \leq 0,05$ ) na proteína do leite. A produção média de proteína do leite para as dietas O+LM; OLM; OS e LM foram, respectivamente, 1,04; 1,00; 0,99 e 1,07 kg/dia. No contraste LIPxAA, que compara o efeito do óleo de soja com o de lisina e metionina, a produção de proteína do leite apresentou aumento de 0,09 kg/dia ( $P \leq 0,10$ ). A suplementação com lisina, metionina e óleo, em ambas as formas de fornecimento não afetaram o teor e a produção de proteína do leite (Tabela 5). Portanto, a forma de fornecimento, seja ela *top dressed* ou TMR não afetou nem a produção nem a composição do leite.

Segundo o NRC (2001), o teor de proteína do leite é mais sensível ao efeito da suplementação com aminoácidos do que a produção de leite. O aumento na produção de proteína do leite em resposta à suplementação com lisina e metionina protegida parece ser menos afetada pela fase de lactação no qual a suplementação foi iniciada (Socha *et al.*, 2005).

Armentano *et al.* (1997) adequaram a quantidade de lisina na dieta basal fornecida em TMR e suplementaram com metionina protegida as dietas. Houve aumento na produção e concentração da proteína do leite, já que a produção não foi afetada pela suplementação com os aminoácidos. A produção de proteína do leite aumentou 4 g/g de metionina adicionada na TMR.

Socha *et al.* (2005) obtiveram aumento no percentual de proteína do leite quando suplementaram lisina e metionina em dieta contendo 18,5% de proteína bruta. Quando a suplementação foi feita em dieta com 16% de proteína bruta não houve resposta para a produção nem para o percentual de proteína do leite. Sendo assim, esses autores concluíram que vacas no início da lactação recebendo dieta a base de milho são responsivas ao aumento do fornecimento intestinal de lisina e metionina dependendo da concentração de proteína bruta da dieta, do fornecimento de proteína metabolizável e da digestibilidade intestinal da fração não degradável no rúmen da proteína suplementada.

Burgess *et al.* (1987) mostraram que a adição de gordura na dieta de vacas de leite provoca queda no percentual de proteína do leite. O mecanismo responsável por essa queda ainda não foi bem elucidado. Entretanto, a queda de percentual de proteína do leite pode estar relacionada à diminuição no conteúdo de caseína (Dunkley *et al.*, 1977; DePeters *et al.*, 1985). Desta forma, segundo Canale *et al.* (1990), a suplementação com aminoácidos protegidos poderia diminuir a queda do percentual da proteína do leite causada pela adição de gordura na dieta deruminantes, uma vez que, ao fornecerem apenas óleo aos animais observou-se queda no percentual de proteína de leite. No entanto, estes mesmos autores, ao associarem a fonte de óleo com lisina e metionina não observaram o efeito de redução sobre o teor de proteína do leite. Com o fornecimento isolado de lisina e metionina protegida os autores obtiveram aumento na percentagem de proteína do leite, sem que houvesse alteração na produção total de proteína do leite.

Chilliard e Doreau (1997) associaram o uso de metionina protegida com o uso de óleo de peixe e não obtiveram alteração na concentração e produção de proteína do leite. Segundo estes autores quando se adicionou apenas metionina protegida na dieta também não se observou aumento na produção de proteína do leite, embora tenha ocorrido aumento no teor de proteína.

No presente estudo a suplementação com lisina e metionina não resultou em elevação no teor de proteína do leite, já que estes aminoácidos não foram fornecidos na forma protegida. Ocorreu aumento no teor de proteína quando se adicionou óleo na presença de lisina e metionina, independentemente da forma como esses foram adicionados na dieta ( $P \leq$



0,05). Sendo assim, observou-se que a utilização de aminoácidos complexados ou não ao óleo de soja promoveu aumento no percentual de proteína, sugerindo provável deficiência em aminoácidos essenciais e que pode ter ocorrido proteção dos aminoácidos com a utilização de gordura, ou seja, a formação de um complexo protegido da degradação ruminal.

O teor e a produção de lactose estão descritos na tabela 5. As concentrações médias de lactose para as dietas O+LM; OLM; OS e LM foram de 4,82%; 4,79%; 4,85% e 4,87%, respectivamente. A suplementação com óleo na presença de aminoácidos reduziu em 0,06 ( $P \leq 0,01$ ) o teor de lactose. No contraste AA, que testa o efeito de lisina e metionina na presença de óleo, também se observa redução no teor de lactose de 0,04 ( $P \leq 0,10$ ). Segundo Blum *et al.* (1999), as causas de alterações no percentual de lactose não são óbvias quando aminoácidos são suplementados na dieta.

Ao compararmos a dieta O+LM com a dieta OLM observa-se que não existem diferenças entre as respostas apresentadas por ambos, ou seja, o fornecimento de óleo, lisina e metionina na dieta total ou como *top dressed* apresentou o mesmo efeito sobre a produção e a composição do leite (tabela 5).

Os dados para consumo de matéria seca e cálculos de eficiência de utilização de matéria seca e de nitrogênio encontram-se na tabela 6.

A ingestão de matéria seca média foi de 23,3; 22,6; 22,9 e 23,4 kg por vaca/dia, respectivamente, para as dietas O+LM; OLM; OS e LM. A suplementação com lisina, metionina e óleo, independente da forma de fornecimento, não afetaram o consumo dos animais. Os contrastes estimados também não diferiram para ingestão de matéria seca durante o período experimental (Tabela 6).

Tabela 6: Consumo de matéria seca e eficiência alimentar de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja

Variável	Dietas				EPM	Estimativas dos contrastes			
	O+LM	OLM	OS	LM		LIPÍDEO	AA	LIPxAA	COMPLEXO
IMS <sup>1</sup> , kg/dia	23,3	22,6	22,9	23,4	0,323	-0,45	0,01	-0,46	0,61
PL/IMS	1,37	1,40	1,38	1,41	0,031	-0,02	0,01	-0,03	-0,03
Nleite/Ncons.	0,25	0,25	0,25	0,26	0,009	-0,01	0,01	-0,02	0,00

<sup>1</sup> Cálculo da ingestão de matéria seca baseado na matéria seca a 65°C.

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexado com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Lisina e metionina. LIPÍDEO =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{LM}$ ; AA =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{OS}$ ; LIPxAA =  $X^{OS} - X^{LM}$ ; COMPLEXO =  $X^{O+LM} - X^{OLM}$ ; EPM = Erro padrão da média; IMS = Ingestão de matéria seca; PL = Produção de leite; N = Nitrogênio.

\*  $P \leq 0,10$

No experimento de Socha *et al.* (2005), vacas Holandesas suplementadas com lisina e metionina protegidas e que ingeriram dietas com 16 e 18,5% de proteína bruta no início da lactação, produziam 44,9 kg de leite/dia consumindo 24,3 kg/dia de matéria seca. Neste experimento o consumo médio de matéria seca de vacas com produção diária de 32,1 kg de leite foi de 23,1 kg de matéria seca, sendo o valor predito pelo NRC (2001) de 22,7 kg/dia. Portanto, houve grande aproximação (98%) do valor predito de consumo pelo NRC (2001).

A eficiência de utilização da matéria seca não foi afetada pelas dietas experimentais. As médias das eficiências para as dietas O+LM; OLM; OS e LM foram 1,37; 1,40; 1,38 e 1,41 litros de leite produzidos por kg de matéria seca ingerida, respectivamente (Tabela 6). A eficiência alimentar similar entre as dietas se deve a similar produção de leite e o similar consumo de matéria seca.

A eficiência alimentar ou eficiência de utilização da matéria seca refere-se à capacidade da vaca em transformar o alimento consumido em leite. Neste trabalho, as vacas produziram, em média 1,39 kg de leite para cada quilo de matéria seca consumida. Na meta-análise de Huhtanen e Hristov (2009), os valores médios para eficiência alimentar relatados nos EUA e na Europa foram, respectivamente, 1,30 e 1,45 kg de leite/ kg de matéria seca ingerida. As médias de produção de leite dos animais considerados para obtenção dos dados americanos e europeus foram de 31,0 kg/dia e 25,4 kg/dia, respectivamente. Broderick (2003) trabalhando com vacas Holandesas primíparas e múltíparas com média de produção de leite de 34,0 e 44,0 kg/dia, respectivamente, e com dietas com 16,7% e 18,4% de proteína bruta, encontrou valores médios de eficiência alimentar de 1,55 para dieta com 16,7% de proteína bruta e 1,51 para dieta com 18,4% de proteína bruta. Ou seja, a eficiência alimentar reduziu quando o teor proteico da dieta aumentou ( $P \leq 0,05$ ).

A eficiência de utilização do nitrogênio refere-se à capacidade de secretar proteína no leite a partir do nitrogênio consumido na dieta. No estudo de Huhtanen e Hristov (2009) também foi feita a meta-análise com trabalhos americanos e europeus sobre a eficiência de utilização do nitrogênio. Foi observado valor de eficiência de utilização do nitrogênio de 0,247 para os dados americanos, considerando vacas com média de produção de 31,4 kg de leite/dia e teor proteico na dieta de 17,8%; e valor de eficiência de 0,277 para os dados europeus, que utilizaram vacas com média de produção de 25,4 kg de leite/dia e teor proteico da dieta de 16,5%. Estes autores demonstraram que a concentração de proteína bruta da dieta é o fator dietético mais importante sobre a eficiência de utilização do nitrogênio, e que o aumento na produção de leite pode aumentar a eficiência de utilização do nitrogênio.

Broderick (2003) trabalhando com vacas Holandesas primíparas e multíparas com média de produção de leite de 34,0 e 44,0 kg/dia, respectivamente e dieta com teor proteico de 16,7%, encontrou valor para eficiência de utilização de nitrogênio de 0,270. No mesmo trabalho, quando o autor utilizou vacas com a mesma média de produção, mas dieta com teor proteico de 18,4% a eficiência de utilização de nitrogênio reduziu para 0,239. Ou seja, ao aumentar o teor de proteína bruta da dieta reduziu-se a eficiência de utilização de nitrogênio.

Socha *et al.* (2008) avaliaram a eficiência de utilização de nitrogênio em vacas recebendo metionina em três diferentes fases da lactação. No pico da lactação, vacas com produção de 40,0 kg de leite e 18,8% de proteína bruta na dieta; no início da lactação, vacas com produção de 38,2 kg de leite e 17,6% de proteína bruta na dieta; e no meio da lactação, vacas produzindo 34,5 kg de leite e 16,2% de proteína bruta na dieta, apresentaram eficiência de utilização do nitrogênio de 0,31; 0,28 e 0,29, respectivamente.

No presente estudo, para vacas produzindo média de 32,1 kg de leite/dia no início do experimento e 17,4% de proteína bruta na dieta, o valor médio de eficiência de utilização do nitrogênio encontrado foi 0,25. Os valores médios para eficiência de uso do nitrogênio para as dietas O+LM; OLM; OS e LM foram, respectivamente, 0,25; 0,25; 0,25 e 0,26. A eficiência de utilização de nitrogênio poderia ser aumentada disponibilizando maior quantidade de nitrogênio na dieta.

Os resultados obtidos para derivados de purina encontram-se na tabela 7. Os valores médios para a relação alantoína/creatinina foram de 3,01; 3,07; 3,25 e 3,40 para as dietas O+LM; OLM; OS e LM, respectivamente. No contraste LIPÍDEO, que testa o efeito do óleo na presença de aminoácido, ocorreu redução de 0,36 ( $P \leq 0,10$ ) na relação alantoína/creatinina. A adição de aminoácidos associados ou não ao óleo não afetou a relação alantoína/creatinina na urina.

Tabela 7: Derivados de purinas e relação alantoína/creatinina na urina de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja

Variável	Dietas				EPM	Estimativas dos contrastes			
	O+LM	OLM	OS	LM		LIPÍDEO	AA	LIPxAA	COMPLEXO
Alant/creat <sup>1</sup>	3,01	3,07	3,25	3,40	0,154	-0,36*	-0,22	-0,15	-0,06
DP, mmol/l	19,59	19,42	19,79	20,98	0,522	-1,47**	-0,29	-1,19*	0,17

<sup>1</sup> Relação alantoína/creatinina

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexado com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Lisina e metionina. LIPÍDEO =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{LM}$ ; AA =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{OS}$ ; LIPxAA =  $X^{OS} - X^{LM}$ ; COMPLEXO =  $X^{O+LM} - X^{OLM}$ ; EPM = Erro padrão da média; DP = Derivados de purina (alantoína mais ácido úrico).

\*  $P \leq 0,10$

\*\*  $P \leq 0,05$

Análises de alantoína e creatinina em amostras *spot* de urina são usadas para investigar, qualitativamente, a produção de proteína microbiana a partir do rúmen. Essa técnica assume que as purinas que deixam o rúmen são essencialmente de origem microbiana (McAllan, 1982) e que existe relação positiva entre as purinas que deixam o rúmen e a excreção dos seus derivados (principalmente a alantoína para bovinos) na urina (Chen *et al.*, 1990). Dewhurst *et al.* (1996) sugeriram que a relação alantoína/creatinina de amostras de urina *spot* possui potencial para ser usada como diagnóstico a nível de fazenda da produção de proteína microbiana.

No experimento realizado por Cabrita *et al.* (2003), a relação alantoína/creatinina para vacas Holandesas no meio da lactação, com produção média de leite de 29 kg/dia e recebendo 45% de volumoso a base de silagem de milho foi 3,82. No presente estudo, utilizando-se vacas Holandesas com média de produção de 32,1 kg/dia e recebendo 49% de volumoso a base de silagem de milho a média da relação alantoína/creatinina foi 3,18.

A concentração de derivados de purina média para as dietas O+LM;OLM; OS e LM foram respectivamente, 19,59; 19,42; 19,79 e 20,98 mmol/l. A concentração de derivados de purina, os quais derivam principalmente a partir do catabolismo das purinas absorvidas de origem microbiana ruminal (Broderick, 2003), reduziu com a utilização de óleo na presença de lisina e metionina. No contraste LIPÍDEO, que testa o efeito do óleo na presença de aminoácidos, a queda na concentração de derivados de purina foi de 1,47 mmol/l ( $P \leq 0,05$ ). No contraste LIPxAA a redução na concentração de derivados de purina foi de 1,19 mmol/l ( $P \leq 0,10$ ), quando comparou-se a adição de óleo à adição de lisina e metionina (Tabela 7).

A redução na concentração de derivados de purina e na relação alantoína/creatinina na urina pode estar relacionada com a diminuição na formação de proteína microbiana devido a menor fermentação ruminal (Broderick, 2003). No presente estudo, o consumo de matéria seca foi semelhante, mas a dieta LM disponibilizou maior quantidade de energia para as bactérias, já que o óleo não é utilizado como fonte de energia para os microorganismos. Desta forma, a maior disponibilidade de amido no rúmen pode ter possibilitado a maior síntese de proteína microbiana na dieta LM. Porém, isso não refletiu em proteína do leite.

A presença do óleo no rúmen, fornecido separadamente da dieta total uma vez ao dia, pode ter sido a causa da redução na fermentação ruminal. A maior quantidade de ácidos graxos insaturados e triglicerídeos no rúmen podem causar alterações no balanço

fermentativo ruminal através da supressão das bactérias metanogênicas e celulolíticas (Van Soest, 1994). A gordura pode inibir a digestão e a fermentação no rúmen e pode também inibir o crescimento microbiano (Jenkins e Jenny, 1989).

As avaliações dos metabólitos sanguíneos encontram-se nas tabelas 9 e 10. Não houve efeito das dietas experimentais sobre as concentrações de glicose, proteínas totais, albumina e nitrogênio ureico no plasma. Blum *et al.* (1999) mostraram que a concentração de ureia no plasma não aumentou com a suplementação de metionina. Rulquin e Delaby (1997) também mostraram que a suplementação com aminoácidos não afeta a concentração de ureia no plasma. Esses mesmos autores discutem a concentração de glicose no sangue e consideram que aminoácidos aumentam a glicose plasmática quando vacas são alimentadas com dietas de baixa energia, no entanto, não aumenta quando são alimentadas com nível ideal de energia na dieta.

Nos diferentes horários de coleta do sangue observou-se diferença na concentração de alguns metabólitos sanguíneos (Tabela 8). A concentração de glicose no sangue foi maior no tempo zero que no tempo seis, sendo 53,38 e 48,75 mg/dl, respectivamente. Ambos os valores encontram-se dentro do intervalo de normalidade para concentração de glicose citado por Kaneko (1989), entre 45 e 75 mg/dl.

Tabela 8: Metabólitos do sangue em dois diferentes tempos de coleta em vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja

Variável	Horário de coleta		Valor de P
	T0	T6	
Glicose, mg/dl	53,38	48,75	< 0,0001
Proteínas totais, g/dl	7,65	7,73	0,4616
Albumina, g/dl	2,78	2,84	0,1676
NUP, mg/dl	18,91	21,99	< 0,0001

T0 = Tempo de coleta zero hora após a alimentação e 14 horas após a ordenha; T6 = Tempo de coleta seis horas após a alimentação e seis horas após a ordenha; NUP = Nitrogênio ureico no plasma.

A concentração de glicose no sangue é normalmente regulada pelos hormônios insulina e glucagon e segundo Judson e Leng (1973), é controlada pela disponibilidade de precursores gliconeogênicos. Os principais substratos utilizados para a síntese de glicose em ruminantes são propionato (Wiltout e Satter, 1972) e aminoácidos gliconeogênicos (Heitmann *et al.*, 1973). O jejum normalmente não resulta em hipoglicemia (Smith, 1993), o que pode explicar os valores médios de glicose dentro do intervalo de normalidade no tempo zero.

A maior concentração de glicose no tempo zero pode ser explicada quando se considera o tempo de ordenha, o intervalo de 14 horas entre a ordenha da tarde e da manhã implica em menor captação de nutrientes e extração de glicose em contraste com ao intervalo de seis horas, que ocorreu no tempo seis após a alimentação.

A concentração do nitrogênio ureico no plasma foi maior no tempo seis que no tempo zero (18,91 e 21,99 mg/dl, respectivamente) (Tabela 8). A literatura cita o pico de nitrogênio ureico no plasma aproximadamente com quatro a seis horas após a alimentação (Butler, 1998) explicando a maior concentração no tempo seis, e isso é natural pela degradação das fontes no rúmen.

Concentração de ureia sanguínea tem sido empregada como indicador do metabolismo proteico e está diretamente relacionada aos teores proteicos da dieta e com a relação energia:proteína da dieta (González e Scheffer, 2002). Segundo Kaneko (1989), os valores de referência para a concentração de nitrogênio ureico no plasma varia entre 20 e 30 mg/dl.

Valadares *et al.* (1997), utilizando novilhos zebus alimentados com dietas contendo 45% de concentrado e teores de proteína bruta variando de 7,0 a 14,5%, verificaram, por meio de análise de regressão, que a faixa de concentração de nitrogênio ureico no plasma de 13,52 a 15,15 mg/dl correspondeu à máxima eficiência microbiana e, provavelmente, representaria o limite a partir do qual estaria ocorrendo perda de proteína para esses animais. Socha *et al.* (2008), utilizando vacas Holandesas no meio da lactação com produção média de 35,1 kg de leite por dia e ingerindo uma dieta com 16,2% de proteína bruta contendo 5 g de metionina, obtiveram valores de nitrogênio ureico no plasma de 13,3 mg/dl.

No presente estudo foram utilizadas vacas Holandesas com dias em lactação médio de 100 dias de lactação com média de produção de leite de 32,1 kg/dia ingerindo uma dieta suplementada com 50 g de metionina e com 17,4% de proteína bruta. A concentração de nitrogênio ureico plasmático no tempo zero e no tempo seis após alimentação foi de 18,91 e 21,99 mg/dl, respectivamente, podendo indicar excesso de proteína bruta na dieta.

Na tabela 8 estão descritos também as concentrações séricas médias de proteínas totais e albuminas. A concentração de proteína total no tempo zero foi 7,65 g/dl e no tempo seis foi 7,73 g/dl. A concentração de albumina no tempo zero foi 2,78 g/dl e no tempo seis foi 2,84 g/dl. Não houve diferença dessas concentrações entre os diferentes tempos de coleta de sangue.

Os dados de diferença arteriovenosa e de extração de glicose encontram-se na tabela 9. A diferença arteriovenosa quantifica a concentração de glicose disponível para ser

captada pela glândula mamária. Os valores médios da diferença arteriovenosa foram 12,08; 13,33; 10,83 e 13,42 mg/dl, respectivamente para as dietas O+LM; OLM; OS e LM. No contraste AA, o aminoácido na presença de óleo aumentou a diferença arteriovenosa em 1,87 ( $P \leq 0,10$ ). No contraste LIPxAA a diferença foi de 2,58 mg/dl ( $P \leq 0,05$ ) quando comparou-se a suplementação de óleo com a suplementação de lisina e metionina.

Os valores médios para a extração de glicose para a dieta O+LM foram de 21,97%; para OLM de 24,37%; para OS de 20,00% e para LM de 24,42%. No contraste AA, o aminoácido na presença de óleo aumentou a extração de glicose em 0,03 mg/dl ( $P \leq 0,10$ ). No contraste LIPxAA a extração foi reduzida 0,04 mg/dl ( $P \leq 0,05$ ) quando comparou-se a suplementação de óleo com a suplementação de lisina e metionina (Tabela 9).

Tabela 9: Diferença arteriovenosa e extração de glicose na glândula mamária de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja

Variável	Dietas				EPM	Estimativas dos contrastes			
	O+LM	OLM	OS	LM		LIPÍDEO	AA	LIPxAA	COMPLEXO
Dif. A-V <sup>1</sup> glicose	12,08	13,33	10,83	13,42	0,906	-0,71	1,87*	-2,58**	-1,25
Extração glicose; %	21,97	24,37	20,00	24,42	0,017	-0,01	0,03*	-0,04*	-0,02

<sup>1</sup> Diferença arteriovenosa

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexado com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Lisina e metionina. LIPÍDEO =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{LM}$ ; AA =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{OS}$ ; LIPxAA =  $X^{OS} - X^{LM}$ ; COMPLEXO =  $X^{O+LM} - X^{OLM}$ ; EPM = Erro padrão da média.

\*  $P \leq 0,10$

\*\*  $P \leq 0,05$

A dieta OS em comparação a dieta LM (contraste LIPxAA) e a média da dieta O+LM com a dieta OLM em comparação a dieta OS (contraste AA), mostram que a dieta OS apresenta menor diferença arteriovenosa e menor extração de glicose. Uma possível explicação para essa redução é o efeito do óleo sobre a fermentação ruminal podendo alterar o perfil de ácidos graxos no rúmen e, então, interferindo na disponibilidade de glicose para o animal. O resultado do contraste LIPxAA é condizente com os dados encontrados para derivados de purina na tabela 8. A presença do óleo reduziu a concentração de derivados de purina, refletindo na síntese de proteína microbiana, quando comparado à presença de lisina e metionina.

Neste trabalho a taxa de extração média de glicose foi 22,7%, enquanto Varvikko *et al.* (1999) observaram taxa de extração média de glicose de 20,3% e Vanhatalo *et al.* (1999) de 25,3%.

Nos dados apresentados dos metabólitos do sangue também se observou provável ausência de proteção do óleo sobre os aminoácidos. A biodisponibilidade dos aminoácidos complexados ou não com o óleo poderia ser determinada através da dosagem dos aminoácidos no plasma. A análise dos dados de biodisponibilidade permite avaliar a proteção ruminal da fonte utilizada ou a absorção da fonte utilizada no intestino delgado (Blum *et al.*, 1999), ou seja, a realização do aminograma, que possibilita essa análise mais detalhada dos aminoácidos do plasma, permitiria concluir sobre a proteção dos aminoácidos.

## 5. CONCLUSÃO

A associação do óleo com lisina e metionina não se justifica quando se busca aumento na produção de leite, mas pode ser justificada quando existir interesse no aumento do percentual de proteína do leite.

A utilização do óleo de soja associado a aminoácidos para protegê-los da degradação ruminal pode ter sido eficiente no presente estudo, já que independentemente da forma de associação da lisina, metionina e óleo os efeitos sobre a produção de leite e percentual de proteína do leite foram os mesmos.



## 6. ANEXO

Tabela 1: Análise bromatológica e composição de aminoácidos dos alimentos

Parâmetros	Silagem de milho				Polpa de citrus	Milho moído	Farelo de soja
	V1	V2	V3	V4			
MS	28,29	30,26	26,09	28,95	88,80	87,29	88,54
PB	8,41	7,48	10,51	8,60	5,12	8,60	46,41
EE	2,65	8,28	7,02	5,42	2,40	5,95	2,12
FDA	30,46	29,99	36,10	30,99	24,00	2,78	7,18
FDN	51,47	43,13	48,23	42,54	35,10	24,85	16,48
MM	5,13	-	-	-	7,60	1,52	6,58
Ca	0,14	-	-	-	2,38	0,02	0,30
P	0,19	-	-	-	0,08	0,26	0,59
	( % AA na PB )						
<b>Aminograma</b>							
Alanina	0,72	0,30	0,38	0,38	0,24	0,71	2,08
Arginina	0,16	0,03	0,08	0,03	0,20	0,43	3,65
Ác. Aspartico	0,53	0,16	0,23	0,13	0,39	0,57	5,55
Glicina	0,36	0,16	0,19	0,16	0,20	0,32	2,01
Isoleucina	0,31	0,10	0,11	0,13	0,16	0,29	2,04
Leucina	0,73	0,26	0,34	0,29	0,29	1,08	3,40
Ác. Glutâmico	0,94	0,36	0,42	0,35	0,39	1,65	8,82
Lisina	0,24	0,10	0,11	0,06	0,14	0,24	2,95
Cistina	0,03	0,00	0,00	0,00	0,04	0,07	0,54
Metionina	0,10	0,00	0,04	0,03	0,01	0,18	0,59
Fenilalanina	0,32	0,13	0,19	0,13	0,19	0,43	2,20
Tirosina	0,20	0,07	0,11	0,06	0,24	0,35	1,90
Treonina	0,20	0,07	0,08	0,06	0,11	0,27	1,76
Triptofano	0,04	-	-	-	0,15	0,04	0,49
Prolina	0,55	0,23	0,30	0,25	0,51	0,77	2,29
Valina	0,42	0,20	0,27	0,19	0,19	0,41	2,08
Histidina	0,15	0,07	0,08	0,06	0,08	0,24	1,22
Serina	0,23	0,07	0,11	0,06	0,23	0,43	2,43
Soma aminoácidos	6,23	2,37	3,01	2,42	3,75	8,51	46,00

V1 = Silagem de milho utilizada no primeiro período; V2 = Silagem de milho utilizada no segundo período; V3 = Silagem de milho utilizada no terceiro período; V4 = Silagem de milho utilizada no quarto período.

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; NDT = nutrientes digestíveis totais; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDA = fibra insolúvel em detergente ácido; MM = matéria mineral; Ca = cálcio; P = fósforo; AA = aminoácidos.

Tabela 2: Efeito da suplementação de dietas de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja no consumo e valores de eficiência

Variável	Dietas				EPM	Estimativas dos contrastes			
	O+LM	OLM	OS	LM		LIPÍDEO	AA	LIPxAA	COMPLEXO
Cons. PB	4,03	3,90	3,97	4,02	0,058	0,06	-0,10	0,16	0,23
Cons. N	0,64	0,63	0,64	0,64	0,009	0,01	-0,02	0,03	0,04
Cons. FDN	8,30	8,05	8,24	8,37	0,117	-0,19	-0,06	-0,13	0,24
Cons. EE	0,92	0,90	0,92	0,70	0,014	0,21***	0,17	0,22***	0,02
Pleite/PBcons.	0,26	0,26	0,25	0,27	0,010	-0,01	-0,00	-0,01	-0,01

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexado com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Lisina e metionina. LIPÍDEO =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{LM}$ ; AA =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{OS}$ ; LIPxAA =  $X^{OS} - X^{LM}$ ; COMPLEXO =  $X^{O+LM} - X^{OLM}$ ; EPM = Erro padrão da média; P = Proteína do leite; PB = Proteína bruta; N = Nitrogênio; FDN = Fibra em detergente neutro.

\*\*\*  $P \leq 0,01$

Tabela 3: Avaliação de ácido úrico, creatina e alantoína de vacas suplementadas com lisina e metionina associados ou não com óleo de soja

Variável	Dietas				EPM	Estimativas dos contrastes			
	O+LM	OLM	OS	LM		LIPÍDEO	AA	LIPxAA	COMPLEXO
Ác. Úrico, mmol/l	2,19	2,24	2,22	2,67	0,105	-0,45***	-0,00	-0,45***	-0,04
Creatinina, mmol/l	5,90	5,89	5,60	5,61	0,212	0,28	0,30	-0,01	0,01
Alantoína, mmol/l	17,39	17,18	17,57	18,30	0,518	-1,02*	-0,28	-0,74	0,21

O+LM = Controle; OLM = Aminoácidos complexado com óleo; OS = Óleo de soja; LM = Lisina e metionina. LIPÍDEO =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{LM}$ ; AA =  $(X^{O+LM} + X^{OLM})/2 - X^{OS}$ ; LIPxAA =  $X^{OS} - X^{LM}$ ; COMPLEXO =  $X^{O+LM} - X^{OLM}$ ; EPM = Erro padrão da média.

\*  $P \leq 0,10$

\*\*\*  $P \leq 0,01$

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALVES, D. D. Nutrição aminoacídica de bovinos. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 10, n. 3, p. 265-271, 2004.

ANNISON, E. F. The role of protein which escapes ruminal degradation. In: Recent advances in animal nutrition in Australia. Armidale: Australia, University of New England Publishing Unit: Ed. Farrell, D. J. p. 40-41, 1981.

ARMENTANO, L. E.; BERTICS, S. J.; DUCHARME, G. A. Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diets based on alfalfa and heated soybeans. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n.6, p. 1194-1199, 1997.

BALCH, C. C.; CAMPLING, R. C. Rate of passage of digesta through the ruminant digestive tract. In: DOUGHERTY, R. W., *Physiology of digestion in the ruminant*. Butterworths, Washington, 1965. 108 p.

BAUMGARD, L. H.; SANGSTER, J. K.; BAUMAN, D. E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 1764–1769, 2001.

BENEFIELD, B. C.; PATTON, R. A.; STEVENSON, M. J. *et al.* Evaluation of rumen-protected methionine sources and period length on performance of lactating dairy cows within Latin squares. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 9, p. 4448-4455, 2009.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. *et al.* *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Editora Gráfica, 2006. p. 272-283.

BERTHIAUME, R.; THIVIERGE, M. C.; PATTON, R. A. *et al.* Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 5, p. 1621-1634, 2006.

BLUM, J. W.; BRUCKMAIER, R. M.; JANS, F. Rumen-protected methionine fed to dairy cows: Bioavailability and effects on plasma amino acid pattern and plasma metabolite and insulin concentrations. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 9, p. 1991-1998, 1999.

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

BRODERICK, G. A.; STEVENSON, M. J.; PATTON, R. A. *et al.* Effects of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 3, p. 1092-1102, 2008.

BRODERICK, G. A.; STEVENSON, M. J.; PATTON, R. A. Effects of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 6, p. 2719-2728, 2009.

BURGESS, P. L.; MULLER, L. D.; VARGA, G. A., *et al.* Addition of calcium salts of fatty acid to rations varying in neutral detergent fiber content for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 70, Suppl., p. 220, 1987.

BUTLER, W. R. Symposium: optimizing protein nutrition for reproduction and lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, 1998.

BYLUND, G. Primary production of milk. Dairy processing handbook. Lund, Sweden: Teknotext AB. Tetra Park Processing Systems, 1995. p. 1-13.

CABRITA, A. R. J.; FONSECA, A. J. M.; DEWHURST, R. J. *et al.* Nitrogen supplementation of corn silages. 1. Effects on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 12, p. 4008-4019, 2003.

CANALE, C. J.; MULLER, L. D.; MCCAHERN, H. A. *et al.* Dietary fat and ruminally protected amino acids for high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 73, n. 1, p. 135-141, 1990.

CASPER, D. P.; SCHINGOETHE, D. J. Protected methionine supplementation to a barley-based diet for cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 4, p. 164-172, 1988.

CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of protein and amino acids. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 8, p. 1198-1218, 1974.

CHALUPA, W.; SNIFFEN, C. J. Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle. *The veterinary clinics of North America – Food Animal Practise*, v.7, n. 2, p.353, 1991.

CHALUPA, W.; GALLIGAN, D. T.; FERGUSON, J. D. Animal nutrition and management in the 21<sup>st</sup> century: dairy Cattle. *Animal Feed Science Technology*, v. 58, n. 1, p. 1-18, 1996.

CHASE, L. E. Environmental considerations in developing dairy rations. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FEED MANUFACTURERS, 1994, Rochester, NY. Cornell Univ., Ithaca, NY. P. 56-62.

CHEN, X. B.; HOVELL, F. D. D.; ORSKOV, E. R. *et al.* Excretion of purine derivatives by ruminants: Effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *British Journal of Nutrition*, v. 63, p. 131-142, 1990.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. Bucksburnd, Aberdeen:Rowett Research Institute, 1992. 21 p.

CHEN, Z. H., BRODERICK, G. A., LUCHINI, N. D. *et al.* Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 4, p. 1978-1988, 2011.

CHILLIARD, Y.;DOREAU, M. Influence of supplementary fish oil and rúmen protected methionine on milk yield and composition in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, v. 64, p. 173-179, 1997.

CHOUINARD, P. Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D. M.*et al.* Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows.*Journal of Nutrition*, v. 129, n. 8, p. 1579–1584, 1999.

CHOW, J. M.; DEPETERS, E. J.; BALDWIN, R. L. Effect of rúmen-protected methionine and lysine on casein in milk when diets high in fat or concentrate are fed. *Journal of Dairy Science*, v. 73, n. 4, p. 1051-1061, 1990.

CLARK, J. H. Lactation responses to postruminal administration of proteins and amino acids. *Journal of Dairy Science*, v.58, n. 8, p. 1178 – 1197, 1975.

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

DAVIDSON, S.; HOPKINS, B. A.; ODLE, J.*et al.* Supplementing limited methionine diets with rúmen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 4, p. 1552-1559, 2008.

DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J.; FRANKE, A. A.*et al.* Effects of feeding whole cottonseed on composition of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 68, n. 4, p. 897-902, 1985.

DEPETERS, E. J.; CANT, J. P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 8, p. 2043-2070, 1992.

DEWHURST, R. J.; MITTON, A. M.; OFFER, N. W.*et al.* Effects of the composition of grass silages on milk production and nitrogen utilization by dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 62, p. 25-34, 1996.

DINN, N. E.; SHELFORD, J. A.; FISHER, L. J. Use of the Cornell net carbohydrate and protein system and rúmen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n.1, p. 229-237, 1998.

DOEPEL, L.; PACHECO, D.; KENNELLY, J. J. *et al.* Milk protein synthesis as a function of amino acids supply. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 5, p. 1279-1297, 2004.

DONKIN, S. S.; VARGA, G. A.; SWEENEY, T. F. *et al.* Rúmen-protected methionine and lysine: effects on animal performance, milk protein yield, and physiological measures. *Journal of Dairy Science*, v. 72, n. 6, p. 1484-1491, 1989.

DUNKLEY, W. L.; SMITH, N. E.; FRANKE, A. A. Effects feeding protected tallow on composition of milk and milk fat. *Journal of Dairy Science*, v. 60, n. 12, p. 1863-1869, 1977.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: AVALIAÇÃO METABÓLICO-NUTRICIONAL DE VACAS LEITEIRAS POR MEIO DE FLUIDOS CORPORAIS, 2002, Gramado. *Anais do curso realizado no 29<sup>o</sup> Congresso Nacional de Medicina Veterinária*. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 5-17.

GRAVERT, H.O. Breeding of dairy cattle. In: Dairy cattle production. New York: Elsevier Science, 1987. p.35-76.

GUINARD, J.; RULQUIN, H. Effect of graded levels of duodenal infusions of casein on mammary uptake in lactating cows. 2. Individual amino acids. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 11, p. 3304-3315, 1994.

HANNAH, S. M.; COCHRAN, R. C.; VANZANT, E. S. *et al.* Influence of protein supplementation on site and extent of digestion, forage intake, and nutrient flow characteristics in steers consuming dormant bluestem-range forage. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 2624-2633, 1991.

HARMON, D. L.; RICHARDS, C.J. Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 2248-2255, 1997.

HART, F. J.; LEIBHOLZ, J. A note on the flow of endogenous protein to the omasum and abomasums of steers. *Animal Production*, v. 51, p. 217-219, 1990.

HARVATINE, K. J.; PERFIELD, J. W.; BAUMAN, D. E. Expression of Enzymes and Key Regulators of Lipid Synthesis Is Upregulated in Adipose Tissue during CLA-Induced Milk Fat Depression in Dairy Cows<sup>1–3</sup>. *Journal of Nutrition*, v. 139, p. 849-854, 2009.

HEITMANN, R. N.; HOOVER, W. H.; SNIFFEN, C. J. Gluconeogenesis from amino acids in mature wether sheep. *Journal of Nutrition*, v. 103, p. 1587-1593, 1973.

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

ILLG, D. J.; SOMMERFELDT, J. L.; SHINGOETHE, D. J. Lactational and systemic responses to the supplementation of protected methionine in soybean meal diets. *Journal of Dairy Science*, v. 70, n. 3, p. 620 – 629, 1987.

JENKINS, T. C.; JENNY, B. F. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 72, n. 9, p. 2316-2324, 1989.

JENKINS, T. C.; FATOUHI, N. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *Journal of Animal Science*, v. 68, p. 460-466, 1990.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

JUDSON, G. J.; LENG, R. A. Studies on the control of gluconeogenesis in sheep: effect of glucose infusion. *British Journal of Nutrition*, v. 29, p. 159-174, 1973.



KAMALAK, A.; CANBOLAT, O.; GÜRBÜZ, Y.*et al.* Protected protein and amino acids ruminant nutrition. *Journal of Science and Engineering*, v. 8, p. 84-88, 2005.

KANEKO, J. J. Apendices. In: KANEKO, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1989. p.877-901.

KAUFMAN, W.; LUPPING, W. Protected proteins and protected amino acids for ruminants. In: MILLER, E.L, PIKE, I.H AND VANES, A.J.H. (Eds.). *Protein contribution of feedstuffs for ruminants*. London: Butterworths, 1982, p. 36-68.

KING, K. J.; BERGEN, W. G.; SNIFFEN, A. L.*et al.* An assessment of absorbable lysine requirements in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 8, p. 2530-2539, 1991.

KROBER, T. F.; SUTTER, F.; SENN, M.*et al.* Effects of supplying leucine and methionine to early lactating cows fed silage concentrate based diets with a calculated deficiency in leucine and methionine. *Animal Research*, v. 50, p. 5-20, 2001.

LAPIERRE, H.; RAGGIO, G.; BERTHIAUME, R.*et al.* The route of absorbed nitrogen into milk protein. *Journal of Animal Science*, v. 80, p. 11-22, 2005.

LAPIERRE, H.; PACHECO, D.; BERTHIAUME, R. *et al.* What is the supply of amino acids for a dairy cow? *Journal of Dairy Science*, v. 89,E. Suppl., p. E1 – E14, 2006.

LARA, A.; MENDOZA, G. D.; LANDOIS, L.*et al.* Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livestock Science*, v. 105, p. 105-108, 2006.

LARSON, B. L. Biosynthesis and cellular secretion of milk. In: LARSON, B. L. *Lactation*. 2. ed. Iowa: The Iowa State University Press, 1995. p. 147-151.

LEONARDI, C. *Effect of methionine supplementation on productive performance of dairy cattle*. 2001. 37f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - University of Wisconsin, Madison.

LEONARDI, C.; STEVENSON, M.; ARMENTANO, L. E. Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 12, p. 4033-4042, 2003.

MABJEESH, S. J.; ARIELE, A.; BRUCKENTAL, I. *et al.* Effect of ruminal degradability of crude protein and nonstructural carbohydrates on the efficiency of bacterial crude protein synthesis and amino acid flow to the abomasum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 11, p. 2939 – 2949, 1997.

MADALENA, F. E. Valores econômicos para a seleção de gordura e proteína do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 3, p. 678-684, 2000.

MCALLAN, A. B. The fate of nucleic acids in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 41, p. 309-317, 1982.

MOHAMED, O. E.; SATTER, L. D.; GRUMMER, R. R. *et al.* Influence of Dietary Cottonseed and Soybean on Milk Production and Composition. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 10, p. 2677-2688, 1988.

MUNNEKE, R. L.; SCHINGOETHE, D. J.; CASPER, D. P. Lactational evaluation of ruminally protected methionine in diets containing extruded soybeans and urea. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 1, p. 227-233, 1991.

NUTRIENT Requirements of Dairy Cattle. 7 ed.. Washington: NRC, 2001. No texto: Nutrient Requirements of Dairy Cattle (2001).

OFFICIAL methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16. ed. Washington, D.C.: AOAC, 1997. No texto: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1997).

ORSKOV, E. R.; MACLEOD, N. A.; KYLE, D. J. Flow of nitrogen from the rumen and abomasum in cattle and sheep given protein-free nutrients by intragastric infusion. *British Journal of Nutrition*, v. 56, p. 241-248, 1986.

OVERTON, T. R.; LACOUNT, D. W.; CICELA, T. M. *et al.* Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. *Journal of Dairy science*, v. 79, n. 3, p. 631-636, 1996.

OVERTON, T. R.; EMMERT, L. S.; CLARK, J. H. Effects of source of carbohydrate and protein and rumen-protected methionine on performance of cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 1, p. 221-228, 1998.

PAPAS, A. M.; SNIFFEN, C. J.; MUSCATO, T. V. Effectiveness of rumen-protected methionine for delivering methionine post-ruminal on dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 3, p. 545-552, 1984.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 5, p. 2105-2118, 2010.

PISULEWSKI, P. M.; RULQUIN, H.; PEYRAUD, J. L. *et al.* Lactational and systemic responses to post-ruminal infusions of increasing levels of methionine in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 79, n. 10, p. 1781-1791, 1996.

POLAN, C. E.; CUMMINS, K. A.; SNIFFEN, C. J. *et al.* Responses of dairy cows to supplemental rumen-protected forms of methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 12, p. 2997-3013, 1991.

RAGGIO, G.; PACHECO, D.; BERTHIAUME, R. *et al.* Effect of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 10, p. 3461-3472, 2004.

ROBINSON, P. H.; CHALUPA, W.; SNIFFEN, C. J. *et al.* Influence of post-ruminal supplementation of methionine and lysine, isoleucine, or all three amino acids on intake and

chewing behavior, ruminal fermentation, and milk and milk component production. *Journal of Animal Science*, v. 77, p. 2781-2792, 1999.

ROGERS, J. A.; RISHNAMOORTHY, U.; SNIFFEN, C. J. Plasma amino acids and milk protein production by cows fed rúmen – Protected Methionine and Lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 70, n. 4, p. 789-798, 1987.

RULQUIN, H.; PISULEWSKI, P. M.; VÉRITÉ, R. *et al.* Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: A nutrient-response approach. *Livestock Production Science*, v. 37, p. 69-90, 1993.

RULQUIN, H.; DELABY, L. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rúmen-protected methionine. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 10, p. 2513-2522, 1997.

SAMUELSON, D. J.; DENISE, S. K.; ROFFLER, R. *et al.* Response of Holstein and Brown Swiss cows fed alfalfa hay-based diets to supplemental methionine at two stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 4, p. 917-928, 2001.

SANTOS, F.A.P. Metabolismo das proteínas In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.

SANTOS, F. A. P.; GRECO, L. F. Digestão pós ruminal de proteínas e exigências de aminoácidos para ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 1., 2007, Pirassununga. *Anais...* Pirassununga: USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. p. 122-159.

SANCANARI, J. B. D.; EZEQUIEL, J. M. B.; GALATI, R. L. *et al.* Efeito da metionina protegida e não protegida da degradação ruminal sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 1, p. 286 – 294, 2001.

SCHINGOETHE, D. J.; CASPER, D. P.; YANG, C. *et al.* Lactational response to soybean meal, heated soybean meal, and extruded soybeans with ruminally protected methionine. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 1, p. 173-180, 1988.

SCHWAB, C. G.; SATTER, L. D.; CLAY, A. B. Response of lactating cows to abomasal infusion of amino acids. *Journal of Dairy Science*, v. 59, p. 1254, 1976.

SCHWAB, C. G.; BOZAK, C. K. Production response to duodenal infusion of methionine and lysine at peak lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 71, Suppl., p. 160, 1988.

SCHWAB, C. G.; BOZAK, C. K.; WHITEHOUSE, N. L. *et al.* Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 3486-3502, 1992.

SCHWAB, C. G.; WHITEHOUSE, N. L.; MCLAUGHLIN, A. M. *et al.* Use of milk protein concentrations to estimate the “methionine bioavailability” of two forms of 2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid (HMB) for lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, Suppl., p. 35, 2001.

SMITH, B. P. *Tratado de medicina interna de grandes animais: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos*. São Paulo: Manole, 1993. p. 1738.

SOCHA, M. T.; PUTNAM, D. E.; GARTHWAITE, B. D. *et al.* Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 3, p. 1113-1126, 2005.

SOCHA, M. T.; SCHWAB, C. G.; PUTNAM, D. E. *et al.* Extent of methionine limitation in peak-, early-, and mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 5, p. 1996-2010, 2008.

TAMMINGA, S.; SCHULZE, H.; VANBRUCHEM, J. *et al.* Nutritional significance of endogenous N-losses along the gastrointestinal tract of farm animals. *Archives of Animal Nutrition*, v. 48, p. 9-22, 1995.

The SAS system for windows Version 8.0. Nashville: SAS Institut, 1999. CD-ROM. No texto: SAS system for windows (1999).

TYRREL, H.F.; REID, J.T. Prediction of the energy value of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, v. 48, n. 9, p. 1215-1223, 1965.

VALADARES, R.F. D.; GONÇALVES, L. C.; SAMPAIO, I.B. *et al.* Níveis de proteína em dietas de bovinos 4. Concentrações de ureia plasmática e excreções de ureia e creatinina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.26, n.6, p.1270-1278, 1997.

VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; TOIVONEN, V. *et al.* Response of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 12, p. 2674-2685, 1999.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

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

VARVIKKO, T.; VANHATALO, A.; JALAVA, T., *et al.* Lactation and metabolic responses to graded abomasal doses of methionine and lysine in cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 12, p. 2659-2673, 1999.

VIRTANEN, A. I. Milk production of cows on protein – free feed. *Journal of Dairy Science*, v. 153, n. 3744, p. 1603-1614, 1966.

WILDMAN, E. E., JONES, G. M., WAGNER, P. E. *et al.* A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WILTROUT, D. W.; SATTER, L. D. Contribution of propionate to glucose synthesis in the lactating and nonlactating cow. *Journal of Dairy Science*, v. 55, n. 3, p. 307-317, 1972.

XU, S.; HARRISON, J. H.; CHALUPA, W. *et al.* The effect of ruminal bypass lysine and methionine on milk yield and composition of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 4, p. 1062-1077, 1998.