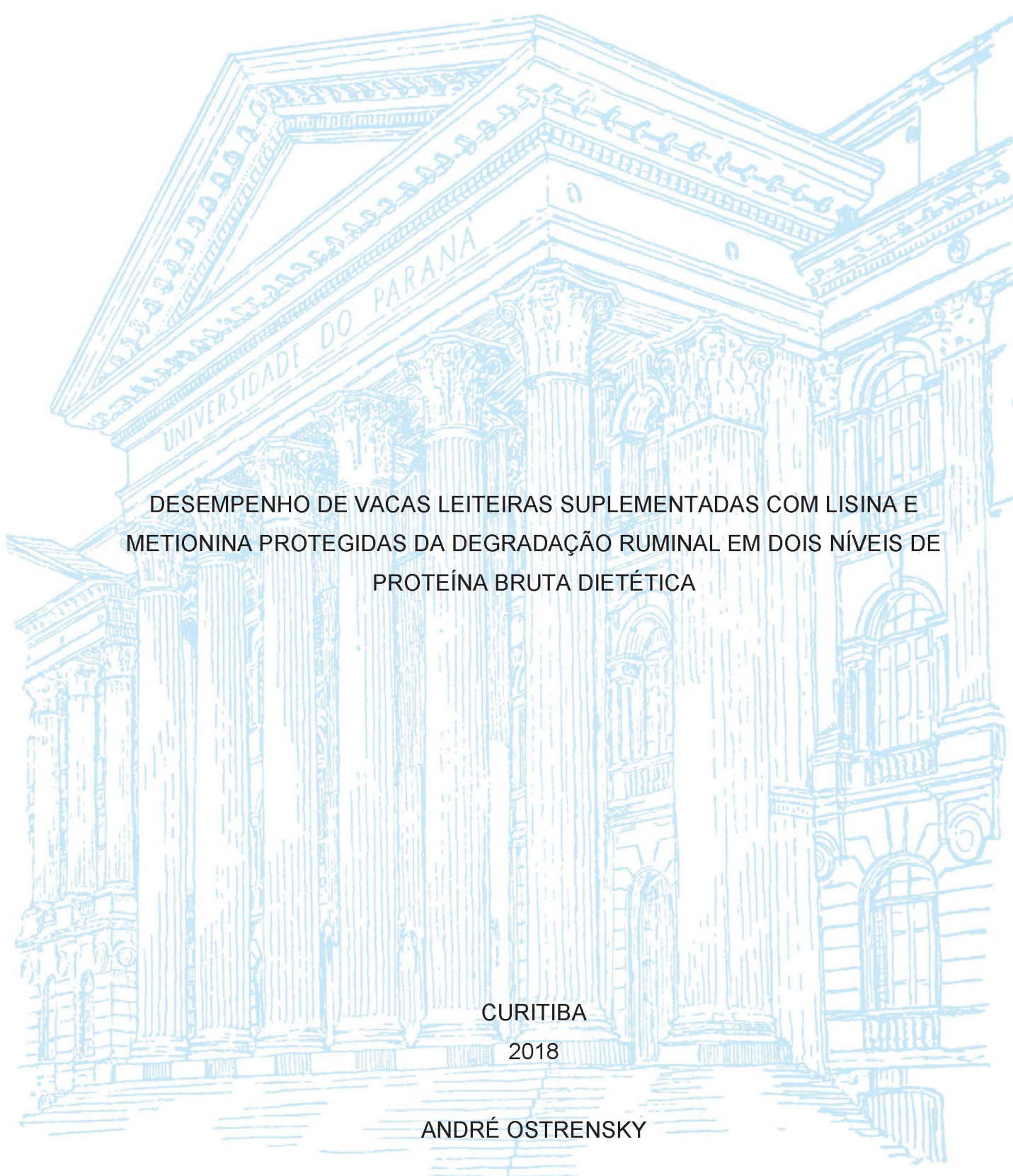


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ OSTRENSKY



DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM LISINA E
METIONINA PROTEGIDAS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL EM DOIS NÍVEIS DE
PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA

CURITIBA

2018

ANDRÉ OSTRENSKY

DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM LISINA E
METIONINA PROTEGIDAS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL EM DOIS NÍVEIS DE
PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Zootecnia, no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida.
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Neves Pereira.

CURITIBA

2018

Ostrensky, André
OS85d Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com lisina e metionina protegidas da degradação ruminal em dois níveis de proteína bruta dietética / André Ostrensky. - Curitiba, 2018. 106 p.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.
Orientador: Rodrigo de Almeida
Coorientador: Marcos Neves Pereira

1. Aminoácidos na nutrição animal. 2. Proteínas na nutrição animal. 3. Bovino de leite – Nutrição. I. Almeida, Rodrigo de. II. Pereira, Marcos Neves. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.2.034.084



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANDRE OSTRENSKY** intitulada: **Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com lisina e metionina protegidas da degradação ruminal em dois níveis de proteína bruta dietética**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Abril de 2018.

RODRIGO DE ALMEIDA
Presidente da Banca Examinadora

ALEX MAIORKA
Avaliador Interno

RONALDO BRAGA REIS
Avaliador Externo

SIMONE GISELE DE OLIVEIRA
Avaliador Interno

LEANDRO FERREIRA GRECO
Avaliador Externo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA

ATA Nº0152018

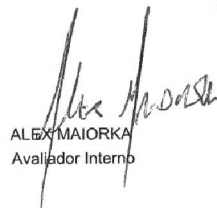
**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM ZOOTECNIA**

No dia vinte e cinco de abril de dois mil e dezoito às 08:00 horas, na sala Anfiteatro do Hospital Veterinário, Setor de Ciências Agrárias da UFPR, foram instalados os trabalhos de arguição do doutorando **ANDRE OSTRENSKY** para a Defesa Pública de sua tese intitulada **Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com lisina e metionina protegidas da degradação ruminal em dois níveis de proteína bruta dietética**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: RODRIGO DE ALMEIDA (UFPR), ALEX MAIORKA (UFPR), RONALDO BRAGA REIS (UW MADIS), SIMONE GISELE DE OLIVEIRA (UFPR), LEANDRO FERREIRA GRECO (UF), . Dando início à sessão, a presidência passou a palavra ao discente, para que o mesmo expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. O aluno respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO do aluno. O doutorando foi convidado a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, RODRIGO DE ALMEIDA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

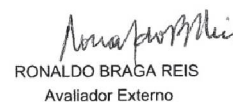
Curitiba, 25 de Abril de 2018.



RODRIGO DE ALMEIDA
Presidente da Banca Examinadora



ALEX MAIORKA
Avaliador Interno



RONALDO BRAGA REIS
Avaliador Externo



SIMONE GISELE DE OLIVEIRA
Avaliador Interno



LEANDRO FERREIRA GRECO
Avaliador Externo

Dedico este trabalho à minha família, em especial a meus irmãos, Antonio e Eunice, que sempre acreditaram na minha capacidade e me apoiaram. Também à Luciene e ao Eduardo, com a paciência e apoio incondicionais à realização deste trabalho. Mas, acima de tudo, ao meu pai, Eugênio e à minha mãe, Leda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os alunos da PUCPR e da UFPR que me apoiaram e se dedicaram acima das expectativas para realizar com afinco o experimento: Kamila Rausis, Carolina Maguerroski, Amanda Moro dos Santos, Rebecca Mayre de Jesus, Bruna Becker, Letícia Schmeil, Ana Letícia Poletto, Daniele Moro e Ana Paula Murara.

Agradeço ao Rafael Canonenco, que facilitou muitas coisas do projeto.

Agradeço ao Alceu Miguel Grebogi, coordenador do Setor de Bovinocultura de Leite da FEGA e à equipe.

Agradeço à Amanda Anater, pelo valioso apoio nas atividades laboratoriais.

Agradeço ao Giancarlo Negro, pela dedicação acima de qualquer condição.

Meu profundo agradecimento ao então mestrando e atualmente doutorando Deivid Roni Ribeiro, a quem eu devo grande parte da realização desta tese.

Meu profundo agradecimento à Kemin, pelo apoio e paciência que, com todos os percalços administrativos, acreditou no projeto e propiciou a sua realização.

Agradeço ao co-orientador Prof. Marcos Neves Pereira, pela ideia, pelo apoio e por toda a parte de Minas Gerais do projeto, junto com a Julia Diane Lima Dias e com a Rayana Brito da Silva, pelas valiosas dicas.

Um especial agradecimento ao meu orientador, Prof. Rodrigo de Almeida, que sempre acreditou em mim e me abriu as portas para esta etapa tão importante da minha formação.

Agradeço à minha família, em especial aos meus irmãos, Antonio e Eunice, à Tia Halha e ao Dennis, por sempre me incentivarem e me cobrarem o andamento do projeto; à minha querida Mãe e ao meu Pai, sempre presentes na minha vida.

Um agradecimento muito especial à minha esposa, Luciene, e ao meu filho Eduardo, que me ajudaram e ajudam muito e que tantas vezes me esperaram e aceitaram minha ausência para os compromissos do projeto.

Agradeço a Deus, pela vida e por permitir conhecer e conviver com todas estas pessoas.

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz.

(Almir Sater)

RESUMO

Tem havido interesse crescente na cadeia produtiva do leite pela otimização da nutrição proteica de vacas em lactação. A revisão de literatura mostra que a redução da proteína bruta (PB) na dieta para valores muito baixos compromete a produção de leite, mas valores elevados resultam em aumento da excreção de nitrogênio e redução da eficiência em sua utilização. Neste contexto, a suplementação de lisina e metionina protegidas da degradação ruminal (LMPR) pode suprir possível exigência de aminoácidos (AA) na proteína metabolizável (PM), visando aumento de produção de leite e de componentes do leite. Este projeto objetivou, em um primeiro experimento: avaliar a suplementação de teores crescentes de LMPR em dietas com valores mínimos de PB dietética e PM ajustada, com ênfase na produção e composição de leite e na eficiência da síntese de proteína microbiana ruminal. No segundo experimento, avaliar o uso de dois teores de PB dietética, sem e com suplementação de LMPR sobre o desempenho de vacas (parâmetros de produção e composição de leite; do metabolismo nitrogenado; de peso vivo e de escore de condição corporal). No primeiro experimento, o fornecimento de PM adequada, com PB de 16% e em três teores de LMPR não resultou em aumento de produção de leite ou de sólidos no leite e tampouco alterou a concentração plasmática de AA, exceto pela redução linear de metionina (2,05 vs. 2,02 vs. 2,00 vs. 1,99% dos AA essenciais), para os tratamentos controle, baixa, média e alta suplementação de LMPR na PM, respectivamente. Supõe-se que a ausência de resposta aos suplementos envolveu redução da digestão da dieta no trato total e redução da ingestão de matéria seca, provavelmente por redução da síntese de proteína microbiana. No segundo experimento, a elevação da PB (15,1 vs. 16,5% MS) resultou em aumento dos teores de proteína leite (3,27 vs. 3,32%), de caseína no leite (2,48 vs. 2,53%), sem alterar a produção de leite ou produção de proteína. Houve aumento da excreção de nitrogênio ureico no leite e na urina. Fornecer LMPR reduziu a concentração de glicose plasmática, aumentou o teor de nitrogênio ureico urinário (413,6 vs. 448,6 mg/dL, respectivamente para os grupos sem e com suplementação de LMPR) e os derivados de purina, indicando possível aumento da produção de proteína microbiana, mas não teve impacto sobre produção de leite ou de componentes do leite.

Palavras-chave: Aminoácidos. Nutrição proteica. Proteína metabolizável.

ABSTRACT

There has been a growing concern to improve protein nutrition efficiency for dairy cows. The literature review shows an effort to decrease crude protein (PB) levels, but excessive low content may decrease milk production. By the other hand, to increase PB levels results in poor N efficiency. Amino acids (AA) supplementation shall provide limiting AA to metabolizable protein (PM), to improve milk yield and solids in milk yield. This project aimed, in the first trial: to evaluate the effects of increasing levels of rumen protected lysine and methionine (LMPR) supplementation in low PB, but metabolizable protein (PM) sufficient diets, emphasizing milk production, milk solids and the role of rumen microbial synthesis. In the second trial, the objective was to measure the effects of two dietary PB levels, associated or not to LMPR supplementation, in dairy cows performance (milk production, milk components, N metabolism, live weight and body condition score). In the first trial, the 16% PB with enough PM diet and three crescent levels of LMPR supplementation did not result in milk yield or milk components change. Increasing LMPR in PM decreased linearly methionine plasmatic content (2.05 vs. 2.02 vs. 2.00 vs. 1.99% of essential AA, respectively for control, low, medium and high AA in PM, respectively). The absence of lactation response to the AA supplements apparently involved lowered total tract nutrient digestibility and dry matter intake, probably due to the decreased rumen microbial protein. In the second trial, the increasing PB content (15.1 vs. 16.5%) resulted in higher crude milk protein (3.27 vs. 3.32%) and casein content (2.48 vs. 2.43%), however without any response in milk yield and in milk contents yield. There was, also, an increase in and urine milk urea N. To feed LMPR decreased plasmatic glucose content and increased urine ureic N (413.6 vs. 448,6 mg/dL, respectively for the LMPR non-supplemented and supplemented groups) and increased purine derivatives, suggesting a possible rise in microbial protein. However, there was no effect on milk production and contents.

Key-words: Amino acids. Metabolizable protein. Protein nutrition.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 – ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (THI) DENTRO DO ESTÁBULO, DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL	39
FIGURA 4.1 – ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (THI) DENTRO DO ESTÁBULO, DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – COMPOSIÇÃO (EM PERCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) E PARÂMETROS NUTRICIONAIS ANALISADOS EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL	41
TABELA 3.2 – PREDIÇÕES DO NRC (2001), BASEADAS NAS ANÁLISES DE INGREDIENTES E RESULTADOS DE DESEMPENHO EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL.....	42
TABELA 3.3 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE INGESTÃO DE MATÉRIA SECA, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE E PESO VIVO DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	46
TABELA 3.4 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO PLASMA (g/100 g DE PLASMA) DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	47
TABELA 3.5 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO PLASMA (PERCENTAGEM DO TOTAL DE AMINOÁCIDOS) DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	48
TABELA 3.6 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO PLASMA (PERCENTAGEM DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS) DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	49
TABELA 3.7 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE PARÂMETROS DE DIGESTIBILIDADE E EXCREÇÃO DE ALANTOÍNA EM VACAS EM LACTAÇÃO.....	50
TABELA 4.1 – COMPOSIÇÃO (EM PERCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA, SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL.....	67

TABELA 4.2 – PREDIÇÕES DO NRC (2001) EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA, SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL.....	68
TABELA 4.3 – RESULTADOS MÉDIOS DAS ANÁLISES BROMATOLÓGICAS DOS ALIMENTOS E DA DIETA BASE, EM EXPERIMENTO COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA, SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL.....	70
TABELA 4.4 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	75
TABELA 4.5 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E ZOOTÉCNICOS DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	77
TABELA 4.6 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	79
TABELA 4.7 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E ZOOTÉCNICOS DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	81
TABELA 4.8 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DOIS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA, SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	83
TABELA 4.9 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DOIS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA, SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E ZOOTÉCNICOS DE VACAS EM LACTAÇÃO.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Aminoácidos
AAE	- Aminoácidos essenciais
AAANE	- Aminoácidos não essenciais
APCBRH	- Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
Arg	- Arginina
BCAA	- Aminoácidos de cadeia ramificada
DEL	- Dias em lactação
DP	- Derivados de purina
His	- Histidina
IMS	- Ingestão de matéria seca
LMPR	- Lisina e metionina protegidos da degradação ruminal
Leu	- Leucina
Lys	- Lisina
Met	- Metionina
MPR	- Metionina protegida da degradação ruminal
MS	- Matéria seca
N	- Nitrogênio
NNP	- Nitrogênio não proteico
NRC	- National Research Council
NUL	- Nitrogênio ureico no leite
NUP	- Nitrogênio ureico plasmático
PB	- Proteína bruta
PDR	- Proteína degradável ruminal
PM	- Proteína metabolizável
PMic	- Proteína microbiana
PNDR	- Proteína não degradável ruminal
PO	- Ponto de orvalho
PV	- Peso vivo
RPAA	- Aminoácidos protegidos da degradação ruminal
THI	- Índice de temperatura e umidade
Trp	- Triptofano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	INTRODUÇÃO.....	22
2.2	EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO	23
2.3	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA E LISINA PROTEGIDAS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL EM DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO	27
2.4	REFERÊNCIAS	33
3	CAPÍTULO 2: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE TEORES CRESCENTES DE METIONINA E LISINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL PARA VACAS EM LACTAÇÃO	36
3.1	INTRODUÇÃO.....	38
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
3.3	RESULTADOS	45
3.4	DISCUSSÃO	50
3.5	CONCLUSÕES.....	56
3.6	REFERÊNCIAS	57
4	CAPÍTULO 3: SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL, EM DOIS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA	60
4.1	INTRODUÇÃO.....	62
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.2.1	ANIMAIS UTILIZADOS E DESCRIÇÃO DAS INSTALAÇÕES.....	64
4.2.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	65
4.2.3	DIETAS EXPERIMENTAIS.....	66
4.2.4	COLETA DE INFORMAÇÕES.....	69
4.2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
4.3	RESULTADOS	74
4.3.1	EFEITOS DO TEOR DE PROTEÍNA BRUTA DA DIETA	74
4.3.2	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO OU NÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL.....	78

4.3.3	EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE O TEOR DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA E FORNECIMENTO OU NÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS RUMINALMENTE.....	82
4.4	DISCUSSÃO	86
4.5	CONCLUSÕES.....	91
4.6	REFERÊNCIAS	91
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
5.2	AGRADECIMENTOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

O consumo de leite no mundo terá aumentos significativos nos próximos anos e o Brasil figura como um dos países mais promissores para atender a este aumento de demanda, por reunir várias condições favoráveis. Por outro lado, há demanda da sociedade para que esta produção ocorra com aumento de produtividade e não com aumento das unidades de produção e para que a produção seja cada vez mais sustentável.

E para que os animais alcancem elevada e eficiente produção leiteira, há a necessidade de maior precisão na nutrição proteica, fazendo com que a proteína dietética não seja fornecida em excesso em relação às necessidades decorrentes da produção.

Em face disto, tem havido no Brasil o fortalecimento dos sistemas de pagamento do leite ao produtor com base na composição do produto. Volume de leite continua sendo valorizado, com bonificação para maiores produções diárias. Entretanto, acredita-se que cada vez mais haverá valorização da produção de proteína e mesmo da gordura do leite. Além disto, a busca por maior eficiência na nutrição proteica das vacas em lactação justifica-se também pelo custo que este nutriente representa e pelo maior risco de eliminação de nitrogênio (N) para o meio ambiente.

Para atender a esta demanda, a formulação de dietas para vacas em lactação tem ido além dos conceitos de proteína bruta (PB), proteína degradável (PDR) e não degradável ruminal (PNDR) e incorpora cada vez mais os conceitos de proteína metabolizável (PM) e de aminoácidos (AA) em percentual da PM.

Os dois principais AA limitantes para a síntese de proteína pela glândula mamária são a lisina (Lys) e a metionina (Met), baseado nos ingredientes comumente utilizados. Desta forma, a suplementação de AA protegidos da degradação ruminal na dieta, no Brasil, ganha força pela limitada disponibilidade de suplementos de origem vegetal que visam melhorar o fornecimento de PM e pela proibição do uso de suplementos proteicos de origem animal na alimentação de ruminantes.

Na literatura, há estudos, que serão abordados pela revisão adiante, avaliando os efeitos da suplementação de AA protegidos, mas os resultados também são variados, em razão do teor de produção dos animais em questão, das quantidades

de AA suplementados, dos teores de PB dietética e de outros fatores. Porém, não há informações de trabalhos realizados nas condições usuais do Brasil, quando se trata da suplementação de lisina associada à metionina, ambas em formato protegido da ação microbiana ruminal (LMPR) e especialmente em diferentes teores de PB dietética. O interesse em avaliar o uso de LMPR nas condições brasileiras se deve às particularidades de composição bromatológica, genética dos animais, clima e mercado, entre outros.

Há, portanto, uma demanda na cadeia produtiva do leite no Brasil em se detalhar os possíveis efeitos do balanceamento de LMPR para vacas em lactação sobre parâmetros produtivos e sobre indicadores do metabolismo de nitrogênio destes animais, com destaque à interação com o teor de PB da dieta.

A fim de se atingirem os objetivos, esta tese foi organizada em capítulos, tomando-se por base a normatização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Paraná, atualizada em 2017.

O Capítulo 1 corresponde à revisão de literatura, abordando-se um resumo do metabolismo proteico, os efeitos do fornecimento de diferentes teores de proteína bruta dietética e a suplementação de lisina e metionina para vacas em lactação.

O Capítulo 2, intitulado “Teores de metionina e lisina na proteína metabolizável para vacas em lactação” tem como objetivo apresentar o experimento inicial, realizado em Ijaci, MG, onde se fixou o teor de proteína metabolizável, comparando-se o controle com três teores de lisina e metionina como proporção da proteína metabolizável.

O Capítulo 3, intitulado “Suplementação de aminoácidos protegidos da degradação ruminal, em dois teores de proteína bruta dietética em rebanho comercial”, que teve como objetivo avaliar a interação entre dois teores de proteína bruta dietética, com e sem a suplementação de lisina e metionina protegidos da degradação ruminal.

A justificativa para a realização do experimento é uma demanda do setor lácteo, que busca otimizar o uso da proteína bruta dietética, visando melhor ajuste de custo ao produtor e também atender a uma demanda da sociedade para racionalizar o uso de nitrogênio na produção de leite. Desta forma, reduz-se a necessidade de uso

de recursos naturais e orienta-se a um menor risco de excreção de nitrogênio ao ambiente.

A hipótese deste trabalho é que a resposta à suplementação de lisina e metionina protegidas da degradação ruminal para vacas leiteiras, em dietas de menor teor de PB que os usualmente praticados em rebanhos comerciais, seja semelhante à resposta em dietas com maior concentração de PB sem suplementação destes aminoácidos, mensurada por meio de parâmetros metabólicos e zootécnicos.

O objetivo geral do projeto foi avaliar os efeitos da suplementação de lisina associada à metionina protegidas da degradação ruminal para vacas de alta produção em lactação.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Avaliar a performance da lactação como resposta aos teores crescentes de lisina e metionina protegidas ruminalmente em dietas com baixos teores de nitrogênio, mas suficientes em proteína metabolizável;
- b) Avaliar os efeitos sobre desempenho zootécnico e parâmetros metabólicos da suplementação lisina e metionina protegidas da degradação ruminal, em dietas com dois teores de proteína bruta para vacas de alta produção em lactação.

2 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO

O objetivo desta revisão é compilar informações sobre a variação dos teores de proteína bruta (PB) dietética e a suplementação de lisina (Lys) e metionina (Met) na dieta de vacas em lactação. Observa-se tendência a reduzir o teor de PB na dieta de vacas leiteiras, visando melhorar a eficiência no uso de N. Tratamentos com menores teores de PB resultam em redução da excreção de N nos dejetos, porém, pode haver redução da ingestão de matéria seca (IMS), redução da produção de leite e da produção de componentes do leite, embora os resultados sejam variáveis. Por outro lado, há aumento da eficiência de uso do N, com redução dos teores de nitrogênio ureico na urina e no leite (NUL). A redução da PB não resultou em decréscimo da porcentagem de gordura no leite e nem do teor de lactose. Demonstrou-se a importância da Met e da Lys como os dois aminoácidos (AA) mais frequentemente limitantes para vacas em lactação, em dietas à base de milho e farelo de soja. O teor de proteína no leite é mais frequentemente responsivo à suplementação de Lys e Met do que a produção de leite em si, especialmente se fornecidos pós-pico de produção. Os aumentos da produção de proteína, como consequência da suplementação de um dos dois AA, Lys ou Met, são mais prováveis de serem preditos quando o teor do outro AA está próximo ou ao teor estimado da exigência. Os resultados da suplementação de Lys e Met são variáveis, especialmente quanto à produção de leite. Em geral, a suplementação de Met resultou em aumento de produção de proteína verdadeira no leite e houve relatos de aumento do teor de gordura no leite, com ligeira redução da IMS. A suplementação de Lys parece ter tido respostas mais variáveis que a da Met isoladamente. Embora também seja variável, sugeriu-se manter a relação 3 Lys: 1 Met na proteína metabolizável (PM) e 6,6 a 7,2% de lisina e 2,2 a 2,4% de metionina na PM, visando maximizar a proteína no leite. As informações compiladas mostram resultados variáveis sobre a produção de leite das vacas suplementadas, sobre produção de componentes do leite e sobre a eficiência do uso de N.

Palavras-chave: Aminoácidos. Nitrogênio ureico. Produção de leite.

ABSTRACT

The objective of this is to review the information on literature regarding crude protein (PB) levels and rumen protected lysine (Lys) and methionine (Met) supplementation (LMPR) for dairy cows. In the last decades there has been a trend to decrease PB, to enhance N efficiency. In treatments where lower PB were fed there was a decrease in N excreted in feces and urine, however in some of them there was a drop in dry matter feed intake (IMS), milk production and milk components production, but the results vary among trials. Some papers show an improvement on N efficiency, since milk urea N and urinary ureic N decreased. To feed lower PB did not impact fat and lactose contents. The importance of Lys and Met as the two most limiting amino acids (AA) for lactating cows is well supported, specially in corn and soybean meal-based diets. Milk protein percentage is shown to be more responsive to LMPR feeding than milk yield, particularly if fed post-peak. It is more feasible to predict milk protein production supplying LMPR when the the other AA level is properly adjusted or very close to the requirement. The response to feed LMPR is variable, specially concerning milk production. In general, increasing Met in the diet increased milk true protein yield and, in some trials, an increase in fat percentage and a slight drop in IMS. To supply Lys seems to have more variable responses than feeding Met. It is suggested do keep the Lys: Met ratio on metabolizable protein (PM) in 3: 1 and to supply 6.6 to 7.2% Lys and 2.2 to 2.4% Met on PM to maximize milk protein. The literature review present variable results on different PB levels and LMPR supply, concerning milk production, milk components and N efficiency.

Key-words: Amino acids. Milk production. Ureic nitrogen.

2.1 INTRODUÇÃO

A nutrição proteica de bovinos leiteiros se baseou, durante muito tempo, apenas no conceito de proteína bruta, que é a quantificação do teor de nitrogênio presente na amostra de alimento, multiplicado por 6,25. Este fator origina-se do conceito que as proteínas possuem, em média, 16% de N em sua composição. Porém, este método não diferencia a origem do N, tornando-se necessária a divisão entre proteína verdadeira e nitrogênio não proteico (NNP), para melhorar a descrição da composição nitrogenada dos alimentos.

Pela dinâmica da digestão dos compostos nitrogenados no rúmen, o NRC (2001) caracterizou a divisão entre PDR e PNDR. Atualmente, é adotado como parâmetro da nutrição proteica a proteína metabolizável (PM), que é a proteína verdadeira disponível para degradação no abomaso e absorção no intestino delgado. A PM compõe-se da PNDR, da proteína microbiana (PMic) e de uma menor fração, a proteína endógena. Como os demais animais de produção, a vaca tem exigência de aminoácidos (AA) e não de proteína em si (NRC, 2001). Assim, torna-se necessário entender o balanço ruminal de nitrogênio, seu fluxo de proteína verdadeira para o abomaso e intestino e a absorção de AA, para que se consiga o melhor perfil de AA essenciais (AAE) na PM, aliado à máxima digestão da PM. Desta forma, visa-se disponibilizar AA para a síntese de proteínas pela vaca para o atendimento das exigências de manutenção, crescimento, lactação, gestação e reprodução.

Objetiva-se fornecer quantidades adequadas de PDR, para que se atendam às exigências microbianas de N para a síntese de PMic, porém sem excedê-las. O excesso de N, na forma de N amoniacal, oriundo da degradação ruminal de compostos nitrogenados, é drenado ao fígado pela veia porta, convertido em ureia que, por sua vez, é lançada na corrente sanguínea, parcialmente reciclada via saliva e excretada, via urina e via leite. Ainda, a otimização da produção de PMic depende grandemente do aporte adequado de carboidratos, o que não é o foco desta revisão.

A eficiência da utilização de N é baixa em vacas leiteiras, com somente 25 a 35% do N consumido da dieta, excretado no leite. Ou seja, do total consumido de N por uma vaca em lactação, esta proporção é utilizada para a síntese de aminoácidos da proteína láctea. Uma fração é utilizada para crescimento, quando for o caso, e reposição de tecidos corporais. O restante é eliminado via urina e fezes (WANG et al.,

2010) e mesmo via leite, na forma de nitrogênio ureico no leite (NUL). A excreção de N nos dejetos é uma função direta da ingestão deste nutriente (YAN et al., 2006), porém, a excreção nas fezes tende a ser menos variável que a encontrada na urina (HYNES et al., 2016). E a maioria deste N no fezes de bovinos pode acabar sendo liberada na atmosfera na forma de emissões de óxido nitroso, nitrato e amônia (BRODERICK, 2003).

Algumas estratégias podem ser lançadas para a melhora do aporte de AAE ao intestino delgado de vacas em lactação, como: a) a variação do teor de PB da dieta, prática ainda usual em algumas situações de campo no Brasil; b) o fornecimento de suplementos ricos em PNDR; e c) o fornecimento de AA protegidos da degradação ruminal.

Tradicionalmente, há pouca oferta de produtos reconhecidos pelo mercado como fontes de PNDR, especialmente se levada em conta a proibição, no Brasil, do uso de alimentos de origem animal na alimentação de ruminantes. Portanto, será dada ênfase na variação dos teores de PB e a suplementação de AA nesta revisão.

2.2 EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO

Observa-se uma clara tendência de reduzir o teor de PB na dieta de vacas leiteiras, ao longo das últimas décadas. Tamminga (1992) sugeriu, ao avaliar o impacto ambiental da excreção de N, que dietas para vacas em lactação não deveriam exceder a 18,7% de PB. O advento de novas tecnologias de produção mostrou a possibilidade de redução destes teores, como o uso de somatotropina bovina recombinante (rBST), que permitiu em vacas de alta produtividade receberem dietas com 17,5% de PB, desde que com 35 a 37% de PNDR (WU; SATTER, 2000). St-Pierre e Thraen (1999) consideraram que, com o uso de dieta total misturada (TMR), foi possível reduzir a PB média da dieta do rebanho de 17,7% para 17,3%, comparando-se fornecimento em lote único com a divisão do rebanho em grupos com diferentes teores de PB.

Frank e Swenson (2002) observaram redução da produção de leite ao comparar tratamentos com alta (próximos a 17,2%) e baixa (próximos a 13,2%) PB na

dieta de vacas, porém neste caso a redução proteica foi bastante drástica. Mesmo assim, houve maior percentagem de proteína verdadeira no leite nas dietas de baixa PB, resultando em produções semelhantes de sólidos no leite, já que os tratamentos não influenciaram os teores de gordura no leite. Tratamentos com maiores teores de PB resultam em aumento da excreção de N nos dejetos.

A redução da PB dietética tem sido recomendada como o método mais efetivo para redução das emissões de óxido nitroso em rebanhos leiteiros. Estima-se que esta medida cause uma melhora de 7 vezes na eficiência de mitigação, quando comparada com a eficiência de redução da emissão deste gás por meio da estocagem e manejo de dejetos (MARINI; VAN AMBURGH, 2005). Destaca-se, ainda, que o N excretado nas fezes é muito menos volátil do que aquele excretado via urina. Desta forma, a excreção de N via fecal resulta em menor produção de óxido nitroso, quando comparada à excreção via urina.

Em experimento comparando-se três teores de PB dietética (15,1, 16,7 e 18,4% PB), Broderick (2003) observou maior ingestão de matéria seca (MS) e maior ingestão de N com o aumento da PB. No grupo com 15,1% PB observou-se menor produção de leite, produção de leite corrigida para gordura, produção de proteína e percentagem de proteína. Com o aumento do teor de PB na dieta, houve aumento linear das concentrações de NUL (9,2, 12,4 e 15,9 mg/dL, respectivamente). Portanto, não houve resultado favorável ao aumento do teor de proteína na dieta de 16,7 para 18,4%, mas a redução para 15,1% resultou em perda de alguns parâmetros de desempenho.

Segundo Belanche et al. (2012), a redução da proteína dietética de 110 para 80% das exigências de N resultaram em uma substancial redução da diversidade microbiana ruminal e da abundância total de bactérias, fungos anaeróbios e metanogênicos e a maior parte das bactérias celulolíticas consideradas. Isso foi consistente com a redução da digestibilidade da matéria orgânica quando as vacas consumiram o que os autores definiram por baixa proteína, se comparadas às vacas que receberam alta proteína. Em dietas com maior teor de amido, a diferença dos teores de proteína se mostrou mais acentuada sobre a população ruminal, provavelmente por maior saturação do ambiente com os produtos da fermentação ruminal, especialmente ácidos graxos voláteis. Ou seja, maior concentração de ácidos

graxos voláteis e menor disponibilidade de N resultou em depressão mais pronunciada da produção de PMic.

A suplementação de concentrados com diferentes teores de PB (baixa proteína, 14,1%; média, 16,1%; e alta, 18,1%, na MS), em vacas manejadas em pastagem de azevém perene, não resultou em diferenças no consumo voluntário de alimentos, produção ou composição do leite. Os autores entenderam que o teor de N-amoniaco dietético no tratamento com menor PB foi suficiente para atender às exigências das vacas. O fornecimento de concentrado com baixa proteína reduziu a excreção de N nas fezes, comparado com o fornecimento de alta proteína, segundo Hynes et al. (2016). A excreção total de NUL aumentou linearmente com o aumento do teor de PB do concentrado, de modo que vacas que receberam PB elevada excretaram, em média, 1,08 g/dia a mais do que as vacas do grupo de menor proteína. O teor de NUL decresceu linearmente com a redução do teor de PB do concentrado; -1,6 e -3,6 mg/dL para vacas de média e baixa PB, respectivamente, comparadas às de alta. Entretanto, o teor de PB não teve efeito no NUL quando se analisa este parâmetro em função do N total ingerido. Os autores encontraram alta e positiva ($r = 0,72$) correlação entre a excreção total de NUL (mg/dia) a excreção de N urinário (g/dia). Demonstraram, neste trabalho, que a maior parte do excesso de N fornecido na dieta foi eliminado na forma de urina.

Em um experimento avaliando os efeitos da redução dos teores de PB dietética para vacas em final de lactação, Barros et al. (2017) observaram redução linear da produção de leite, produção de leite corrigida para gordura e proteína e da produção de leite corrigida para energia, de acordo com o decréscimo da PB. Inclusive, houve resposta quadrática, indicando que a magnitude do decréscimo nestas variáveis aumentou a cada decréscimo da PB. Houve efeito significativo quando se comparou a diferença entre teores mais extremos de decréscimo (16,2 para 13,1% PB) e, especialmente, após 4 semanas, das 12 de duração da fase de avaliação do experimento. Os autores discutiram a possível existência de um pool de N variável, que as vacas podem liberar temporariamente, para manter um curso mais estável do metabolismo de nitrogênio, quando a PB da dieta se torna deficiente. Os dados sugerem que quando a PB dietética foi reduzida de 16,2 para 14,4% estas possíveis reservas ou não foram necessárias ou foram suficientes para manter um

curso mais estável do balanço de nitrogênio e, conseqüentemente, da produção de leite.

Barros et al. (2007) também afirmaram não houve efeito da interação de tratamento (teor de PB x semana de interação) para leite corrigido para gordura e proteína e nem para produção de leite corrigida para energia, mas houve para a produção de leite. A redução da PB levou à redução da produção de proteína verdadeira no leite. Não foram observados efeitos sobre a percentagem de gordura no leite, mas em razão da redução da produção de leite, a produção de gordura no leite foi reduzida com os menores teores de PB dietética. O mesmo padrão de comportamento foi encontrado com a lactose.

A estimativa dos autores para a relação entre NUL diário e produção diária de proteína no leite foi de 3,74 para 1,79 g/kg com a redução dos teores de proteína na dieta. A relação inversa entre produção de proteína no leite e NUL diário pode ser interpretada como a quantidade em g de proteína secretada no leite por g de N ureico no leite. Esta relação aumentou de 279 para 630 g/g, em comportamento quadrático, com a redução da PB da dieta.

Com o advento da possibilidade de uso de AA protegidos da degradação ruminal, surgiram estudos, relacionados a seguir, que avaliaram a interação entre o teor de PB na dieta e a suplementação de AA.

Leonardi et al. (2003) delinearão um experimento em quadrado latino 4 x 4, com dois teores de PB (16,1 e 18,8%) com e sem a suplementação de metionina (0,07 g/100 g MS dieta). Nenhuma interação foi observada entre o teor de PB e a suplementação de metionina, assim como não houve diferença entre os tratamentos para produção de leite e ingestão de MS. Com a adição de metionina, a concentração de proteína no leite aumentou de 3,17 para 3,26%. Entretanto, o maior teor de PB dietética resultou em redução do teor de proteína no leite (3,24 vs. 3,18%). Os teores de gordura foram baixos em todos os tratamentos, mas aumentaram de 2,33 com 16,1% de PB para 2,68% no tratamento com 18,8% PB. Não houve efeito dos tratamentos para extrato seco desengordurado ou teor de lactose. O aumento do teor de PB na dieta aumentou o teor de NUL em 3,9 mg/dL e em 1,67 g/dia. A suplementação de metionina não alterou a excreção de N na urina ou nas fezes. Porém, fornecer mais proteína na dieta resultou em 2,4 L (21,8 vs. 24,6 L/dia) a mais

de produção estimada de urina por vaca/dia e 1,7 pontos percentuais nas concentrações de N urinário e fecal.

Ainda no experimento de Leonardi et al. (2003), a suplementação de metionina não teve efeito sobre volume de urina ou sobre a excreção de N urinário. Maiores concentrações de N foram encontradas na urina (9,3 vs. 10,8 mg/dL) e nas fezes (27,8 vs. 29,3 g/kg MS), quando se compararam os teores de PB na dieta, respectivamente 16,1 e 18,9%. Portanto, com o aumento do volume de urina, associado com o aumento do teor de N na urina, houve aumento da excreção total de N ureico.

Portanto, de maneira geral, a elevação do teor de PB da dieta pode resultar em aumento de produção de leite, mas com perda da eficiência de utilização do N e, portanto, com elevação da excreção do nutriente para o ambiente.

2.3 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA E LISINA PROTEGIDAS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL EM DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO

Os AA absorvidos no intestino delgado são necessários para a síntese de proteínas corporais e para a produção de proteínas lácteas. Uma pequena parte dos AA é requerida como precursor de outros metabólitos do organismo. Exceto a leucina (Leu) e lisina (exclusivamente cetogênicos), eles servem como precursores para a gliconeogênese e todos podem ser convertidos em ácidos graxos ou servirem como fonte imediata de energia e serem oxidados até CO₂ (NRC, 2001).

O NRC (2001) demonstrou a importância da Met e da Lys como os dois AA mais frequentemente limitantes para vacas em lactação, em dietas à base de milho e farelo de soja. Isso é coerente com a observação de que a concentração destes dois AA é baixa na maioria dos alimentos utilizados para vacas em lactação, se comparada à concentração deles na proteína microbiana, na proteína láctea e no tecido magro bovino, segundo revisão publicada por Schwab e Broderick (2017).

Estes últimos autores destacaram que, mais recentemente, a histidina (His) tem ganho importância como AA limitante, seja como o próximo limitante depois da Met e da Lys, seja como um dos principais limitantes em dietas à base de forragens, especialmente quando suplementadas com cevada e aveia, em razão da menor

concentração deste AA nestes alimentos. E mesmo em dietas à base de milho, a His tem sido descrita como importante AA limitante, quando se reduzem os teores de PB dietética, até por que a proteína microbiana também apresenta teores deste AA inferiores aos encontrados na secreção láctea. Porém, ainda não há suplemento comercialmente disponível no Brasil à base de His e, portanto, ela não foi incluída neste experimento.

Desta forma, a suplementação de AA, notadamente Lys e Met, pode ser uma forma de otimizar o aporte destes nutrientes. Porém, a suplementação de AA na sua forma cristalina não é viável normalmente, pela elevada taxa de degradação ruminal, resultando em baixo aporte de AA à síntese de PM (NOFTSGER et al., 2005). Há diversas formas de metionina e de seus análogos no mercado, incluindo o ácido 2-hidroxi-4-(metilto)-butanoico (HMB) e o ácido 2-hidroxi-metiltiobutanóico isopropil éster (HMBi). Há, também, formas de metionina encapsulada por uma base de ácidos graxos saturados, que resiste, ainda que parcialmente, à ação da microbiota ruminal. A proteção parcial se justifica pelo rompimento da proteção lipídica destes produtos ou mesmo na insuficiente cobertura dos AA.

Schwab e Broderick (2017) afirmaram que não é fácil produzir um suplemento fonte de AA que atenda às exigências de ter uma excelente proteção ruminal, mas com boa liberação intestinal. Patton (2010) observou diferenças em resultados zootécnicos entre dois produtos comerciais à base de Met protegida ruminalmente, indicando que a tecnologia com que cada produto é produzido pode ser uma fonte de variação importante ao se avaliarem produtos comerciais com este propósito.

Embora os artigos citados anteriormente mencionem a possibilidade do uso de análogos de metionina, em razão da maior predominância no mercado de produtos encapsulados e por que eles foram utilizados neste experimento, será dada ênfase a estes últimos na revisão.

De maneira geral, o NRC (2001) agrupa algumas considerações sobre a suplementação de AA para vacas em lactação:

- a) O teor de proteína no leite é mais frequentemente responsivo à suplementação de Lys e Met do que a produção de leite em si, especialmente se fornecidos pós-pico de produção;

- b) O aumento do teor de proteína do leite é independente da produção de leite;
- c) A fração proteica láctea que sofre maior influência da suplementação de aminoácidos é a caseína;
- d) Os aumentos da produção de proteína, como consequência da suplementação de um dos dois AA, Lys ou Met, são mais prováveis de serem preditos quando o teor do outro AA está próximo ou ao teor estimado da exigência;
- e) As respostas em produção de leite são mais comuns em vacas em início da lactação do que no meio ou ao final da lactação;
- f) As respostas em termos de produção de leite, quando da suplementação de Lys e Met, são caracteristicamente maiores quando a PB na dieta está próxima do preconizado (14 a 18%) do que quando está mais alta ou mais baixa que estes valores;
- g) Ainda, a resposta em porcentagem ou produção de gordura no leite é mais inconstante do que a observada para proteína no leite (NRC, 2001).

Para elaborar a recomendação de teores de AA, o NRC (2001) relatou o uso de 4 modelos estatísticos para descrever as relações entre as concentrações crescentes de Lys e de Met e as respostas em teores e produções de proteína no leite. Foram apresentados os teores de Lys e Met como porcentagem da PM. Foram plotadas as concentrações preditas de cada um dos dois AA e a resposta correspondente para o teor e para a produção de proteína no leite. Algumas considerações listadas pelos autores:

- a) Para os dois AA e para as duas variáveis, o comportamento foi semelhante: o aumento dos teores de AA na PM resultou em resposta crescente, até atingir um ponto de inflexão, a partir do qual o aumento da concentração do AA na PM não resultou em acréscimo da resposta em teor ou em concentração de proteína no leite, mantendo-se comportamento linear estável;
- b) Os pontos de inflexão estimados para as exigências de Lys e Met na PM para a máxima produção de proteína (7,08 e 2,35%, respectivamente)

foram similares àqueles requeridos para o máximo teor de proteína no leite (7,24 e 2,38%, respectivamente);

- c) Para ambos os AA, as relações entre nutriente e resposta foram determinadas mais precisamente para o teor do que para a produção de proteína no leite.

Portanto, para o máximo uso da PM das funções conjuntas de manutenção e produção de proteína no leite, exigem-se concentrações aproximadas de 7,2% de Lys e 2,4% de Met na PM. Ainda segundo o NRC (2001), conseguir as concentrações ótimas dos dois principais AA limitantes na dieta é o primeiro passo para o balanceamento de dietas para AA em geral.

Utilizando-se de uma abordagem por dose-resposta indireta, Rulquin et al. (1993) relataram que as concentrações ótimas de Lys e Met na PM foram de 7,3 e 2,5%, próximas portanto, das concentrações preconizadas pelo NRC (2001); 7,2% e 2,4% de Lys e Met na PM, respectivamente. Estas recomendações resultam em relação Lys:Met de 2,92 e 3,0, respectivamente. A partir de então, aumentou o número de artigos publicados avaliando a suplementação de AA para vacas em lactação.

Sancanari et al. (2001) compararam a suplementação de metionina não protegida com a protegida para vacas de média produtividade e encontraram efeito somente sobre a gordura do leite.

Alegransi et al. (2011) suplementaram 25 g/vaca/dia de metionina hidróxi-análoga para vacas em lactação e observaram maior produção de gordura (53 g/vaca/dia) que no grupo não suplementado. A suplementação também resultou em tendência de maior produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, maior produção corrigida para energia, 30 g a mais de proteína por vaca/dia e maior conteúdo de sólidos no leite.

Almeida et al. (2010) compararam a suplementação de 20 g/vaca/dia de metionina hidróxi-análoga com um grupo não suplementado. A suplementação com metionina não alterou a produção de leite e seus componentes, mas observou-se uma tendência de maior teor de gordura no leite das vacas tratadas (3,48% vs. 3,39%). Além disso, vacas suplementadas com metionina análoga produziram leite com menores concentrações de NUL do que nas vacas não suplementadas; 16,83 e 17,44 mg/dL, respectivamente.

Salvati et al. (2013) avaliaram a suplementação de metionina hidróxi-análoga (HMBi) à dieta com 15,8% PB baseada em soja, comparada à não suplementação. A produção de leite não diferiu entre os grupos (30,5 kg/dia), assim como a ingestão de matéria seca, a digestibilidade total e a produção diária de sólidos. A proteína do leite foi aumentada de 3,25% para 3,35% pela suplementação de HMBi, assim como as concentrações de metionina e de His no plasma. A excreção diária de alantoína foi similar entre os grupos e a suplementação de HMBi reduziu o nitrogênio ureico no plasma (NUP) ao longo do dia de 18,2 para 15,6 mg/dL e também reduziu a amônia ruminal 12 horas pós-alimentação.

Morais Junior et al. (2013) avaliaram a suplementação da mesma fonte de HMBi para vacas em lactação, comparando-se o grupo suplementado (30 g/vaca/dia) com o não suplementado. O tratamento com HMBi aumentou a produção e o teor de proteína, mas não interferiu com o NUL. O NUP foi menor no grupo suplementado e a relação entre alantoína e creatinina urinárias foi maior no grupo que recebeu HMBi, assim como a concentração total de aminoácidos e de metionina no plasma.

Patton (2010) realizou uma meta-análise para comparar dois produtos à base de Met protegida da degradação ruminal. As suplementações, em geral, resultaram em aumento de produção de proteína verdadeira no leite, tanto em percentagem (0,07%) quanto em quantidade (27 g/dia). O consumo de MS e a porcentagem de gordura foram ligeiramente menores com a suplementação, enquanto que a produção de leite foi ligeiramente superior com a suplementação. As diferenças entre os produtos foram detectadas em todas as variáveis de produção, com o Mepron® resultando em menor percentagem de proteína verdadeira no leite, mas com maior produção de leite.

Wang et al. (2010) compararam os efeitos da suplementação de lisina (L-lisina-HCl) isoladamente, de metionina (HMB) isoladamente e da associação de lisina e metionina para vacas em lactação, além de um grupo controle, sem suplementação de aminoácidos. As dietas atendiam às exigências estimadas de energia, continham os aminoácidos na proporção de 7,0% de lisina e de 2,3% de metionina na proteína metabolizável, com as vacas sendo suplementadas durante oito semanas. A produção de leite, em relação ao grupo controle, aumentou com a suplementação de cada aminoácido (lisina 1,5 kg/dia e metionina 2,0 kg/dia) e a associação dos dois

aminoácidos resultou em acréscimo de 3,8 kg/vaca/dia. Não houve efeito sobre o consumo de MS. As vacas que receberam metionina, isoladamente ou associada à lisina, apresentaram maior teor de gordura no leite, porém não houve efeito sobre a proteína do leite, lactose ou contagem de células somáticas entre os tratamentos. A resposta em aumento do teor de gordura pode ser explicada pela presença da metionina em lipoproteínas que carregam ácidos graxos para a glândula mamária. A suplementação do respectivo aminoácido aumentou sua concentração no plasma arterial. O grupo metionina + lisina apresentou maior conversão de N ingerido em N do leite e menores concentrações de NUP, NUL e nitrogênio ureico na urina do que o tratamento controle. Os autores afirmaram que a utilização da proporção correta entre lisina e metionina metabolizáveis (3:1) é essencial para se maximizar a proteína do leite e a eficiência da utilização de N.

Já na meta-análise realizada por Patton (2010), a suplementação de Lys como percentagem da PM não teve efeito sobre a produção de proteína verdadeira no leite.

Socha et al. (2005) avaliaram a resposta de vacas no seguinte experimento: no pré-parto, um grupo controle (sem suplementação de aminoácidos), um grupo com 10,5 g/vaca/dia de metionina protegida ruminalmente e o terceiro grupo, com 10,2 g de metionina mais 16,0 g de lisina protegida ruminalmente. Após o parto, as vacas continuaram a receber os mesmos tratamentos, porém foram divididas em duas dietas, balanceadas para 16,0% ou 18,5% PB. Comparada com as dietas basais e suplementada somente com metionina, a suplementação de lisina e metionina aumentou a quantidade de leite corrigida para energia, gordura e proteína e tendeu a aumentar a produção de leite corrigido para 3,5% de gordura. Interações significativas entre aminoácidos e teores de proteína na dieta foram observadas somente para proteína do leite e teor de gordura. A suplementação de metionina e lisina para vacas recebendo dieta com 16,0% PB não apresentou nenhum efeito sobre a proteína verdadeira do leite e teor de gordura. Entretanto, a suplementação de metionina, adicionada ou não de lisina, para a dieta de 18,5% de PB resultou em aumento da proteína verdadeira do leite e do conteúdo de gordura. Os autores concluíram que os resultados observados para vacas em início de lactação, em dietas baseadas em milho, são sensíveis ao aumento do fornecimento intestinal de lisina e metionina e que a magnitude da resposta depende da concentração de proteína da dieta, do aporte de

proteína metabolizável e da digestibilidade da fração dietética não degradável no rúmen.

Diante do exposto, as recomendações usuais são de aproximadamente 7,2% de lisina e 2,4% de metionina na PM. Os experimentos citados anteriormente mostram resultados variáveis sobre a produção de leite das vacas suplementadas, com alguns trabalhos demonstrando aumento da produção e outros, somente dos teores ou quantidades de sólidos.

2.4 REFERÊNCIAS

ALEGRANSI, L.; SOUZA, V.L.; DOSKA, M.C.; ZANETTI, G.F.; RIBAS, E.M.; OSTRENSKY, A.; ALMEIDA, R. Effects of methionine analog supplementation on milk yield and composition of primiparous dairy cows in a Brazilian dairy herd. **J. Dairy Sci.**, v. 94, E-Suppl. 1, p. 124, 2011.

ALMEIDA, R.; OLSEN, A.P.; BIER, L.P.P.; SOUZA, V.L.; NAVARRO, R.B.; OSTRENSKY, A. Efeitos da suplementação de metionina análoga sobre a produção e composição do leite de vacas leiteiras de alta produção. 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** Salvador, BA, 27 a 30 de julho de 2010, 3p.

BARROS, T.; QUAASSDORFF, M. A.; AGUERRE, M. J.; COLMENERO, J. J. O.; BERTICS, S. J.; CRUMP, P. M.; WATTIAUX, M. A. Effects of dietary crude protein concentration on late-lactation dairy cow performance and indicators of nitrogen utilization. **J. Dairy Sci.**, v.100, n.7, p.5434–5448, 2017.

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

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.86, p. 1370–1381, 2003.

FRANK, B.; SWENSSON, C. Relationship Between Content of Crude Protein in Rations for Dairy Cows and Milk Yield, Concentration of Urea in Milk and Ammonia Emissions. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.7, p. 1829-1838, 2002.

HYNES, D. N.; STERGIADIS, S.; GORDON, A.; YAN, T. Effects of crude protein level in concentrate supplements on animal performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows fed fresh-cut perennial grass. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.10, p. 8111–8120, 2016.

LEONARDI, C.; STEVENSON, M.; ARMENTANO, L.E. Effect of Two Levels of Crude Protein and Methionine Supplementation on Performance of Dairy Cows. **J. Dairy Sci.**, v.86, p. 4033-4042, 2003.

MARINI, J. C.; VAN AMBURGH, M. E. Partition of nitrogen excretion in urine and the feces of Holstein replacement heifers. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 1778-1784, 2005.

MORAIS JUNIOR, N.N.; SALVATI, G.G.S.; OLIVEIRA, R.; PEREIRA, R.A.N.; PEREIRA, M.N. A controlled on farm evaluation of methionine for lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 96, E-Suppl. 1, p. 247, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy cattle.** Washington, DC: Natl. Acad. Sci., 7 ed., 2001.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R.; SYLVESTER, J. T. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 223-237, 2005.

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. **J. Dairy Sci.**, v.93, n. 5, p. 2105-2118, 2010.

RULQUIN, H.; PISULEWSKI, P.M.; VERITÉ, R.; GUINARD, J. Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. **Liv. Prod. Sci.**, v.37, p.69-90, 1993.

SALVATI, G.G.S.; MORAIS JUNIOR, N.N.; LOPES, F.C.F.; PEREIRA, R.A.N.; PEREIRA, M.N. Performance, digestion, milk fatty acids, and plasma amino acids in response to the supplementation of methionine and plant extracts to dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 96, E-Suppl. 1, p. 240, 2013.

SANCANARI, J.B.D. et al. Efeito da metionina protegida e não protegida da degradação ruminal sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 30, n. 1, fev. 2001.

SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.100, n.12, p.10094–10112, 2017.

SOCHA, M.T.; PUTNAM, D.E.; GARTHWAITE, B.D.; WHITEHOUSE, N.L.; KIERSTEAD, N.A.; SCHWAB, C.G.; DUCHARME, D.A.; ROBERT, J.C. Response to lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids Improving Intestinal Amino Acid Supply of Pre- and Postpartum Dairy Cows with Rumen-Protected Methionine and Lysine. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 1113–1126, 2005.

ST-PIERRE, N.R.; THRAEN, C.S. Animal grouping strategies, sources of variation, and economic factors affecting nutrient balance on dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v.82, supl. 2, p. 72–83, 1999.

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **J. Dairy Sci.**, v.75, p. 345–357, 1992.

YAN, T.; FROST, J.P.; AGNEW, R.E.; BINNIE, R.C.; MAYNE, C.S. Relationships among manure nitrogen output and dietary and animal factors in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.89, p. 3981– 3991, 2006.

WANG, C.; LIU H.Y.; WANG, Y.M.; YANG, Z.Q.; LIU, J.X.; WU, Y.M.; YAN, T.; YE, H.W. Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.93, p. 3661–3670, 2010.

WU, Z.; SATTER, D. L. Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. **J. Dairy Sci.**, v.83, p. 1042–1051, 2000.

3 CAPÍTULO 2: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE TEORES CRESCENTES DE METIONINA E LISINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL PARA VACAS EM LACTAÇÃO

RESUMO

Os objetivos deste experimento foram, primariamente, avaliar o desempenho produtivo como resposta aos teores crescentes de lisina (Lys) e metionina (Met) protegidas da degradação ruminal (LMPR), em dietas com baixos teores de N, mas suficientes em proteína metabolizável (PM), e, secundariamente, avaliar a importância da síntese de proteína microbiana em resposta à suplementação LMPR. Dezesesseis vacas da raça Holandesa foram alojadas e alimentadas individualmente em um estábulo do tipo *tie-stall*. Formaram-se 4 grupos, com base na ordem de parição e produção de leite e foram alocadas em uma sequência de 4 tratamentos em um delineamento em Quadrado Latino 4 x 4, com períodos de 21 dias (14 dias de adaptação). Os tratamentos foram: controle (CTL, 6,3% Lys e 1,8% Met na PM); baixa (L, 6,6% Lys e 2,2% Met na PM); média (M, 6,9% Lys e 2,3% Met na PM); e alta (A, 7,2% Lys e 2,4% Met na PM). Foram mensurados: a ingestão individual de matéria seca (IMS), produção e composição de leite, nitrogênio ureico no leite (NUL), contagem de células somáticas, peso vivo (PV) dos animais, escore de condição corporal (ECC), digestibilidade aparente do trato total da MS, da matéria orgânica (MO) e da fibra em detergente neutro (FDN); estimou-se a síntese de proteína microbiana, baseada na excreção de derivados de purina, e foi dosada a concentração de aminoácidos no plasma. O modelo matemático incluiu a média geral, o efeito aleatório de vaca, efeitos fixos de período e tratamento, além do erro residual. O aumento da suplementação de AA protegidos resultou em decréscimo linear da IMS (25,2 vs. 24,3 vs. 24,2 vs. 24,0 kg/vaca/dia, respectivamente para os tratamentos CTL, L, M e H), em redução linear da ingestão de matéria orgânica digestível, tendência a reduzir a digestibilidade da matéria orgânica no trato total e também tendência a reduzir a digestibilidade da FDN. Não teve efeito sobre o desempenho da lactação, parâmetros de composição do leite, NUL, PV, ECC e síntese de proteína microbiana, mensurada pela produção de alantoína. A concentração de AA plasmáticos, quando analisada pela concentração total no plasma, apresentou tendência de redução linear da concentração somada de isoleucina + leucina + valina, com o aumento do teor de Lys e Met na PM. Quando foram analisados em relação à concentração de AA no plasma, houve decréscimo linear dos teores plasmáticos de glicina e de Met e para a histidina e isoleucina, houve tendência a redução no mesmo sentido. A menor digestibilidade da FDN e menor ingestão de MS sugerem um efeito negativo dos suplementos de AA na função ruminal, possivelmente mediada pela redução da síntese de proteína microbiana.

Palavras-chave: Aminoácidos. Ingestão de matéria seca. Proteína metabolizável.

ABSTRACT

This trial aimed first to evaluate the effects of feeding increasing levels of rumen protected lysine (Lys) and methionine (Met) (LMPR) in low N-metabolizable protein (PM) diets. And, also, to evaluate the role of rumen microbial synthesis on the response of dairy cows to LMPR in low N-PM diets. Sixteen Holstein lactating cows were housed and individually fed in a bedded tie stall barn. Four groups were formed, based on parity and milk production and assigned to a sequence of 4 treatments in 4 x 4 Latin Squares with 21-day periods (14 days of adaptation). Treatments were: Control (CTL, 6.3% Lys and 1.8% Met on PM), Low (L, 6.6% Lys and 2.2% Met), Medium (M, 6.9% Lys and 2.3% Met), and High (H, 7.2% Lys and 2.4% Met). The variables evaluated were: dry matter intake (IMS), milk production and composition, milk urea nitrogen (NUL), somatic cell count (CCS), live weight (PV), body condition score (ECC), total tract apparent digestibility of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber (NDF); microbial protein synthesis was estimated based on derivatives purine excretion and amino acids (AA) plasmatic content. Data obtained was analyzed with Mixed procedure of SAS using the following information in the model: overall mean, random cow effect, fixed period effect, fixed treatment effect and residual error. The increasing levels of LMPR decreased linearly IMS (25.2 vs. 24.3 vs. 24.2 vs. 24.0 kg/cow/day, respectively for CTL, L, M and H), linearly decrease digestible organic matter intake, tend to decrease total tract digestibility and NDF digestibility. There was no effect on lactation performance, milk components, NUL, PV, ECC and microbial synthesis, based on allantoin production. AA plasmatic concentration, analysed based on total plasma concentration tended to decrease linearly the sum of isoleucine + leucine + valine, as LMPR increased in PM. There was a tend to decrease linearly glycine, histidine, isoleucine and Met concentration in plasma as total plasmatic AA. It is suggested a negative effect of LMPR in ruminal function, possibly mediated by microbial protein synthesis decrease, since there was a drop in NDF digestibility and IMS.

Key-words: Amino acids. Dry matter intake. Metabolizable protein.

3.1 INTRODUÇÃO

A produção animal tem buscado a redução dos teores de nitrogênio (N) dietéticos, visto que pode melhorar a eficiência do uso deste elemento, além de favorecer o resultado econômico da fazenda. A nutrição de precisão de vacas em lactação exige o uso dos modelos disponíveis, capazes de prever a absorção de aminoácidos (AA) da proteína metabolizável (PM). O modelo do NRC (2001) sugere que os teores de metionina (Met) e lisina (Lys) na PM não são elevados o suficiente para maximizar a produção de proteína verdadeira, quando as dietas são formuladas à base de milho e soja e visando baixo N e adequada PM.

As recomendações para os teores de Met têm variado de 2,2 a 2,4% e para Lys, de 6,6 a 7,2% da PM (LEE et al., 2012; WHITEHOUSE et al., 2013). Entretanto, ajustar os teores de Lys e Met na PM tem impacto significativo no custo da alimentação, pelo custo da suplementação de AA protegidos da degradação ruminal (RPAA). A resposta em desempenho de vacas à suplementação de RPAA necessita de maior avaliação, visando definir as estratégias de suplementação dos AA.

Quando dietas limitantes em N são utilizadas, a dependência de AA microbianos para que se atinjam as necessidades de AA pela vaca está aumentada, comparada com dietas com excesso de proteína não degradável no rúmen (PNDR). Neste cenário, maximizar a síntese de proteína microbiana pode ter um impacto significativo no desempenho de vacas leiteiras. Tem sido demonstrado que a suplementação de AA pode melhorar a eficiência da síntese de proteína microbiana ruminal (BELASCO, 1980; NOFTSGER et al., 2005).

Apesar do objetivo da proteção seja a liberação intestinal dos AA, ocorre a liberação de uma fração destes no rúmen. E quando isso ocorre, pode influenciar a síntese de proteína microbiana, favorecendo especialmente em dietas com limitação de proteína degradável ruminal (PDR) (KAJIKAWA et al., 2002) ou reduzindo-a.

Os objetivos deste experimento foram, primariamente, avaliar o desempenho produtivo como resposta aos teores crescentes de Lys e Met protegidos da degradação ruminal em dietas com baixos teores de N, mas suficientes em PM, e, secundariamente, avaliar a importância da síntese de proteína microbiana em resposta à suplementação de Lys e Met protegidas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dezesseis vacas da raça Holandesa (105 ± 66 dias em lactação, sendo uma primípara) foram alojadas em um estábulo do tipo *tie-stall*, com cama de areia, dispondo de ventiladores e aspersores de alta pressão, no Better Nature Research Center, Ijaci, MG.

A temperatura e umidade ambiental foram mensuradas em intervalo de 30 minutos por um termohigrômetro digital (EasyLog-USB-2-LCD, Lascar Eletronics, Salisbury, Reino Unido), posicionado a 2,5 m do piso. O índice de temperatura e umidade (THI, Figura 3.1) foi calculado de acordo com Yousef (1985): $THI = T + 0,36 \times PO + 41,2$; onde T = temperatura ($^{\circ}C$) and PO = ponto de orvalho. A mensuração do THI demonstrou temperatura média de $22,2 \pm 5,2^{\circ}C$; umidade relativa do ar em $70,8 \pm 17,5\%$; THI $69,2 \pm 5,9$; THI acima de 68: 57,6% do tempo; THI acima de 72: 30,5% do tempo, com total de 4.031 registros em intervalos de 30 minutos.

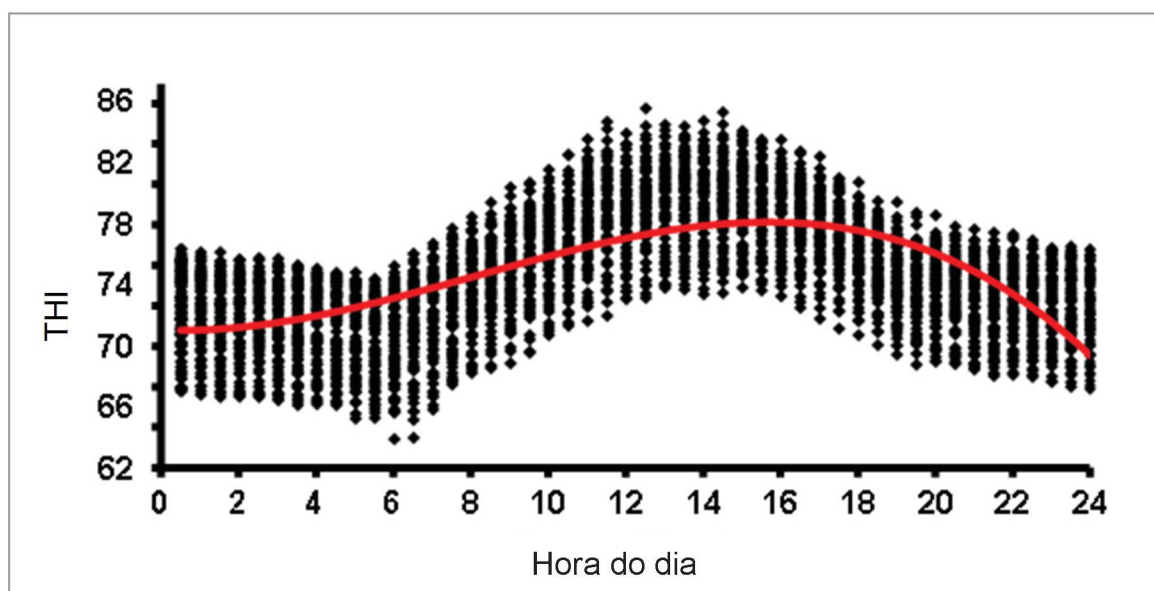


FIGURA 3.1 – ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (THI) DENTRO DO ESTÁBULO, DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.

As vacas eram alimentadas 2 vezes ao dia (06:00 e 13:00 h), em dieta total misturada (DTM) em misturador estacionário. Os tratamentos eram misturados ao premix vitamínico-mineral no momento de preparação da DTM e, então, adicionados

à dieta do lote. Havia a conferência visual uma vez ao dia do consumo individual e, se necessário, o fornecimento da dieta era ajustado.

As dezesseis vacas formaram 4 grupos, com base na ordem de parição e produção de leite e foram alocadas em uma sequência de 4 tratamentos em um delimitado em Quadrado Latino 4 x 4, com períodos de 21 dias (14 dias de adaptação e 7 dias de coletas) e balanceados para efeitos residuais. Os tratamentos foram: Controle (CTL, 6,3% Lys e 1,8% Met na PM); Baixa (L, 6,6% Lys e 2,2% Met na PM); Média (M, 6,9% Lys e 2,3% Met na PM); e Alta (A, 7,2% Lys e 2,4% Met na PM), em relação aos teores de AA na PM da dieta. O modelo do NRC (2001) foi usado para se estimar o fluxo de AA digestíveis. O perfil de nutrientes das fontes de AA foi disponibilizado pelo fornecedor dos produtos (LysiPEARL® e MetiPEARL®, Kemin Industries, Inc., Des Moines, EUA). A proteção destes produtos é feita por pulverização de uma fase líquida do AA em conjunto com a fonte de ácidos graxos saturados e cuja mistura é resfriada rapidamente a temperaturas muito baixas. Desta forma, gotículas solidificadas do respectivo AA ficam dispersas na massa de ácidos graxos da partícula do produto.

A composição das dietas experimentais, com base na MS, está apresentada na Tabela 3.1, formulada utilizando-se o NRC (2001) e parâmetros nutricionais analisados, para os 4 grupos experimentais: controle (CTL), baixa (L), média (M) e alta (H) concentrações de Lys e Met na PM.

TABELA 3.1 – COMPOSIÇÃO (EM PORCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) E PARÂMETROS NUTRICIONAIS ANALISADOS EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL.

	CTL	L	M	H
Silagem de milho	48,6	48,5	48,4	48,3
Feno de alfafa	5,1	5,1	5,1	5,1
Milho grão moído fino	10,2	10,2	10,2	10,2
Milho grão moído fino hidrat. ensilado	10,2	10,2	10,2	10,2
Farelo de soja	9,6	9,6	9,6	9,6
Soypass® Cargill	3,6	3,6	3,6	3,5
Caroço de algodão	9,4	9,4	9,4	9,4
Ureia	0,21	0,21	0,21	0,21
Premix mineral-vitamínico ¹	0,37	0,37	0,37	0,37
Bicarbonato de sódio	1,03	1,03	1,03	1,03
Óxido de magnésio	0,29	0,29	0,29	0,29
Cloreto de sódio	0,13	0,13	0,13	0,13
Calcário calcítico	1,24	1,24	1,24	1,24
Levedura viva	0,04	0,04	0,04	0,04
LysiPEARL®	X	0,10	0,24	0,38
MetiPEARL®	X	0,11	0,14	0,18
Proteína bruta	16,0	16,1	16,1	16,2
Fibra em detergente neutro	33,7	33,6	33,6	33,5
Cinzas	7,0	6,9	6,9	6,9
Matéria seca	41,9	42,0	42,0	42,0

¹ 210,5 g/kg Ca, 156 g/kg P, 30,4 g/kg Mg, 39,5 g/kg S, 150 mg/kg Co, 2.000 mg/kg Cu, 5.000 mg/kg Mg, 11.903 mg/kg Zn, 82 mg/kg Se, 200 mg/kg I, 1.000 KUI/kg vit A, 220 KUI/kg vit D, 6.200 UI/kg vit E.

Na Tabela 3.2, estão apresentadas as predições do NRC (2001) para os parâmetros nutricionais, com base nas análises bromatológicas dos ingredientes para as dietas experimentais.

TABELA 3.2 – PREDIÇÕES DO NRC (2001), BASEADAS NAS ANÁLISES DE INGREDIENTES E RESULTADOS DE DESEMPENHO EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL.

	CTL	L	M	H
PL potencial pela ELL ¹ , kg/d	45,5	44,8	44,6	45,2
PL potencial pela PM, kg/d	42,5	41,5	41,6	41,9
PM exigida, g/d	2660	2605	2630	2589
PM fornecida, g/d	2672	2592	2621	2605
PM balanço, g/d	12	-13	-9	16
PDR exigida, g/d	2426	2356	2390	2372
PDR fornecida, g/d	2524	2454	2452	2429
PDR balanço, g/d	97	98	62	56
PNDR exigida, g/d	1481	1464	1470	1432
PNDR fornecida, g/d	1496	1449	1459	1451
PNDR balanço, g/d	15	-11	-11	19
PM - Bacteriana, g/d	1320	1282	1300	1291
PM - PNDR, g/d	1233	1199	1204	1201
PM - Endógena, g/d	119	115	114	113
PB, % MS	16,0	16,1	16,1	16,2
PDR, % MS	10,0	10,1	10,1	10,1
PNDR, % MS	5,9	6,0	6,0	6,0
Arg d, g/d	122	118	119	118
His d, g/d	59	56	57	56
Ile d, g/d	128	124	125	124
Leu d, g/d	233	225	226	223
Lys d, g/d	169	170	180	186
Met d, g/d	48	57	60	63
Phe d, g/d	133	129	130	129
Thr d, g/d	127	122	123	122
Val d, g/d	143	138	140	138
Lys, % na PM	6,31	6,55	6,86	7,16
Met, % na PM	1,81	2,21	2,31	2,43
Lys/Met, na PM	3,49	2,96	2,97	

¹PL: Produção de leite, ELL: energia líquida de lactação, PM: proteína metabolizável, PDR: proteína degradável ruminal, PNDR: proteína não degradável ruminal, PB: proteína bruta, Arg: arginina, His: histidina, Ile: isoleucina, Leu: leucina, Lys: lisina, Met: metionina, Phe: fenilalanina, Thr: treonina, Val: valina, Arg d: arginina digestível.

As ordenhas ocorriam 3 vezes ao dia, com início às 05:00, 12:00 e 20:00 h, e a quantidade de leite individual registrada diariamente.

Nos dias 15 e 21 de cada período, a ingestão individual de matéria seca (IMS) das vacas era monitorada pela pesagem da quantidade fornecida e das sobras (com base na matéria original). Isso foi possível, pois havia uma separação física do espaço de cocho de cada vaca, com placa de madeira. Esta frequência de mensuração da IMS foi estabelecida com base em experimentos anteriores realizados pelo mesmo grupo de pesquisa. Amostras dos ingredientes foram coletadas diariamente e amostras compostas foram formadas ao final de cada período. Da mesma forma, amostras de sobras de dieta foram coletadas por vaca e por período e, posteriormente, submetidas às análises.

As amostras compostas foram secas em estufa de ventilação forçada a 55° C por 72 h e moídas em moinho Thomas-Willey com peneira de 1 mm. O teor de matéria seca (MS) foi determinado por secagem a 100° C, por 24 h e a PB determinada pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2007). As cinzas foram determinadas por incineração a 550° C, por 8 h. O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi analisado utilizando-se um analisador de fibras TE-149 (Tecnal Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba), que se baseia em Van Soest (1994).

Amostras do leite de vaca foram colhidas individualmente em todas as ordenhas, nos dias 15, 16, 17 e 18 de cada período experimental. Os teores de sólidos totais e nitrogênio ureico no leite, e a contagem de células somáticas (CCS) foram mensurados utilizando-se um analisador por infra-vermelho (BENTLEY, 2007), no Laboratório de Análises de Leite da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH, Curitiba, PR). O peso vivo (PV) foi mensurado após a ordenha da manhã, para caracterizar a unidade experimental. As vacas foram avaliadas também para escore de condição corporal (BCS, em escala de 1 a 5, WILDMAN et al., 1982) por 3 avaliadores treinados e independentes.

A digestibilidade aparente do trato total da MS, matéria orgânica (MO) e da FDN foram determinados entre os dias 19 a 21 de cada período, por coleta total de fezes em baldes, por pessoal treinado, conforme descrito por Salvati et al. (2015). As fezes foram coletadas imediatamente após a defecação, durante 3 períodos de 8 horas de amostragem. O segundo e o terceiro períodos de coleta iniciavam-se 8 horas

mais tarde que o período anterior, para se evitar maiores transtornos aos animais, mas ainda assim representando um período de 24 h de coleta. As alíquotas de fezes (mesmo peso em matéria natural) de cada período de coleta (8 h) foram imediatamente congeladas e, posteriormente, uma amostra composta foi formada por vaca e por período experimental.

A excreção total de urina foi coletada em baldes (conforme descrito por SALVATI et al., 2015), em procedimento similar e simultâneo ao da coleta de fezes, para se estimar a síntese de proteína microbiana, baseada na excreção de derivados de purina, como a alantoína. Uma solução de 10% de ácido sulfúrico foi imediatamente adicionada às amostras de urina (na proporção de 1: 9), antes do acondicionamento em refrigeração a 4° C. Amostras compostas de urina foram diluídas 1: 3 em água destilada e congeladas a -20° C. A concentração de alantoína foi analisada segundo o método descrito por Chen e Gomes (1992).

Amostras de sangue de vasos coccígeos foram obtidas no dia 17 de cada período para se determinar a concentração de aminoácidos no plasma. As amostras foram obtidas imediatamente antes do primeiro trato da manhã e às 2, 4, 8, 12, 16 e 20 h após a alimentação. O sangue, colhido em tubos tipo vacutainer contendo EDTA, foi imediatamente refrigerado, centrifugado a 2,118 x g por 10 minutos e o plasma congelado a -20° C. Alíquotas de igual volume de cada coleta foram usadas para formar uma amostra composta do dia, para cada vaca. A concentração de AA no plasma, nas amostras compostas, foi analisada por HPLC de separação por fase reversa e detecção UV a 254 nm (Laboratório Cean, Santa Maria, RS), com base na metodologia descrita por Campbell et al. (1997).

3.2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados com o procedimento MIXED do SAS, por meio do seguinte modelo (SAS, 2000):

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + P_j + D_k + e_{ijk}$$

Onde:

μ = média geral;

V_i = efeito aleatório de vaca ($i = 1$ a 16);

P_j = efeito fixo de período ($j = 1$ a 4);

D_k = efeito fixo de tratamento ($k = \text{CTL, L, M, H}$);

e_{ijk} = erro residual.

Os contrastes linear, quadrático e cúbico avaliaram o efeito de resposta nas variáveis em relação ao aumento da suplementação de Lys e Met. Foi realizado teste t aos pares para todas as possíveis comparações entre os tratamentos. As diferenças estatísticas foram aceitas com $P \leq 0,05$. Diferenças entre $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas como tendência a significância.

3.3 RESULTADOS

Os resultados obtidos para IMS, produção de leite, composição do leite, escore de condição corporal e peso vivo estão descritas na Tabela 3.3. O aumento da suplementação de AA protegidos resultou em decréscimo linear do consumo de MS e não teve nenhum efeito sobre o desempenho da lactação. Não houve efeito ($P > 0,10$) da elevação da concentração de Lys e Met na PM sobre os parâmetros de composição do leite (teores e produções diárias de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e caseína) e tampouco sobre o NUL. Também não houve resposta dos tratamentos sobre o ECC e peso vivo dos animais ($P > 0,10$).

TABELA 3.3 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE INGESTÃO DE MATÉRIA SECA, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE E PESO VIVO DE VACAS EM LACTAÇÃO.

	CTL ¹	L	M	H	EPM	Valores de P			
						Trat	Lin	Quad	Cub
IMS ² , kg/d	25,2	24,3	24,2	24,0	0,79	0,09	0,02	0,29	0,52
PL, kg/d	42,2	41,7	41,8	41,5	1,44	0,77	0,38	0,88	0,58
PL/IMS	1,68	1,72	1,74	1,74	0,061	0,52	0,18	0,51	0,94
Gordura, %	3,07	2,93	3,10	2,97	0,111	0,53	0,75	0,94	0,15
Gordura, kg/d	1,29	1,22	1,29	1,24	0,052	0,48	0,62	0,78	0,14
Proteína, %	3,03	3,02	3,06	3,03	0,048	0,88	0,77	0,73	0,51
Proteína, kg/d	1,27	1,26	1,28	1,26	0,044	0,76	0,66	0,87	0,34
Lactose, %	4,56	4,58	4,55	4,57	0,071	0,98	0,94	0,98	0,68
Lactose, kg/d	1,92	1,90	1,90	1,89	0,058	0,96	0,58	0,93	0,95
Sól. tot., %	11,64	11,49	11,70	11,55	0,197	0,67	0,95	0,97	0,22
Sól. tot., kg/d	4,89	4,75	4,87	4,79	0,151	0,57	0,53	0,82	0,21
Caseína, %	2,41	2,40	2,44	2,41	0,041	0,85	0,73	0,84	0,42
Caseína, kg/d	1,02	1,00	1,02	1,00	0,035	0,64	0,70	0,98	0,22
NUL, mg/dL	15,3	14,7	14,6	14,9	0,55	0,55	0,47	0,22	0,87
ECC, 1 a 5	3,0	3,0	3,0	2,9	0,08	0,59	0,52	0,24	0,75
PV, kg	658	655	661	658	19,7	0,38	0,51	0,97	0,11

¹CTL: controle; L: baixa; M: média; H: alta; EPM: erro padrão da média; Trat: tratamento; Lin: linear; Quad: quadrático; Cub: cúbico.

²IMS: Ingestão de matéria seca; PL: produção de leite; Sól. tot.: sólidos totais; NUL: nitrogênio ureico no leite; ECC: escore de condição corporal; PV: peso vivo.

As análises das concentrações plasmáticas dos AA estão apresentadas em concentração total do plasma (Tabela 3.4), como percentagem total dos AA (Tabela 3.5) e como percentagem dos AAE (Tabela 3.6).

Não houve efeito do aumento da concentração de Lys e Met na PM para as concentrações de AA, quando analisados pela concentração total no plasma, descritos na Tabela 3.4 ($P>0,10$). Houve tendência ($P=0,06$) de redução linear da concentração somada de Ile+Leu+Val com o aumento do teor de Lys e Met na PM.

TABELA 3.4 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO PLASMA (g/100 g DE PLASMA) DE VACAS EM LACTAÇÃO.

	CTL ¹	L	M	H	EPM	Valores de P			
						Trat	Lin	Quad	Cub
Asp ²	0,711	0,722	0,716	0,703	0,0107	0,64	0,55	0,27	0,80
Glu	0,927	0,942	0,930	0,914	0,0144	0,61	0,45	0,29	0,73
Ala	0,315	0,318	0,313	0,312	0,0034	0,66	0,36	0,54	0,55
Arg	0,405	0,407	0,394	0,404	0,0081	0,67	0,67	0,60	0,31
Cys	0,383	0,386	0,410	0,400	0,0197	0,74	0,39	0,74	0,54
Gly	0,250	0,258	0,241	0,239	0,0072	0,26	0,13	0,53	0,23
His	0,270	0,268	0,263	0,260	0,0062	0,65	0,21	0,89	0,86
Ile	0,218	0,219	0,213	0,213	0,0031	0,29	0,09	0,78	0,39
Leu	0,628	0,631	0,622	0,618	0,0057	0,31	0,11	0,49	0,47
Lys	0,800	0,820	0,807	0,798	0,0083	0,23	0,58	0,09	0,32
Met	0,164	0,163	0,162	0,159	0,0029	0,63	0,21	0,78	0,99
Phe	0,348	0,345	0,346	0,343	0,0039	0,77	0,35	0,99	0,64
Pro	0,413	0,420	0,409	0,405	0,0067	0,45	0,27	0,39	0,41
Ser	0,768	0,753	0,788	0,781	0,0369	0,91	0,66	0,92	0,58
Thr	0,663	0,656	0,676	0,693	0,0257	0,76	0,36	0,64	0,79
Tyr	0,335	0,333	0,327	0,328	0,0059	0,68	0,27	0,77	0,69
Val	0,456	0,454	0,453	0,451	0,0021	0,35	0,08	0,83	0,78
I+L+V	1,302	1,304	1,288	1,280	0,0098	0,23	0,06	0,58	0,51
Total AAE	5,08	5,10	5,08	5,07	0,070	0,99	0,85	0,82	0,88
Total AA	8,015	8,094	8,070	8,018	0,1261	0,96	0,98	0,61	0,89

¹CTL: controle; L: baixa; M: média; H: alta; EPM: erro padrão da média; Trat: tratamento; Lin: linear; Quad: quadrático; Cub: cúbico.

²Asp: asparagina; Glu: glutamina; Ala: alanina; Arg: arginina; Cys: cisteína; Gly: glicina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lys: lisina; Met: metionina; Phe: fenilalanina; Pro: prolamina; Ser: serina; Thr: treonina; Tyr: tirosina Val: valina; I+L+V: isoleucina+leucina+valina; AAE: aminoácidos essenciais; AA: aminoácidos.

Quando foram analisados em relação à concentração de AA no plasma (Tabela 3.5) houve decréscimo linear dos teores plasmáticos de Gly e de Met com o aumento da Met na PM ($P<0,05$). Para a His e Ile, houve tendência a redução no mesmo sentido ($P=0,06$).

TABELA 3.5 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO PLASMA (PERCENTAGEM DO TOTAL DE AMINOÁCIDOS) DE VACAS EM LACTAÇÃO.

	CTL ¹	L	M	H	EPM	Valores de P			
						Trat	Lin	Quad	Cub
Asp ²	8,87	8,93	8,88	8,78	0,089	0,66	0,41	0,35	0,89
Glu	11,56	11,64	11,54	11,41	0,118	0,57	0,29	0,37	0,77
Ala	3,94	3,93	3,89	3,89	0,055	0,88	0,45	0,90	0,79
Arg	5,06	5,03	4,88	5,04	0,067	0,24	0,51	0,15	0,18
Cys	4,75	4,75	5,06	4,98	0,197	0,59	0,26	0,83	0,44
Gly	3,12	3,18	2,98	2,98	0,065	0,08	0,04	0,64	0,12
His	3,37	3,31	3,27	3,24	0,049	0,29	0,06	0,78	0,94
Ile	2,73	2,71	2,64	2,65	0,037	0,24	0,06	0,67	0,46
Leu	7,86	7,81	7,71	7,71	0,109	0,73	0,28	0,85	0,79
Lys	9,99	10,15	10,02	9,96	0,121	0,72	0,69	0,39	0,52
Met	2,05	2,02	2,00	1,99	0,021	0,14	0,02	0,69	0,86
Phe	4,36	4,27	4,29	4,28	0,063	0,74	0,44	0,56	0,61
Pro	5,15	5,19	5,08	5,05	0,063	0,38	0,16	0,60	0,37
Ser	9,56	9,27	9,73	9,72	0,361	0,78	0,56	0,70	0,45
Thr	8,26	8,08	8,35	8,62	0,239	0,44	0,21	0,34	0,67
Tyr	4,19	4,11	4,05	4,08	0,055	0,30	0,12	0,28	0,73
Val	5,71	5,62	5,63	5,63	0,081	0,86	0,54	0,58	0,80
I+L+V	16,29	16,14	15,98	15,99	0,213	0,70	0,27	0,71	0,87
Lys/Met	4,87	5,03	5,01	5,03	0,067	0,29	0,14	0,30	0,46
AAE	63,5	63,1	63,0	63,2	0,23	0,44	0,44	0,15	0,99

¹CTL: controle; L: baixa; M: média; H: alta; EPM: erro padrão da média; Trat: tratamento; Lin: linear; Quad: quadrático; Cub: cúbico.

²Asp: asparagina; Glu: glutamina; Ala: alanina; Arg: arginina; Cys: cisteína; Gly: glicina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lys: lisina; Met: metionina; Phe: fenilalanina; Pro: prolamina; Ser: serina; Thr: treonina; Tyr: tirosina Val: valina; I+L+V: isoleucina+leucina+valina; AAE: aminoácidos essenciais; AA: aminoácidos.

A análise da concentração dos AA no plasma, descritos na Tabela 3.6, demonstra redução ($P=0,03$) linear da concentração de Met como percentagem dos AAE com o aumento da concentração de Lys e Met na PM da dieta. Também houve tendência à redução das concentrações de His ($P=0,09$) e Ile ($P=0,06$).

TABELA 3.6 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO PLASMA (PERCENTAGEM DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS) DE VACAS EM LACTAÇÃO.

	CTL ¹	L	M	H	EPM	Valores de P			
						Trat	Lin	Quad	Cub
Arg ²	7,97	7,97	7,75	7,97	0,101	0,32	0,62	0,28	0,15
Cys	7,49	7,54	8,04	7,88	0,321	0,57	0,25	0,74	0,45
His	5,31	5,26	5,18	5,12	0,080	0,39	0,09	0,96	0,92
Ile	4,30	4,30	4,20	4,20	0,051	0,23	0,06	0,99	0,37
Leu	12,37	12,38	12,25	12,19	0,147	0,76	0,32	0,83	0,74
Lys	15,74	16,09	15,90	15,75	0,171	0,44	0,85	0,15	0,46
Met	3,23	3,20	3,18	3,14	0,031	0,20	0,03	0,86	0,85
Phe	6,86	6,77	6,81	6,76	0,088	0,83	0,49	0,80	0,56
Pro	8,11	8,24	8,06	7,99	0,096	0,34	0,21	0,32	0,36
Thr	13,02	12,82	13,26	13,64	0,381	0,48	0,19	0,46	0,68
Tyr	6,60	6,52	6,43	6,46	0,082	0,45	0,17	0,47	0,69
Val	8,99	8,91	8,93	8,91	0,108	0,94	0,63	0,83	0,77
I+L+V	25,66	25,59	25,38	25,29	0,278	0,75	0,30	0,97	0,83

¹CTL: controle; L: baixa; M: média; H: alta; EPM: erro padrão da média; Trat: tratamento; Lin: linear; Quad: quadrático; Cub: cúbico.

²Arg: arginina; Cys: cisteína; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lys: lisina; Met: metionina; Phe: fenilalanina; Pro: prolamina; Thr: treonina; Tyr: tirosina Val: valina; I+L+V: isoleucina+leucina+valina.

O aumento da suplementação de AA resultou em redução linear da ingestão de matéria orgânica digestível ($P=0,03$) e mostrou tendência a reduzir a digestibilidade da matéria orgânica no trato total ($P=0,10$) e a digestibilidade da FDN ($P=0,07$). A elevação da concentração de de AA na dieta não influenciou a síntese de proteína microbiana, mensurada pela produção diária de alantoína (Tabela 3.7).

TABELA 3.7 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LISINA E METIONINA NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL SOBRE PARÂMETROS DE DIGESTIBILIDADE E EXCREÇÃO DE ALANTOÍNA EM VACAS EM LACTAÇÃO.

	CTL ¹	L	M	H	EPM	Valores de P			
						Trat	Lin	Quad	Cub
DMS ² , %	70,6	68,9	69,0	68,3	0,98	0,37	0,11	0,60	0,57
DMO, %	70,8	69,4	68,9	68,5	1,42	0,38	0,10	0,58	0,86
DFDN, %	51,6	47,3	45,9	46,4	0,02	0,21	0,07	0,26	0,90
DOMI, kg/d	16,7	15,6	15,5	15,3	0,53	0,10	0,03	0,26	0,61
Alant., mmoles/d	426	371	382	368	26,8	0,32	0,14	0,41	0,42
Alant./DOMI	26,2	24,1	24,7	24,3	1,88	0,80	0,48	0,61	0,63

¹CTL: controle; L: baixa; M: média; H: alta; EPM: erro padrão da média; Trat: tratamento; Lin: linear; Quad: quadrático; Cub: cúbico.

²DMS: digestibilidade da matéria seca; DMO: digestibilidade da matéria orgânica; DFDN: digestibilidade da fibra em detergente neutro; Alant.: alantoína; DOMI: matéria orgânica digestível ingerida.

3.4 DISCUSSÃO

O objetivo de se formular dietas com adequado aporte de PM em relação às exigências dos animais, com teores adequados de PDR, sem serem excessivos, foi obtido. Na Tabela 3.2 observa-se a predição de balanço da PM, segundo o modelo utilizado do NRC (2001), que demonstrou estar muito próximo da neutralidade, ou seja, sem deficiência e sem excesso de PM.

A predição da produção de leite presumida pela PM (Tabela 3.2) foi condizente com a mensuração real de desempenho dos animais (Tabela 3.3), respectivamente predito e real para os grupos CTL (42,5 vs. 42,2 kg/vaca/dia), L (41,5 vs. 41,7 kg/vaca/dia), M (41,6 vs. 41,8 kg/vaca/dia) e H (41,9 vs. 41,5 kg/vaca/dia).

Uma das preocupações no planejamento do experimento foi embasar-se de maneira confiável em um modelo matemático que predissesse o fluxo de AA na PM, pois não haveria mensuração direta *in vivo*. Os valores preditos de produção de leite presumida pela PM, apresentados na Tabela 3.2, foram condizentes com a mensuração de produção real (Tabela 3.3). O modelo escolhido (NRC, 2001) demonstrou a precisão no balanceamento da dieta. Pacheco et al. (2012) afirmaram, ao comparar diferentes modelos matemáticos disponíveis à época, que o NRC (2001)

havia sido capaz de prever com acurácia o fluxo de AAE para o duodeno, especialmente em dietas à base de milho.

Patton (2010) comparou dois produtos comerciais à base de Met protegida da degradação ruminal (MPR), por meio de uma meta-análise, para avaliar o efeito da deficiência de AA sobre parâmetros zootécnicos. Também comparou o NRC (2001) com o AminoCow, outro programa para descrever metabolismo nitrogenado em vacas e descreveu que ambos os modelos foram, de maneira geral, seguros em prever o balanço de AA em vacas.

Lean et al. (2018) avaliaram o uso do programa computacional CNCPS 6.5 para prever o efeito de AA metabolizáveis sobre o desempenho de vacas em lactação, por meio de uma meta-análise.

Portanto, o NRC (2001), embora não seja o único programa computacional para este fim, é utilizado para predição de parâmetros nutricionais relacionados à proteína e aos AA da dieta de vacas em lactação.

Outro critério importante foi a definição da relação Lys: Met na PM. Na Tabela 3.2, observa-se que as concentrações de Lys e Met na PM estavam de acordo com os objetivos do experimento, atentando-se que estes dados consideraram a composição bromatológica dos alimentos utilizados. A dieta CTL apresentava um desequilíbrio na relação Lys:Met na PM, de 3,49:1 (6,31:1,81, respectivamente) e a suplementação dos AA protegidos resultou em relações Lys: Met mais próximas do objetivo (2,96:1; 2,97:1; e 2,95:1, respectivamente, para os grupos baixa, média e alta concentração de AA na PM), que era de 3,0:1, a relação recomendada pelo NRC (2001). Portanto, sem a suplementação de AA, a relação Lys: Met estava em desacordo com a recomendação, o que pode comprometer o aporte de PM. Quando esta fração supre de modo muito justo as exigências do animal ou de forma desbalanceada, alguns AAE podem se tornar limitantes, em razão de oscilações usuais na dieta, e outros podem se tornar excessivos, sendo direcionados para o catabolismo, o que reduz a eficiência do uso de N (ARRIOLA APELO et al., 2014) e pode comprometer o atendimento às exigências de AA.

No artigo de Patton (2010), as médias de Lys e Met foram, respectivamente, de 6,33 e 2,35% da PM, nas dietas que receberam MPR, resultando, portanto, em uma relação Lys: Met na PM de 2,69:1. O autor atenta que os valores estão abaixo do

recomendado (7,3 e 2,5% da PM, respectivamente). De maneira geral, a suplementação de MPR aumentou a produção de proteína verdadeira no leite em percentagem (+0,07%) e em quantidade (+27 g/vaca/dia). A produção de leite teve um pequeno aumento. Quando as vacas que tinham balanço positivo predito de AA eram suplementadas com MPR, a produção de leite aumentou. Porém, quando o balanço predito de AA era negativo, a suplementação de MPR reduziu a produção de leite (PATTON, 2010). Não houve efeito de variação do teor de MPR suplementada sobre os resultados zootécnicos.

Lean et al. (2018) relataram que a Met, Leu e AA não essenciais (AANE), mensurados em g/dia, foram associados com o aumento da produção de proteína no leite. Porém, somente a Met foi associada com o aumento do teor de proteína no leite. Neste trabalho, uma variação de somente 5,5 g Met metabolizável/vaca/dia (51,91 vs. 56,96 g/vaca/dia), equivalente a 2,11 e 2,24% Met na PM teve significativo impacto na porcentagem e na produção de proteína no leite.

No presente experimento, o fornecimento predito de Met metabolizável variou de 48,0 a 63,0 g/vaca/dia, desde o grupo CTL até o grupo H, ou seja, uma variação de 15,0 g/vaca/dia e não foi observado efeito sobre a produção e a composição do leite.

Noftsgger et al. (2005) compararam um grupo controle, que não recebeu nenhuma suplementação de aminoácidos com três diferentes fontes de metionina e metionina hidróxi-análogo (HMB, HMBi e DL-metionina não protegida da degradação ruminal). Houve tendência ($P=0,06$) de efeito da suplementação sobre a produção de leite, com o maior valor observado para o grupo controle e o menor, para DL-metionina (38,5 e 35,8 kg/vaca/dia, respectivamente). O teor de proteína no leite foi significativamente maior para o grupo HMBi (3,02 vs. 2,91%, para HMBi e controle, respectivamente), assim como a produção de proteína no leite (1,16 vs. 1,12 kg/vaca/dia, respectivamente). Não houve diferença entre os tratamentos para perfil de ácidos graxos voláteis no rúmen e concentração ruminal de amônia, indicando uma provável não interferência com o crescimento da flora ruminal. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos para os demais parâmetros de composição do leite, NUL ou peso corporal.

Patton (2010) descreveu que a não resposta à suplementação de AA na forma protegida ruminalmente pode ser devida a efeitos não estudados em sua meta-análise. Ainda não se dispunha, àquela época, de uma equação que predissesse com segurança o efeito da suplementação de AA sobre a proteína verdadeira do leite. Uma possível explicação é que vários trabalhos utilizados em sua meta-análise suplementaram AA pós-pico de produção, quando as vacas já perderam o suporte hormonal para aumento da produção de leite. Schwab et al. (1992) apresentaram resposta em produção de leite quando houve a infusão abomasal de Lys e Met.

Foi demonstrado por Pisulewski et al. (1996) que altos teores plasmáticos de Met causaram constrição do fluxo sanguíneo para a glândula mamária, o que pode ter contribuído para redução da produção de leite. Outra possível explicação (Cant et al., 2009, citados por Patton, 2010) é que um AA individualmente pode regular a produção de proteína verdadeira no leite, sem alterar o fornecimento de AA totais para a glândula mamária. Embora eles tenham proposto esta teoria para outros AA que não a Met, este pode ser um mecanismo geral de regulação da síntese de proteína láctea. Berthiaume et al. (2006) mostraram a capacidade do fígado em remover o excesso de Met e a habilidade da glândula mamária em deprimir a captação de quantidades extras de Met. Portanto, a não resposta à suplementação de LMPR neste trabalho pode ser explicada por um ou mais destes efeitos.

Patton (2010) não observou efeito do aporte de Lys metabolizável (g/vaca/dia), ou mesmo da Lys como percentagem da PM, sobre a produção de proteína verdadeira no leite. Lean et al. (2018) afirmaram que a Lys não foi associada com aumento da produção de proteína no leite, teor de proteína no leite ou produção de leite.

Doepel et al. (2004) recomendaram o fornecimento de 142 ou 162 g de Lys metabolizável/vaca/dia. Os valores observados por Lean et al. (2018), comparando-se a não suplementação com a suplementação, foram de 156,76 vs. 161,89 g/vaca/dia de Lys metabolizável, o que os levou a concluir que ou a Lys não era limitante ou o fornecimento foi insuficiente para se resultar em efeito significativo nas variáveis avaliadas. No presente experimento, a suplementação estimada variou de 169,0 a 186,0 g de Lys metabolizável/vaca/dia e também não se observou efeito deste AA sobre os parâmetros mensurados. Lean et al. (2018) alegaram que pode ter havido

diferenças entre os métodos utilizados nos respectivos experimentos e que a infusão abomasal tende a ser um método mais confiável que a estimativa fornecida pelo CNCPS 6.5. A estimativa que estes autores observaram em sua meta-análise foi de 6,36 e 6,38% Lys na PM e, portanto, abaixo da própria recomendação do CNCPS versão 6.5, que é de 6,68% de Lys na PM.

Neste experimento, o grupo controle teve uma estimativa de 6,31%, abaixo destes valores, mas os demais grupos tiveram 6,55, 6,86 e 7,16% de Lys na PM, respectivamente para os grupos L, M e H. Kajikawa et al. (2002) observaram que o fornecimento de Lys em meio de cultura com bactérias ruminais inibiu a taxa de crescimento microbiano ($P < 0,01$) e a eficiência de crescimento microbiano ($P < 0,05$), quando comparado com a suplementação dos 20 AA. As inibições do crescimento microbiano, descritas também para outros AA, podem ser causadas principalmente por um *feed back* negativo sobre enzimas da fase inicial de síntese do AA. Esta inibição suprime a produção de outros AA que também dependem desta enzima que foi inibida. Ainda segundo Kajikawa et al. (2002), quando a síntese de um AA é deprimida em um meio de cultura microbiana, aumenta a exigência de outros AA naquele meio.

Lean et al. (2018) avaliaram, ainda, um conjunto de dados onde a diferença de fornecimento de Lys metabolizável foi maior que 20 g/vaca/dia entre os grupos controle e tratamento, mas mesmo assim nenhum efeito foi observado sobre produção de leite, porcentagem de proteína ou produção de proteína no leite.

Ao comparar dois produtos comerciais à base de MPR e encontrar diferenças de resultados entre os produtos, Patton (2010) argumentou que, entre outras, as possíveis explicações podiam estar relacionadas à maneira de liberação do AA no rúmen, ou ao sistema de encapsulamento, à eficiência do encapsulamento ou, ainda, em qual porção do intestino a liberação de cada produto ocorre. Não foi encontrada na literatura informação sobre a eficácia do método de encapsulamento utilizado no presente estudo. O objetivo do recobrimento com lipídeos ricos em ácidos graxos saturados é reduzir a liberação ruminal e permitir sua disponibilização no intestino delgado, após ação dos mecanismos de digestão destes lipídeos. Porém, pelos resultados obtidos, não foi possível concluir sobre a eficiência deste método de proteção ruminal de AA.

O estágio da lactação (dias em leite) apresentou efeito negativo linear sobre a produção de leite e produção de proteína verdadeira no leite (LEAN et al., 2018), atentando-se que os dias médios em lactação (DEL, média \pm desvio-padrão) neste experimento foi de 105 ± 66 dias. Tem havido ênfase em trabalhos com suplementação de AA no período de transição. Ou seja, embora haja artigos publicados com a suplementação de AA protegidos para vacas em lactação, parece haver interesse crescente na suplementação destes AA, especialmente de Met, durante o período de transição.

Há interesse em se entender os possíveis efeitos de demais parâmetros nutricionais sobre o desempenho de vacas suplementadas com AA protegidos ruminalmente. O aumento dos teores de extrato etéreo, amido e fibra solúvel na dieta foi associado com aumento de produção de leite e de produção de proteína no leite, refletindo seu efeito positivo na produção de proteína microbiana ruminal, metabolismo energético pós-ruminal e produção de lactose (LEAN et al., 2018).

Patton (2010) observou, ao analisar os resultados da suplementação de MPR, ligeiro decréscimo na ingestão de MS, resultado semelhante à queda do consumo de MS com a suplementação de AA protegidos, neste trabalho.

As digestibilidades aparentes da matéria orgânica e da fibra em detergente neutro foram maiores para os três grupos suplementados do que para o grupo controle (NOFTSGER et al., 2005), indicando uma provável alteração no ecossistema microbiano ruminal. Porém, não houve efeito sobre a população de protozoários do rúmen ou omaso.

Possível explicação para a redução da IMS e da ingestão de matéria orgânica digestível, além da tendência à redução da digestibilidade da matéria orgânica e da digestibilidade da FDN, observadas no presente estudo, concentram-se no efeito inibidor da síntese de AA pela flora ruminal (KAJIKAWA et al., 2002), quando da adição de um ou poucos AA em detrimento da suplementação mais completa de AA. A possível redução da população microbiana impactou na digestibilidade da matéria orgânica, o que pode ter contribuído para reduzir a IMS. Isso, contudo, não reduziu a produção de proteína microbiana ruminal, mensurada pelos parâmetros de alantoína.

3.5 CONCLUSÕES

A suplementação crescente de Lys e Met protegidas da degradação ruminal não resultou em melhora de desempenho de diversos parâmetros zootécnicos em vacas em lactação, em dietas com baixos teores de N, mas suficientes em PM. A ausência de resposta aos suplementos envolveu redução da digestão da dieta no trato total e redução da ingestão de MS. A menor digestibilidade da FDN e menor ingestão de MS sugerem um efeito negativo dos suplementos de AA na função ruminal, possivelmente mediada pela redução da síntese de proteína microbiana, quando da adição de LMPR, especificamente se houver liberação, ainda que parcialmente, dos AA no ambiente ruminal. A redução do fornecimento de AA microbiano ao intestino delgado pode ter encoberto um possível efeito positivo da suplementação de AA sobre o desempenho da lactação, ou seja, a possível redução do aporte de AA para o intestino delgado limitou a resposta em produção de leite ou de componentes do leite. Manter a síntese microbiana ruminal parece ser essencial para a detecção de um efeito positivo de suplementos de AA protegidos da degradação ruminal, especialmente em dietas que dependem de uma grande proporção de AA microbianos para o fornecimento de AA metabolizáveis.

Não houve efeito da suplementação de níveis crescentes de lisina e metionina protegidas da degradação ruminal sobre a proteína microbiana diretamente. Porém, a redução da ingestão da matéria orgânica digerida e a própria redução da ingestão de matéria seca podem ter sido devidas à possível redução da síntese de proteína microbiana. Esta, por sua vez, pode ter induzido a um aporte insuficiente de AA de cadeia ramificada (BCAA) no plasma, tornando-os mais limitantes à síntese de proteína pela glândula mamária do que a Lys e a Met. A suplementação de BCAA em associação com Lys e Met protegidas da degradação ruminal pode ser uma estratégia plausível para dietas de baixo teor de N.

3.6 REFERÊNCIAS

ARRIOLA APELO, S.I.; KNAPP, J.R.; HANIGAN, M.D. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. **J. Dairy Sci.** v.97, p. 4000–4017, 2014.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007a, method 936.15 (4.1.06).

BELASCO, I. J. Fate of carbon-14 labeled methionine hydroxy analog and methionine in the lactating dairy cow. **J. Dairy Sci.** v.63, p. 775-784, 1980.

BENTLEY Instruments, Inc. **Bentley Sistema Combinado 2300. Operator's manual**. Chaska: Bentley, 2007. 115p.

BERTHIAUME, R.; THIVIERGE, M. C.; PATTON, R. A.; DUBREULL, P.; STEVENSON, M.; MCBRIDE, B. W.; LAPIERRE, H. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 1621–1634, 2006.

CAMPBELL, C.G.; TITGEMEYER, E.C.; ST-JEAN, G. Sulfur amino acid utilization by growing steers. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 230–238, 1997.

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**. Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992, 22p.

DOEPEL, L.; PACHECO, D.; KENNELLY, J. J.; HANIGAN, M. D.; LOPEZ, I. F. ; LAPIERRE, H. Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.1279–1297, 2004.

KAJIKAWA, H.; MITSUMORI, M.; OHMOMO, S. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. **J. Dairy Sci.**, v.85, p. 2015-2022, 2002.

LEAN, I.J.; DE ONDARZA, M.B.; SNIFFEN, C.J.; SANTOS, J.E.P.; GRISWOLD, K.E. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. **J. Dairy Sci.**, v.101, p. 340-364, 2018.

LEE, C.; HRISTOV, A. N.; CASSIDY, T. W.; HEYLER, K S.; LAPIERRE, H.; VARGA, G. A.; DE VETH, M. J.; PATTON, R. A.; PARYS, C. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. **J. Dairy Sci.**, v.95, p. 6042-6056, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy cattle.** Washington, DC: Natl. Acad. Sci., 7 ed., 2001.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R.; SYLVESTER, J. T. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 223-237, 2005.

PACHECO, D.; PATTON, R.A; PARYS, C.; LAPIERRE, H. Ability of commercially available dairy ration programs to predict duodenal flows of protein and essential amino acids in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.95, n. 2, p. 937-963, 2012.

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. **J. Dairy Sci.**, v.93, n. 5, p. 2105-2118, 2010.

PISULEWSKI, P. M.; RULQUIN, H.; PEYRAUD, J. L.; VERITE, R. Lactational and systemic responses of dairy cows to postruminal infusions of increasing amounts of methionine. **J. Dairy Sci.**, v.79, p.1781–1791, 1996.

SALVATI, G.G.S.; MORAIS JÚNIOR, N.N.; MELO, A.C.S.; VILELA, R.R.; CARDOSO, F.F.; ARONOVICH, M.; PEREIRA, R.A.N.; PEREIRA, M.N. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. **J. Dairy Sci.**, v.98, p. 4062–4073, 2015.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide: Statistics.** Cary, NC: SAS Inst. Inc., 8 v., 2000.

SCHWAB, C.G.; BOZAK, C.K.; WHITEHOUSE, N.L.; OLSON, V.M. Amino acid limitation and flow to the duodenum at four stages of lactation. 2. Extent of lysine limitation. **J. Dairy Sci.**, v.75, p.3503-3518, 1992.

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

WHITEHOUSE, N. L.; SCHWAB, C. G.; TYLUTKI, T.; SLOAN, B. K. Optimal lysine and methionine concentrations for milk protein production as determined with the latest versions of Dairy NRC (2001) and AMTS-Cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 96 (E-Suppl. 1), p. 253, 2013.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. **J. Dairy Sci.**, v.65, p. 495-501, 1982.

YOUSEF, M.K. In: **Basic principles. Stress physiology in livestock.**, v.1 Boca Raton: CRC Pres, 1985.

4 CAPÍTULO 3: SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL, EM DOIS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de lisina (Lys) e metionina (Met) protegidas da degradação ruminal (LMPR) em dietas com dois teores de proteína bruta (PB) para vacas e seus efeitos sobre: produção e composição do leite, parâmetros do metabolismo nitrogenado, peso vivo (PV), escore de condição corporal (ECC) e ingestão de matéria seca (IMS). Inicialmente, 36 vacas foram utilizadas, formando-se 9 blocos de 4 animais cada. Os animais permaneceram alojados em estábulo tipo *free stall*. O delineamento experimental foi Quadrados Latinos 4 x 4. Os 4 animais de cada bloco foram distribuídos aleatoriamente para receber cada um dos 4 tratamentos distintos em um esquema fatorial 2 x 2 (dois teores de proteína vs. inclusão ou não de aminoácidos (AA)). Foram 4 períodos de 21 dias (14 dias de adaptação e 7 dias de coleta de variáveis). Os tratamentos foram: baixa proteína sem suplementação de AA (BPXX, 15,1% PB, 6,52% Lys na PM e 1,80% Met na PM), baixa proteína suplementada com AA (BPAA, 15,2% PB, 6,77% Lys e 2,22% Met), alta proteína sem suplementação de AA (APXX, 16,5% PB, 6,50% Lys e 1,78% Met) e alta proteína com suplementação de AA (APAA, 16,6% PB, 6,82% Lys e 2,24% Met). Foram mensurados: produção de leite, teores de gordura, proteína, lactose, caseína, sólidos totais, nitrogênio ureico no leite (NUL) e contagem de células somáticas (CCS). Também foram analisadas: proteínas séricas totais, albumina sérica, globulinas séricas, glicose plasmática e ureia plasmática. Em amostras de urina foram analisados: ureia, creatinina, ácido úrico, alantoína e estimativa de produção diária de urina. Foram estimados IMS, PV e avaliado ECC. A análise estatística utilizou modelo com os efeitos aleatórios de bloco e vaca dentro do bloco e os efeitos fixos de período, dieta (teor de PB e suplementação dos AA ou não) e a interação entre teor de PB e suplementação de AA. Não houve efeito do teor de PB da dieta sobre produção de leite, mas aumentaram os teores de proteína no leite (3,27 vs. 3,32%) e de caseína. Porém, resultou em maior excreção de NUL (11,8 vs. 14,4 mg/dL), em aumento do nitrogênio ureico plasmático (10,22 vs. 13,15 mg/dL), maior teor de ureia urinária (848,3 vs. 1.026,0 mg/dL), maior produção de urina (36,8 vs. 40,9 L/dia); e houve tendência a maior ECC. A suplementação de LMPR não teve efeito sobre os parâmetros de produção e composição do leite, exceto pela tendência ao menor teor de lactose; reduziu a glicose plasmática; e aumentou os teores de nitrogênio ureico (413,6 vs. 448,6 mg/dL) e ácido úrico. A interação entre o teor de PB da dieta com a suplementação ou não de AA resultou em efeito significativo sobre produção diária de urina; e tendeu a reduzir a IMS estimada pelo FDNi (29,7 vs. 29,5 vs. 26,2 vs. 30,5 kg/vaca/dia, respectivamente para os grupos BPXX, BPAA, APXX e APAA). O número de dias médios em lactação ($155,8 \pm 66,0$) das vacas pode ter contribuído para a ausência de resposta em produção.

Palavras-chave: Aminoácidos. Proteína metabolizável. Vacas em lactação.

ABSTRACT

The objective of this trial was to evaluate the effects of rumen protected lysine (Lys) and methionine (Met) (LMPR) in two different levels of crude protein (PB) diets for lactating cows on milk production and composition, nitrogen metabolism parameters, live weight (PV), body condition score (ECC) and dry matter intake (IMS). Initially, 36 Holstein lactating cows were housed and fed in a free stall barn, 9 groups were formed, based on parity, days in milk and milk production and assigned to a sequence of 4 treatments in 4 x 4 Latin Squares with 21-day periods (14 days of adaptation), designed with 2 x 2 factorial arrangement (2 levels of PB vs. AA supplementation or not). The treatments were: low protein without AA supplementation (BPXX, 15.1% PB, 6.52% Lys on PM and 1.80% Met on PM), low protein supplemented with AA (BPAA, 15.2% PB, 6.77% Lys and 2.22% Met), high protein without AA supplementation (APXX, 16.5% PB, 6.50% Lys and 1.78% Met) and high protein with AA supplementation (APAA, 16.6% PB, 6.82% Lys and 2.24% Met). The following variables were evaluated: milk production; milk content of: fat, protein, lactose, casein, total solids; milk urea nitrogen, somatic cell count (CCS), total serum protein, serum albumin, serum globulin, plasma glucose, plasma urea; in urine: urea, creatinine, uric acid, allantoin and estimation of daily urine production; estimation of IMS, PV, and ECC. Data obtained was analyzed with Mixed procedure of SAS using the following information in the model: overall mean, random block effect, random cow within block effect, fixed period effect, fixed treatment effect (PB level vs. AA supplementation or not), the interaction between PB level and AA and residual error. There was no effect of PB level on milk production, but there were increases on milk protein (3.27 vs. 3.32%) and on casein. However, increasing PB in the diet increased NUL (11.8 vs. 14.4 mg/dL), plasma urea N (10.22 vs. 13.15 mg/dL), urinary urea (848.3 vs. 1,026.0 mg/dL), daily urine production (36.8 vs. 40.9 L/day) and tend to increase ECC. LMPR supplementation did not affect milk production and composition, except for the tendency to lower lactose content. It also decreased plasma glucose and increase plasma ureic nitrogen (413.6 vs. 448.6 mg/dL) and uric acid. The interaction between PB levels and AA supply influenced daily urine production and tended to decrease IMS estimated based on indigestible NDF (29.7 vs. 29.5 vs. 26.2 vs. 30.5 kg/cow/day, respectively for BPXX, BPAA, APXX and APAA groups). The interaction did not affect milk production and composition. The days in milk (155.8±66.0, in the beginning of the trial) should have contributed to lack of response in milk production.

Key-words: Amino acids. Metabolizable protein. Lactating cows.

4.1 INTRODUÇÃO

Há interesse em avaliar a resposta da suplementação de aminoácidos protegidos da degradação ruminal para vacas em lactação e sua possível interação com os teores de proteína bruta da dieta.

A predição acurada da produção de proteína no leite em função da suplementação de aminoácidos é crítica para a decisão do uso de aminoácidos protegidos para vacas em lactação. Em uma meta-análise sobre os efeitos da suplementação de Lys e Met sobre a produção de proteína do leite, Vyas e Erdman (2009) constataram que a resposta em proteína do leite à suplementação dos aminoácidos na dieta varia continuamente e reduz-se com o aumento da ingestão de aminoácidos e mesmo com o aumento da ingestão de PM. Pode inferir-se, portanto, que há valores ótimos de suplementação de aminoácidos, pois a suplementação exagerada pode resultar em menor eficiência do uso de N e na oxidação do aminoácido para produção de energia, com excreção do N, além de um possível efeito depressor da síntese de proteína microbiana, se houver liberação do AA no rúmen.

Nesta mesma meta-análise, Vyas e Erdman (2009) determinaram a resposta em produção de proteína no leite a partir da quantidade de Lys e de Met suplementadas e não somente em sua concentração na PM. Isto poderia corrigir possíveis erros causados pela variação no consumo de alimentos.

Um dos possíveis fatores que influenciam na variabilidade dos resultados é o teor de PB dietética, visto que pode haver interação entre a suplementação de AA e os teores de PB, que poderia alterar a quantidade de AA oriundo da proteína microbiana (BARROS et al., 2017; LEONARDI et al., 2003).

No experimento anterior, descrito no Capítulo 2, utilizou-se uma relação fixa entre os teores de Lys e Met na PM (próxima a 3:1), com base nas recomendações do NRC (2001) e variou-se o teor de ambos os AA na PM, desde o controle sem suplementação de AA e que, portanto, resultou em uma relação desequilibrada de 3,49:1. Nos demais tratamentos, houve aumento dos teores dos AA, mantendo-se a relação próxima a 3:1. Resumidamente, não houve aumento de desempenho nos parâmetros zootécnicos com o aumento da suplementação de AA.

Porém, dada a inexistência de experimentos com suplementação de AA protegidos da degradação ruminal nas condições brasileiras, percebeu-se a

oportunidade para avaliar a suplementação de Lys e Met protegidas da degradação ruminal (LMPR) para vacas em lactação. No Brasil, diferentemente de outros países onde foi realizada grande parte dos trabalhos que estudam a maior eficiência na suplementação de AA na PM, não é permitido o uso de fontes de proteína animal para ruminantes adultos; há poucas opções de fontes de AA protegidos da degradação ruminal ou se análogos da Met para vacas em lactação; são relativamente recentes os programas de pagamento de leite por qualidade, incluindo o teor de proteína no leite; e ainda há baixa utilização de ferramentas de monitoramento zootécnico dos rebanhos, que permitem maior precisão na nutrição de vacas em lactação.

Destaca-se, ainda, a realização do experimento em condições mais próximas da realidade de fazendas comerciais e em dois teores de PB da dieta: um mais elevado (aqui denominado “alta” proteína), próximo aos praticados em rebanhos comerciais e outro, com menor teor (“baixa” proteína), ambos sem e com suplementação de LMPR, mantendo-se a relação próxima a 3 Lys:1 Met na PM, nos tratamentos com suplementação de AA, mas em teores moderados (6,77 e 6,82% Lys na PM; e 2,22 e 2,24% Met na PM), em razão dos resultados do experimento anterior.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de Lys e Met protegidas da degradação ruminal em dietas com dois teores de proteína bruta para vacas em lactação e seus efeitos sobre: produção de leite, teores e produções de gordura, proteína, caseína, lactose e sólidos totais, teor e excreção diária de nitrogênio ureico no leite, contagem de células somáticas, parâmetros sanguíneos e urinários, peso vivo, escore de condição corporal e ingestão de matéria seca.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob parecer nº 1.000, em 24/09/2015 (Anexo A).

4.2.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DESCRIÇÃO DAS INSTALAÇÕES

Inicialmente, 36 vacas foram utilizadas, formando-se assim 9 blocos de 4 animais cada, porém foram utilizados os dados de 35 animais devido à morte de 1 vaca, ainda na fase inicial do primeiro período, por motivo alheio ao experimento. Das 36 fêmeas, 12 eram primíparas. Os animais permaneceram alojados em estrutura tipo *free stall*, com capacidade para 64 animais, com livre acesso à água e ao alimento. Os animais foram ordenhados duas vezes ao dia, às 06:00 e às 18:00 horas, em sala de ordenha rotatória modelo *tandem*, com 12 posições de ordenha e com registro automático de informações através do software Dairy Plan®.

No início do período experimental, os animais apresentavam: ordem média de lactações (média \pm desvio-padrão) $2,1 \pm 0,9$; produção de leite $39,5 \pm 7,3$ kg/vaca/dia; e $155,8 \pm 66,0$ dias em lactação. Todos os animais experimentais receberam aplicações de somatotropina recombinante bovina (rBST)¹ em intervalos de 10 e 11 dias sucessivamente.

A temperatura e umidade ambientais foram mensuradas em intervalo de 30 minutos por um termohigrômetro digital (EasyLog-USB-2-LCD, Lascar Electronics, Salisbury, Reino Unido), posicionado a 1,0 m do piso, sobre a cama dos animais. O índice de temperatura e umidade (THI, Figura 4.1) foi calculado de acordo com Yousef (1985): $THI = T + 0,36 \times PO + 41,2$; onde T = temperatura (°C) and PO = ponto de orvalho. A mensuração do THI demonstrou temperatura média de $17,6 \pm 4,9$ °C; umidade relativa do ar em $79,3 \pm 12,1$ %; THI $63,7 \pm 5,8$, com total de 3.966 registros em intervalos de 30 minutos.

¹ Lactotropin, Elanco Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

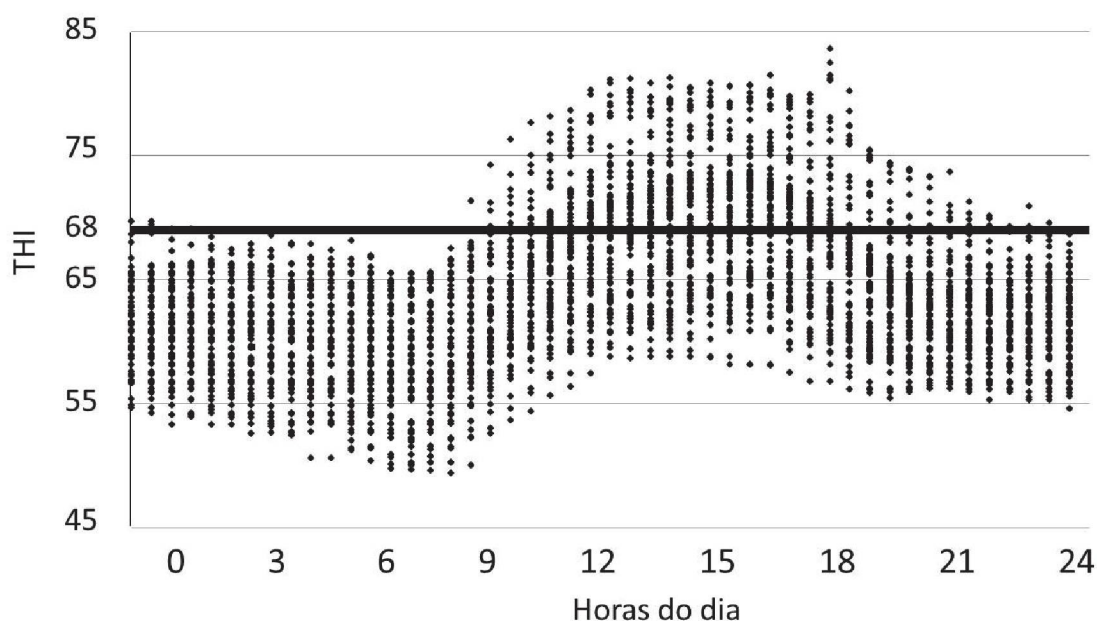


FIGURA 4.1 – ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (THI) DENTRO DO ESTÁBULO, DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.

A duração total do experimento foi de 91 dias, consistindo de 7 dias iniciais de adaptação mais 4 períodos de 21 dias cada. Foi realizado no Setor de Bovinocultura Leiteira (SBL), da Fazenda Experimental Gralha Azul (FEGA), da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), situada no município de Fazenda Rio Grande, na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná.

4.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental adotado foi um quadrado latino 4 x 4, onde as vacas elegíveis a participar do experimento foram separadas em 9 blocos contendo 4 animais cada. A utilização de blocos visa agrupar animais com características semelhantes entre si, melhorando a uniformidade dentro do bloco.

A blocagem foi realizada em função da ordem de lactação, produção de leite e dias em lactação. Os 4 animais de cada bloco foram distribuídos aleatoriamente para receber cada um dos 4 tratamentos distintos em um esquema fatorial 2 x 2 (dois teores de proteína x inclusão ou não de aminoácidos). O período de fornecimento de

cada tratamento foi de 21 dias, após os quais os animais seguiram para outro tratamento distinto do(s) anterior(es).

4.2.3 DIETAS EXPERIMENTAIS

Os tratamentos consistiram em fornecimento de dieta com alta ou baixa PB dietética (quando comparados aos teores usuais de rebanhos comerciais), juntamente com a suplementação ou não de Lys e Met protegidos da degradação ruminal. Os teores de Met e Lys utilizados foram embasados nos conceitos do NRC (2001) e para que a relação entre os 2 AA fosse mantida em 3:1, os teores de lisina e metionina como proporção da proteína metabolizável da dieta foram de 6,8 e 2,3%, respectivamente. O perfil de nutrientes das fontes de AA foi disponibilizado pelo fornecedor dos produtos². Os 4 tratamentos foram:

- a) Baixa proteína, sem suplementação de aminoácidos (BPXX);
- b) Baixa proteína, com suplementação de aminoácidos (BPAA);
- c) Alta proteína, sem suplementação de aminoácidos (APXX); e
- d) Alta proteína, com suplementação de aminoácidos (APAA).

A composição das dietas e seus teores nutricionais (ajustados de acordo com as análises bromatológicas obtidas) estão apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

A dieta foi fornecida na forma de dieta total misturada (TMR) sempre após as ordenhas, em quantidade suficiente para se obter cerca de 5% de sobras ao final do dia. Todos os animais receberam uma dieta base composta por silagem de milho, feno de tifton, ração comercial (cujá formulação manteve-se constante durante todo o experimento), milho grão moído, farelo de soja, casca de soja peletizada, suplemento mineral-vitamínico e bicarbonato de sódio. Sobre a TMR já no cocho, foram fornecidos os complementos de cada tratamento (que visavam complementar a MS ofertada da dieta, mantendo-as o mais semelhante possível entre os tratamentos); nos

² LysiPEARL® e MetiPEARL®, Kemin Industries Inc., Des Moines, EUA.

tratamentos de alta proteína o complemento foi de farelo de soja, já para os tratamentos de baixa proteína o complemento foi de casca de soja.

TABELA 4.1 – COMPOSIÇÃO (EM PORCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA, SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL.

Ingredientes (%MS) ¹	Baixa proteína		Alta proteína	
	Sem AA	Com AA	Sem AA	Com AA
Silagem de milho	43,93	43,92	43,93	43,91
Feno de tifton	2,93	2,93	2,93	2,93
Milho grão moído	3,22	3,00	3,22	2,95
Farelo de soja	-	-	3,66	3,66
Casca de soja	3,66	3,66	-	-
Concentrado comercial ²	44,62	44,61	44,62	44,60
Bicarbonato de sódio	1,10	1,10	1,10	1,10
Sal mineralizado ³	0,55	0,55	0,55	0,55
LysiPEARL® (g/vaca/dia) ⁴	-	0,12 (32,0)	-	0,17 (46,0)
MetiPEARL® (g/vaca/dia) ⁵	-	0,12 (32,0)	-	0,14 (38,0)
Total	100,00	100,00	100,00	100,0

¹MS: matéria seca, AA: aminoácidos;

²Concentrado comercial (MS%): 88,5% MS; 26,09% PB; 2,94% EE; 7,70% MM; 18,41% FDN; 1,43% Ca; 0,60% P; 0,30% Na; 0,44% Cl; 1,13% K; 0,17% S; 0,68 mg/kg Co; 24,86 mg/kg Cu; 1,36 mg/kg I; 113,0 mg/kg Mn; 0,68 mg/kg Se; 124,36 mg/kg Zn; 7.910,0 UI/kg vit. A; 2.035,0 UI/kg vit. D; 54,2 UI/kg; 33,9 mg/kg monensina sódica;

³Sal mineralizado (MS%): 18,0% Ca; 8,0% P; 5,8% Na; 9,0% Cl; 1,0% S; 110,0 mg/kg Co; 650,0 mg/kg Cu; 80,0 mg/kg I; 1.848,0 mg/kg Mn; 20,0 mg/kg Se; 2.554,0 mg/kg Zn;

⁴40,0% Lisina, entre parênteses consta a quantidade, em g/vaca/dia, fornecida de cada suplemento;

⁵56,0% Metionina, entre parênteses consta a quantidade, em g/vaca/dia, fornecida de cada suplemento.

O ajuste de MS da dieta foi realizado semanalmente com a quantificação do teor de umidade da silagem de milho através de aparelho tipo Koster®.

Os AA foram fornecidos na forma de *top dress* em diferentes quantidades em cada um dos tratamentos. O fornecimento dos AA foi feito juntamente com milho grão moído perfazendo o total de 200 g de suplemento/cabeça/dia (aminoácidos e milho). Para os grupos que não receberam os aminoácidos, o milho também foi fornecido para que a MS ofertada fosse igual. Os suplementos foram fornecidos individualmente a cada vaca dos respectivos grupos, quando contidas no canzil, no momento da

alimentação pós-ordenha, duas vezes ao dia. Observava-se o consumo individual de cada animal e, em não havendo, registrava-se a informação.

TABELA 4.2 – PREDIÇÕES DO NRC (2001) EM DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA, SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL¹.

Ingredientes	Baixa proteína		Alta proteína	
	Sem AA	Com AA	Sem AA	Com AA
Matéria seca (MS, %)	48,17	48,17	48,17	48,17
Ingestão de MS estimada (IMS, kg/v/d)	27,3	27,3	27,3	27,3
Energia líquida de lactação (ELL, Mcal/kg)	1,54	1,54	1,56	1,56
Fibra em detergente neutro (FDN, %MS)	34,9	34,9	33,1	33,0
FDN de forragem (FDN forr, %MS)	19,8	19,8	19,8	19,8
Amido (%MS)	29,9	29,5	30,1	30,0
Carboidratos não fibrosos (CNF, %MS)	41,6	41,4	41,9	41,7
Extrato etéreo (EE, %MS)	2,8	2,7	2,8	2,9
Proteína bruta (PB, %MS)	15,1	15,2	16,5	16,6
Proteína degradável no rúmen (PDR, %MS)	9,5	9,5	10,5	10,5
Proteína não degradável no rúmen (PNDR, %MS)	5,6	5,7	6,0	6,1
PL ² presumida pela ELL (kg/v/d)	45,6	45,7	46,2	46,4
PL presumida pela PM (kg/v/d)	41,7	42,2	45,5	46,1
PM fornecida (g/vaca/dia)	2.815	2.837	2.976	3.005
Balanço de PM (g/vaca/dia)	-35,0	-13,0	132,0	189,0
Balanço de PDR (g/vaca/dia)	-70,0	-70,0	186,0	186,0
PM microbiana (g/vaca/dia)	1.413	1.414	1.454	1.455
PNDR na PM (g/vaca/dia)	1.273	1.294	1.393	1.421
Proteína endógena na PM (g/vaca/dia)	129,0	129,0	129,0	129,0
Lisina metabolizável (g/vaca/dia)	184,0	192,0	193,0	205,0
Metionina metabolizável (g/vaca/dia)	51,0	63,0	53,0	67,0
Lisina (como % da PM)	6,52	6,77	6,50	6,82
Metionina (como % da PM)	1,80	2,22	1,78	2,24
Relação lisina:metionina	3,62	3,05	3,65	3,04

¹Dietas estimadas pelo NRC (2001);

²MS: Matéria seca; AA: aminoácidos; PL: produção de leite; PM: proteína metabolizável.

4.2.4 COLETA DE INFORMAÇÕES

Amostras de silagem, dieta base e sobras foram coletadas 2 vezes por semana e misturadas formando uma amostra de cada por semana. Amostras dos demais alimentos (concentrado comercial, milho grão moído, farelo de soja e casca de soja) e de feno, foram coletadas 1 vez por semana e foram misturadas formando 2 amostras de cada ao final de cada período experimental. Todas as amostras úmidas foram armazenadas sob congelamento a -20°C até posterior análise bromatológica.

As amostras úmidas compostas foram secas em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72 h e moídas em moinho Thomas-Willey com peneira de 1 mm. O teor de MS foi determinado por secagem a 100°C, por 24 h (SILVA; QUEIROZ, 2006); a PB determinada pelo método 936.15 (AOAC, 2007a). As cinzas foram determinadas método 942.05 (AOAC, 2007b). A determinação do EE foi feita pelo método 920.39 (AOAC, 2007c). O teor de FDN foi analisado com base no método descrito por Van Soest et al. (1991). As análises de FDA e lignina foram feitas a partir de adaptação do método 973.18 (AOAC, 2007d). Os carboidratos não fibrosos foram estimados por $CNF(MO) = 100 - (UMID + PB + EE + FDN + RM)$ ou $CNF(MS) = 100 - (PB + EE + FDN + RM)$. O Ca foi determinado por compleximetria (E. MERCK AG, s.d.) e o fósforo, pelo método de solubilidade em ácido cítrico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). Os resultados das análises bromatológicas estão descritos na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 – RESULTADOS MÉDIOS DAS ANÁLISES BROMATOLÓGICAS DOS ALIMENTOS E DA DIETA BASE, EM EXPERIMENTO COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA DIETÉTICA, SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL¹

Teores	Dieta base (%MS)	Silagem de milho (%MS)	Feno de tifton (%MS)	Farelo de soja (%MS)	Casca de soja (%MS)	Milho moído (%MS)	Conc. comerc. (%MS)
MS (MO,%)	46,9	30,3	88,7	88,9	91,1	88,4	89,1
PB	14,1	7,3	17,3	52,7	13,6	9,2	26,6
RM	6,7	3,1	9,2	6,7	4,6	1,3	8,9
EE	3,7	3,4	1,2	1,5	2,4	3,5	3,7
FDN	33,0	40,5	67,3	14,1	63,4	16,0	19,7
FDA	16,8	20,8	28,7	6,3	44,1	2,6	8,6
CNF	42,4	45,7	5,0	24,9	16,1	70,1	41,1
Lignina	1,0	1,9	2,35	-	-	-	-
Ca	0,8	0,2	0,5	0,0	0,6	0,0	1,6
P	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,6

¹MS: Matéria seca; Conc. comerc.: concentrado comercial; MO: matéria original; PB: proteína bruta; RM: resíduo mineral; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CNF: carboidratos não fibrosos; Ca: cálcio; P: fósforo.

Durante os 21 dias de cada período os animais receberam os tratamentos ininterruptamente. Cada período consistiu em 14 dias de adaptação ao tratamento seguidos de 7 dias de coleta de variáveis. Destes, 6 dias foram de mensuração da produção e coleta de amostras de leite, totalizando-se 12 ordenhas, e o sétimo, aferição do perímetro torácico (para estimativa do peso vivo) e avaliação do escore de condição corporal dos animais.

A produção de leite foi mensurada individualmente e as amostras para análise de composição do leite foram coletadas individualmente durante os seis penúltimos dias de cada período, com uso de medidor eletrônico e amostrador automático de leite, respectivamente, disponível no próprio equipamento de ordenha (HORST, s.d.). As amostras foram provenientes de duas ordenhas diárias, totalizando-se 12 amostras por vaca em cada período de coleta.

Essas amostras foram enviadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da Associação Paranaense dos Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, para análise dos teores de gordura, proteína, lactose, caseína, nitrogênio

ureico no leite (NUL), sólidos totais e contagem de células somáticas (CCS) (BENTLEY, 2007).

Posteriormente foram calculadas as produções, em kg/vaca/dia, de cada componente do leite, além de produções de leite, em kg/vaca/dia, corrigidas para energia, para 3,5% de gordura e a energia excretada no leite em Mcal/vaca/dia (BOERMANN et al., 2015), bem como o número de caseína (teor de caseína / teor de proteína total no leite). Quanto à excreção de NUL, foi mensurada também a excreção em g/vaca/dia de NUL e a excreção de NUL/produção de proteína no leite.

Nos últimos 10 dias de cada ciclo, foram fornecidos 10 g de óxido de cromo/vaca/dia, divididos em duas vezes logo após fornecimento da dieta. Amostras *spot* de fezes (50 g) foram coletadas diretamente da ampola retal nos últimos 4 dias do ciclo, em intervalos de 12 horas entre si, porém atrasando-se 3 horas a cada dia para que um período de 24 horas fosse representado, totalizando-se assim 8 amostras/vaca que foram usadas para compor uma só amostra por vaca por ciclo. Nessas amostras, foram quantificados os teores de cromo (VALADARES FILHO et al., 1985) e FDN indigestível (CASALI et al., 2009), posteriormente utilizados para estimativa de produção fecal e consumo de matéria seca, respectivamente.

Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais em quatro momentos distintos nos dois últimos dias de cada período. Cada uma das amostras foi coletada cerca de 6 horas após o fornecimento da dieta. O sangue foi coletado dos vasos coccígeos com auxílio de agulha e seringa, e acondicionados em tubos (Vacuette®) com ativador de coagulação (soro) e EDTA fluoretado (plasma). Os tubos foram centrifugados por 15 min a 3.500 rpm e o soro ou plasma retirados e acondicionados em microtubos plásticos (amostra e contra-amostra) que permaneceram congelados até posteriores análises.

As análises realizadas com as amostras de soro sanguíneo foram de proteínas séricas totais, albumina e globulinas. As amostras de plasma sanguíneo foram utilizadas para análises de glicose e ureia plasmática. O valor de nitrogênio ureico no plasma foi obtido através da multiplicação do resultado de ureia plasmática por 0,46, que é o teor (em percentagem) de nitrogênio na molécula de ureia (LIRA, 2011).

Amostras *spot* de urina foram coletadas através de estimulação vulvar nos mesmos momentos de coleta de sangue, com auxílio de frasco específico e gaze para filtragem de possíveis debris. Uma parte das amostras foi congelada imediatamente após as coletas até posteriores análises de ureia, creatinina e ácido úrico. A outra parte das amostras foi acidificada a pH < 3,0 e mantida congelada até posterior análise de alantoína urinária de acordo com metodologia colorimétrica proposta por Chen e Gomes (1992). O Índice PDC = $\{[(\text{alantoína} + \text{ácido úrico})/\text{creatinina}] \times \text{PV}^{0,75}\}$ foi calculado como descrito por Dórea et al. (2017).

As amostras de soro sanguíneo (análises de proteínas séricas totais, albumina e globulinas), as de plasma sanguíneo (análises de glicose e ureia plasmática) e as amostras de urina (análises de ureia, creatinina e ácido úrico) foram analisadas através de métodos colorimétricos com kits comerciais (Dialab®) em um analisador bioquímico automático (BS-200, Mindray®), no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do Setor de Ciências Agrárias da UFPR em Curitiba/PR.

A produção diária de urina em L/dia foi estimada com base na concentração de creatinina urinária das amostras *spot*, dividida pela excreção diária total de creatinina, a qual foi obtida através da multiplicação do peso vivo por 29,0, que é a constante de excreção de creatinina de bovinos adultos (VALADARES et al., 1999). Os valores de produção de urina em L/vaca/dia foram utilizados para calcular as excreções totais de nitrogênio urinário em g/vaca/dia e das bases de purinas bacterianas na urina (alantoína e ácido úrico) em mmol/vaca/dia.

No último dia de cada período, foram realizadas a estimativa de peso vivo, com uso de fita métrica para aferição do perímetro torácico e a avaliação do escore de condição corporal (ECC) dos animais, por dois avaliadores independentes devidamente treinados. O ECC foi avaliado de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda (WILDMAN et al., 1982), com frações de 0,25. Os valores finais foram obtidos através da média das avaliações dos dois avaliadores.

4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através de ANOVA, seguidos pelo teste de Tukey para comparação entre as médias. A análise estatística foi realizada por meio do programa computacional SAS (versão 9.0; SAS Institute Inc., EUA), com uso do procedimento MIXED, por meio do modelo abaixo, que incluiu os efeitos aleatórios de bloco e vaca dentro do bloco e os efeitos fixos de período, dieta (teor de PB e suplementação dos AA ou não) e a interação entre teor de PB e suplementação de AA, além do erro residual:

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + P_j + D_k + e_{ijk}$$

Onde:

μ = média geral;

V_i = efeito aleatório de vaca ($i = 1$ a 35);

P_j = efeito fixo de período ($j = 1$ a 4);

D_k = efeito fixo de dieta ($k =$ BPXX, BPAA, APXX e APAA);

e_{ijk} = erro residual.

Para a preparação dos dados para a análise estatística, analisou-se a normalidade da distribuição dos dados de produção de leite, pelo teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se esta variável por ser a mais relevante e, desta forma, para que os parâmetros de normalidade (assimetria e curtose) estivessem em valores aceitáveis, foram excluídas todas as informações das mensurações de produção de leite menores que 27,8 kg/vaca/dia, pois eram muito discrepantes do restante dos dados e a sua retirada permitiu que houvesse distribuição normal. Com isso, das 140 observações (35 vacas x 4 períodos), restaram 120 observações.

O efeito do quadrado foi avaliado e por não ter apresentado significância, foi retirado do modelo.

Os resultados foram agrupados em comparações entre os fatores: a) teor de PB na dieta (baixa proteína – BP vs. alta proteína – AP); e b) suplementação ou não de AA na dieta (sem AA vs. com AA). E, também, foi analisada a interação entre fatores (BPXX vs. BPAA vs. APXX vs. APAA).

Foi realizada transformação logarítmica dos dados de contagem de células somáticas, pela sua distribuição não paramétrica. As diferenças estatísticas foram aceitas com $P \leq 0,05$. Diferenças entre $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas como tendência a significância.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 EFEITOS DO TEOR DE PROTEÍNA BRUTA DA DIETA

Os efeitos do teor de PB na dieta sobre parâmetros de produção e composição do leite estão apresentados na Tabela 4.4. Não houve nenhum efeito sobre os parâmetros relacionados à produção de leite ($P > 0,10$). As dietas com maior teor de PB resultaram em maiores teores de proteína no leite (3,27 vs. 3,32%, $P < 0,01$), de caseína no leite (2,48 vs. 2,53%, $P < 0,01$) e maior número de caseína (0,75 vs. 0,76, $P < 0,01$). Também houve tendência a maior produção diária de caseína no leite do grupo AP (1,04 vs. 1,07 kg/dia, $P = 0,08$).

As dietas com maior teor de PB, por outro lado, resultaram em maior excreção de NUL (11,8 vs. 14,4 mg/dL, $P < 0,01$) e dos parâmetros estimados a partir dele, como a excreção diária de NUL (5,02 vs. 6,16 g/vaca/dia, $P < 0,01$) e a excreção de NUL por g de proteína do leite (3,62 vs. 4,36 g/kg, $P < 0,01$).

Quanto aos parâmetros sanguíneos ou plasmáticos, o fornecimento de menor teor de PB na dieta teve efeito em elevação do teor de globulinas séricas (5,04 vs. 4,76 g/dL, $P < 0,01$), o que resultou em maior teor de proteínas séricas totais (8,64 vs. 8,43 g/dL, $P = 0,02$), mesmo que a albumina sérica tenha sido inferior no grupo BP (3,60 vs. 3,67 g/dL, $P = 0,02$). O maior teor de PB dietética resultou em aumento do nitrogênio ureico plasmático (10,22 vs. 13,15 mg/dL, $P < 0,01$).

TABELA 4.4 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO.

(continua)

Variável ¹	BP	AP	EPM	P
Produção de leite (kg/vaca/dia)	42,3	42,3	0,54	0,93
Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (kg/vaca/dia)	42,1	42,2	0,54	0,87
Produção de leite corrigida para energia (kg/vaca/dia)	42,7	43,0	0,52	0,63
Excreção de energia no leite (Mcal/vaca/dia)	28,9	29,1	0,35	0,59
Teor de gordura no leite (%)	3,48	3,48	0,04	0,99
Produção de gordura no leite (kg/vaca/dia)	1,46	1,47	0,02	0,86
Teor de proteína no leite (%)	3,27	3,32	0,02	<0,01
Produção de proteína no leite (kg/vaca/dia)	1,38	1,40	0,02	0,15
Teor de caseína no leite (%)	2,48	2,53	0,02	<0,01
Produção de caseína no leite (kg/vaca/dia)	1,04	1,07	0,01	0,08
Número de caseína ²	0,75	0,76	0,01	<0,01
Teor de lactose no leite (%)	4,67	4,67	0,01	0,68
Produção de lactose no leite (kg/vaca/dia)	1,98	1,98	0,02	0,87
Teor de extrato seco total no leite (%)	12,4	12,5	0,06	0,14
Produção de extrato seco total no leite (kg/vaca/dia)	5,24	5,28	0,06	0,56
Teor de nitrogênio ureico no leite (NUL, mg/dL)	11,8	14,4	0,22	<0,01
Excreção de nitrogênio ureico no leite (g/vaca/dia)	5,02	6,16	0,13	<0,01
Excreção de NUL/produção de proteína no leite (g/kg)	3,62	4,36	0,07	<0,01
Contagem de células somáticas (células x 10 ³ /mL)	394,8	356,0	58,9	0,59

Escore de células somáticas	3,49	3,32	0,15	0,20
-----------------------------	------	------	------	------

¹BP: Baixa proteína; AP: Alta proteína; EPM: erro padrão da média.

²Número de caseína: teor de caseína / teor de proteína bruta do leite.

Na análise de amostras de urina (Tabela 4.5), o aumento da PB da dieta resultou em redução do teor de creatinina urinária (61,2 vs. 53,9 mg/dL, $P < 0,01$).

O maior teor de PB dietética fez com as vacas apresentassem maior teor de ureia urinária (848,3 vs. 1.026,0 mg/dL, $P < 0,01$), maior produção de urina (36,8 vs. 40,9 L/dia, $P < 0,01$), maior excreção de ácido úrico (55,0 vs. 63,1 mmol/vaca/dia, $P < 0,01$), maior proporção de excreção de ácido úrico em relação ao total de derivados de purina (0,13 x 0,15, $P < 0,01$).

E houve tendência a maior valor de ECC (2,95 vs. 3,04, $P = 0,06$) para as vacas alimentadas com maior PB na dieta.

Não houve efeito do tratamento sobre os demais parâmetros avaliados ($P > 0,10$).

TABELA 4.5 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E ZOOTÉCNICOS DE VACAS EM LACTAÇÃO.

Variável ¹	BP	AP	EPM	P
Proteínas séricas totais (g/dL)	8,64	8,43	0,07	0,02
Albumina sérica (g/dL)	3,60	3,67	0,02	0,02
Globulinas séricas (g/dL)	5,04	4,76	0,08	<0,01
Nitrogênio ureico plasmático (mg/dL)	10,22	13,15	0,20	<0,01
Ureia plasmática (mg/dL)	22,21	28,58	0,44	<0,01
Glicose plasmática (mg/dL)	66,33	66,78	0,36	0,27
Teor de creatinina urinária (mg/dL)	61,2	53,9	1,31	<0,01
Excreção de creatinina (mmol/vaca/dia)	184,6	185,7	1,20	0,16
Teor de ureia urinária (mg/dL)	848,3	1026,0	25,3	<0,01
Teor de nitrogênio ureico urinário (mg/dL)	390,2	472,0	11,6	<0,01
Teor de ácido úrico urinário (mg/dL)	26,4	26,4	0,64	0,98
Produção de urina (L/vaca/dia)	36,8	40,9	0,98	<0,01
Excreção de ácido úrico (mmol/vaca/dia)	55,0	63,1	1,55	<0,01
Excreção de alantoína (mmol/vaca/dia)	359,8	372,8	8,73	0,32
Relação excreção diária de alantoína/creatinina	1,96	2,02	0,05	0,41
Excreção de derivados de purinas (DP, mmol/vaca/dia)	415,0	436,4	9,33	0,12
Proporção excreção de alantoína/DP	0,86	0,85	0,01	0,04
Proporção excreção de ácido úrico/DP	0,13	0,15	0,01	0,04
Índice PDC ²	312,8	328,5	7,05	0,13

(continua)

Relação excreção de purina/excreção de creatinina	2,26	2,36	0,05	0,17
Peso vivo (kg/vaca)	720,0	724,6	4,71	0,16
Escore de condição corporal	2,95	3,04	0,05	0,06
Ingestão de matéria seca (IMS – FDNi, kg/vaca/dia)	29,62	28,35	0,86	0,36
IMS (alantoína, g/kg PV ^{0,75})	156,5	166,0	4,60	0,15

¹BP: Baixa proteína; AP: Alta proteína; EPM: erro padrão da média.

²Índice PDC = $\{[(\text{alantoína} + \text{ácido úrico})/\text{creatinina}] \times \text{PV}^{0,75}\}$, IMS – FDNi: ingestão de matéria seca estimada pela fibra em detergente neutro indigestível.

4.3.2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO OU NÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL

A suplementação de Lys e Met protegidos da degradação ruminal, quanto aos parâmetros de produção de leite e composição do leite, apresentados na Tabela 4.6, resultou apenas em tendência a menor teor de lactose no leite (4,68 vs. 4,67%, $P=0,08$), quando comparada com a não suplementação. Não houve efeito da suplementação de AA na dieta para os demais parâmetros avaliados ($P>0,10$).

A suplementação de AA na dieta de vacas em lactação reduziu os teores de globulinas séricas (5,02 vs. 4,78 g/dL, $P=0,02$), também as proteínas séricas totais (8,67 vs. 8,41 g/dL, $P<0,01$) e a glicose plasmática (67,11 vs. 66,00 mg/dL, $P<0,01$), comparada à não suplementação (Tabela 4.7).

Analisando-se os parâmetros urinários, o fornecimento de AA resultou em aumento dos teores de nitrogênio ureico (413,6 vs. 448,6 mg/dL, $P=0,02$), ácido úrico (53,3 vs. 64,8 mg/dL, $P<0,01$) e proporção de ácido úrico em relação ao total de derivados de purina (0,13 vs. 0,15, $P<0,01$).

TABELA 4.6 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO.

(continua)

Variável	XX	AA	EPM	P
Produção de leite (kg/vaca/dia)	42,1	42,5	0,54	0,50
Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (kg/vaca/dia)	42,0	42,3	0,54	0,65
Produção de leite corrigida para energia (kg/vaca/dia)	42,7	43,0	0,52	0,65
Excreção de energia no leite (Mcal/vaca/dia)	29,0	29,1	0,35	0,74
Teor de gordura no leite (%)	3,48	3,47	0,04	0,63
Produção de gordura no leite (kg/vaca/dia)	1,46	1,47	0,02	0,76
Teor de proteína no leite (%)	3,30	3,29	0,02	0,67
Produção de proteína no leite (kg/vaca/dia)	1,39	1,39	0,02	0,70
Teor de caseína no leite (%)	2,50	2,50	0,02	0,94
Produção de caseína no leite (kg/vaca/dia)	1,05	1,06	0,01	0,65
Número de caseína ²	0,75	0,76	0,01	0,25
Teor de lactose no leite (%)	4,68	4,67	0,01	0,08
Teor de extrato seco total no leite (%)	1,97	1,98	0,02	0,78
Produção de extrato seco total no leite (kg/vaca/dia)	12,5	12,4	0,06	0,16
Produção de extrato seco total no leite (kg/vaca/dia)	5,26	5,27	0,06	0,80
Teor de nitrogênio ureico no leite (NUL, mg/dL)	13,1	13,1	0,22	0,68
Excreção de nitrogênio ureico no leite (g/vaca/dia)	5,60	5,57	0,13	0,80
Excreção de NUL/produção de proteína no leite (g/kg)	3,99	3,99	0,07	0,86
Contagem de células somáticas (células x 10 ³ /mL)	370,3	380,5	58,9	0,89

Escore de células somáticas	3,38	3,43	0,15	0,70
-----------------------------	------	------	------	------

¹XX: Sem inclusão de aminoácidos; AA: com inclusão de aminoácidos; EPM: erro padrão da média.

²Número de caseína: teor de caseína / teor de proteína bruta do leite.

TABELA 4.7 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E ZOOTÉCNICOS DE VACAS EM LACTAÇÃO.

Variável	XX	AA	EPM	P
Proteínas séricas totais (g/dL)	8,67	8,41	0,07	<0,01
Albumina sérica (g/dL)	3,65	3,63	0,02	0,44
Globulinas séricas (g/dL)	5,02	4,78	0,08	0,02
Nitrogênio ureico plasmático (mg/dL)	11,63	11,73	0,20	0,61
Ureia plasmática (mg/dL)	25,29	25,50	0,44	0,61
Glicose plasmática (mg/dL)	67,11	66,00	0,36	<0,01
Teor de creatinina urinária (mg/dL)	56,9	58,1	1,31	0,42
Excreção de creatinina (mmol/vaca/dia)	185,8	184,6	1,20	0,15
Teor de ureia urinária (mg/dL)	899,1	975,2	25,3	0,02
Teor de nitrogênio ureico urinário (mg/dL)	413,6	448,6	11,6	0,02
Teor de ácido úrico urinário (mg/dL)	23,5	29,3	0,64	<0,01
Produção de urina (L/vaca/dia)	39,4	38,3	0,98	0,40
Excreção de ácido úrico (mmol/vaca/dia)	53,3	64,8	1,55	<0,01
Excreção de alantoína (mmol/vaca/dia)	365,7	366,9	8,73	0,93
Relação excreção diária de alantoína/creatinina	1,98	2,00	0,05	0,70
Excreção de derivados de purinas (DP, mmol/vaca/dia)	419,5	432,0	9,33	0,37
Proporção excreção de alantoína/DP	0,87	0,84	0,01	<0,01
Proporção excreção de ácido úrico/DP	0,13	0,15	0,01	<0,01
Índice PDC ²	315,6	325,8	7,05	0,33
Relação excreção de purina/excreção de creatinina	2,27	2,36	0,05	0,24

(continua)

Peso vivo (kg/vaca)	724,7	719,9	4,71	0,15
Escore de condição corporal	3,00	2,99	0,05	0,79
Ingestão de matéria seca (IMS – FDNi, kg/vaca/dia)	28,0	30,0	0,86	0,14
IMS (alantoína, g/kg PV ^{0,75})	157,4	165,0	4,60	0,26

¹XX: Sem inclusão de aminoácidos; AA: com inclusão de aminoácidos; EPM: erro padrão da média.

²Índice PDC = $\{[(\text{alantoína} + \text{ácido úrico})/\text{creatinina}] \times \text{PV}^{0,75}\}$, IMS – FDNi: ingestão de matéria seca estimada pela fibra em detergente neutro indigestível.

4.3.3 EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE O TEOR DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA E FORNECIMENTO OU NÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS RUMINALMENTE

A interação entre o teor de PB da dieta com a suplementação ou não de AA resultou, quanto à produção e composição do leite, apenas em tendência a redução do ECS (3,35 vs. 3,64 vs. 3,42 vs. 3,23, respectivamente para os grupos BP sem adição de AA, BP com AA, AP sem adição de AA e AP com adição de AA, $P=0,07$), conforme apresentado na Tabela 4.8.

TABELA 4.8 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DOIS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA, SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO.

Variável	BPXX	BPAA	APXX	APAA	EPM	P
Produção de leite (kg/vaca/dia)	41,9	42,6	42,3	42,3	0,54	0,50
Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (kg/vaca/dia)	41,9	42,2	42,1	42,3	0,54	0,91
Produção de leite corrigida para energia (kg/vaca/dia)	42,5	42,9	42,9	43,0	0,52	0,77
Excreção de energia no leite (Mcal/vaca/dia)	28,9	29,0	29,1	29,2	0,35	0,86
Teor de gordura no leite (%)	3,50	3,45	3,47	3,48	0,04	0,33
Produção de gordura no leite (kg/vaca/dia)	1,46	1,46	1,46	1,47	0,02	0,78
Teor de proteína no leite (%)	3,27	3,27	3,33	3,31	0,02	0,60
Produção de proteína no leite (kg/vaca/dia)	1,37	1,39	1,41	1,40	0,02	0,39
Teor de caseína no leite (%)	2,47	2,48	2,53	2,52	0,02	0,63
Produção de caseína no leite (kg/vaca/dia)	1,03	1,05	1,07	1,06	0,01	0,42
Número de caseína ²	0,75	0,75	0,76	0,76	0,01	0,91
Teor de lactose no leite (%)	4,69	4,65	4,67	4,67	0,01	0,16
Produção de lactose no leite (kg/vaca/dia)	1,97	1,98	1,98	1,98	0,02	0,77
Teor de extrato seco total no leite (%)	12,48	12,37	12,50	12,50	0,06	0,24
Produção de extrato seco total no leite (kg/vaca/dia)	5,23	5,26	5,29	5,29	0,06	0,79
Teor de nitrogênio ureico no leite (NUL, mg/dL)	11,85	11,80	14,50	14,40	0,23	0,86
Excreção de nitrogênio ureico no leite (g/vaca/dia)	5,01	5,03	6,21	6,13	0,13	0,60
Excreção de NUL/produção de proteína no leite (g/kg)	3,63	3,62	4,37	4,36	0,07	0,99
Contagem de células somáticas (células x 10 ³ /mL)	381,90	407,65	358,72	353,36	58,94	0,83

(continua)

Score de células somáticas (ECS)	3,35	3,64	3,42	3,23	0,15	0,07
----------------------------------	------	------	------	------	------	------

¹BPXX: Baixa proteína sem inclusão de aminoácidos; BPAA: Baixa proteína com inclusão de aminoácidos; APXX: Alta proteína sem inclusão de aminoácidos; APAA: Alta proteína com inclusão de aminoácidos; EPM: erro padrão da média.

²Número de caseína: teor de caseína / teor de proteína bruta do leite.

Quanto aos parâmetros sanguíneos e urinários (Tabela 4.9), houve tendência sobre o teor de creatinina urinária (59,12 vs. 63,25 vs. 54,65 vs. 53,12 mg/dL, respectivamente para os grupos BP sem adição de AA, BP com AA, AP sem adição de AA e AP com adição de AA, $P=0,08$). Já para produção de urina, houve efeito significativo e o menor volume observado foi para o grupo BPAA (38,97 vs. 34,63 vs. 39,89 vs. 41,99 L/vaca/dia, respectivamente para os grupos BP sem adição de AA, BP com AA, AP sem adição de AA e AP com adição de AA, $P=0,01$).

A IMS, estimada pelo FDNI, apresentou tendência a significância (29,7 vs. 29,5 vs. 26,2 vs. 30,5 kg/vaca/dia, respectivamente para os grupos BP sem adição de AA, BP com AA, AP sem adição de AA e AP com adição de AA, $P=0,10$).

TABELA 4.9 – EFEITO DO FORNECIMENTO DE DIETAS COM DOIS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA, SEM E COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E ZOOTÉCNICOS DE VACAS EM LACTAÇÃO.

(continua)

Variável	BPXX	BPAA	APXX	APAA	EPM	P
Proteínas séricas totais (mg/dL)	8,80	8,48	8,53	8,33	0,07	0,47
Albumina sérica (mg/dL)	3,61	3,60	3,70	3,65	0,02	0,55
Globulinas séricas (mg/dL)	5,20	4,89	4,84	4,68	0,08	0,40
Nitrogênio ureico plasmático (mg/dL)	10,06	10,37	13,20	13,09	0,20	0,28
Ureia plasmática (mg/dL)	21,88	22,53	28,70	28,46	0,44	0,28
Glicose plasmática (mg/dL)	67,16	65,50	67,06	66,49	0,36	0,17
Teor de creatinina urinária (mg/dL)	59,12	63,25	54,65	53,12	1,31	0,08
Excreção de creatinina (mmol/vaca/dia)	184,60	184,64	187,03	184,50	1,21	0,12
Teor de ureia urinária (mg/dL)	786,40	910,32	1012,00	1040,22	25,33	0,16
Teor de nitrogênio ureico urinário (mg/dL)	361,75	418,75	465,50	478,50	11,65	0,16
Teor de ácido úrico urinário (mg/dL)	23,00	29,90	24,10	28,80	0,64	0,30
Produção de urina (L/vaca/dia)	38,97 ^a	34,63 ^b	39,89 ^a	41,99 ^a	0,98	0,01
Excreção de ácido úrico (mmol/vaca/dia)	49,40	60,70	57,21	69,02	1,55	0,91
Excreção de alantoína (mmol/vaca/dia)	360,50	359,14	371,00	374,70	8,73	0,85
Relação excreção diária de alantoína/creatinina	1,96	1,96	2,00	2,05	0,05	0,67
Excreção de derivados de purinas (DP, mmol/vaca/dia)	410,01	420,05	429,00	443,92	9,33	0,86
Proporção excreção de alantoína/DP	0,88	0,85	0,86	0,84	0,01	0,66
Proporção excreção de ácido úrico/DP	0,12	0,15	0,14	0,16	0,01	0,66
Índice PDC	309,04	316,70	322,20	334,91	7,05	0,80

Relação excreção de purina/excreção de creatinina	2,23	2,29	2,30	2,42	0,05	0,66
Peso vivo (kg/vaca)	719,93	720,22	729,54	719,63	4,71	0,12
Escore de condição corporal	2,95	2,96	3,06	3,03	0,06	0,74
Ingestão de matéria seca (IMS – FDNi, kg/vaca/dia)	29,7	29,5	26,2	30,5	0,86	0,10
IMS (alantoína, g/kg PV ^{0,75})	153,99	158,97	160,92	170,87	4,60	0,71

¹BPXX: Baixa proteína sem inclusão de aminoácidos; BPAA: Baixa proteína com inclusão de aminoácidos; APXX: Alta proteína sem inclusão de aminoácidos; APAA: Alta proteína com inclusão de aminoácidos; EPM: erro padrão da média.

²Índice PDC = $\{[(\text{alantoína} + \text{ácido úrico})/\text{creatinina}] \times \text{PV}^{0,75}\}$; IMS – FDNi: ingestão de matéria seca estimada pela fibra em detergente neutro indigestível.

4.4 DISCUSSÃO

Não se observou efeito de nenhum dos tratamentos testados sobre variáveis zootécnicas relacionadas à produção de leite, como a própria produção de leite e as produções de leite corrigidas para 3,5% de gordura e para energia, tanto para o teor da PB, quanto para a suplementação ou não de AA ($P > 0,10$). Portanto, o uso de menor teor de PB na dieta não limitou a produção de leite no presente experimento.

A média inicial de $155,8 \pm 66$ dias em lactação demonstra que havia animais com DEL avançado e que isso pode ter contribuído para a ausência de resposta em produção de leite, ao maior teor de PB na dieta e à suplementação de AA.

Zanton (2016) comparou, em uma meta-análise, o efeito do delineamento experimental sobre algumas variáveis em experimentos mensurando teores de PB na dieta. Na média, vacas em experimentos com delineamento contínuo tiveram DEL inicial menor, estiveram em tratamento por mais tempo e produziram maior quantidade de leite e de proteína no leite do que vacas em delineamentos com mudanças de grupos. As respostas ao aumento da PB na dieta, na meta-análise, foram: aumento da ingestão de MS, aumento da produção de leite, aumento da produção de componentes, maior eficiência alimentar e maior eficiência de utilização de nitrogênio. Segundo o autor, a interação entre a PB da dieta e os efeitos de delineamento não mostraram significância para produção de proteína e de gordura. Portanto, deve-se avaliar as características dos animais para realização de experimento em quadrado latino para estudos de metabolismo proteico, especialmente quanto aos dias em lactação e sua homogeneidade no rebanho.

Bahrami-Yekdangi et al. (2014) observaram que a redução do teor de PB na dieta não limitou a produção de leite, gordura e proteína, comparando-se o controle (18% PB) com teores decrescentes de PB, até 15,6%, assim como observado neste trabalho. Frank e Swesson (2002) relataram que houve diferença na produção de leite, ao comparar tratamentos com 13,1 e 17,0% PB. Proteína dietética abaixo de 15% deprimiu a produção de leite, porém não houve benefício para teores acima de 17% (GROFF; WU, 2005). Desta forma, os teores de PB dietética praticados neste estudo estavam próximos aos valores descritos pela literatura como não impactantes em produção de leite, mas próximos aos encontrados comumente em rebanhos comerciais.

A resposta observada em aumento dos teores de proteína ($P < 0,01$) e de caseína no leite ($P < 0,01$) para o grupo com maior teor de PB pode indicar que o balanço de PM de fato estava deficiente nas dietas de menor teor proteico. Kalscheur et al. (2006) avaliaram dietas com PDR abaixo dos teores recomendados pelo NRC (2001) e observaram redução da produção de leite, gordura e proteína no leite, indicativos de PDR insuficiente para o crescimento microbiano, o que pode ter ocorrido no presente trabalho, na dieta com menor PB. Os autores afirmaram ainda que, conforme o teor de PDR aumentou, as concentrações de NUL aumentaram linearmente e a eficiência de conversão de N dietético em N do leite reduziu-se.

No presente experimento demonstrou-se que parte do N fornecido nas dietas de maior teor proteico foi excretado pelas vacas, visto que o NUL, tanto em mg/dL (11,8 vs. 14,4 mg/dL, $P<0,01$), como excreção diária – em g/vaca/dia (5,02 vs. 6,16 g/vaca/dia, $P<0,01$) e também em função da proteína no leite (3,62 vs. 4,36 g/kg, $P<0,01$), aumentou. Na formulação das dietas, objetivou-se manter os teores de amido semelhantes entre os tratamentos e, deste modo, pode ter havido excesso de N amoniacal ou insuficiência de cadeias de carbono para a síntese de proteína microbiana, o que resultou na excreção deste excesso de N.

Barros et al. (2017) avaliaram o efeito de reduções drásticas da PB para vacas em final de lactação, variando de 16,2 até 11,8% PB. Nestas condições, observaram reduções lineares da ingestão de MS, do teor de NUL e da excreção de NUL diário. Respostas lineares e quadráticas foram observadas para produção de leite, produção de leite corrigida para gordura e proteína e para produção de leite corrigida para energia. Como os teores praticados no presente experimento foram mais moderados, não se observaram efeitos tão drásticos.

Para as dietas com maior teor de PB, foi observado aumento no teor de N ureico plasmático (10,22 vs. 13,16 mg/dL, $P<0,01$) e N ureico urinário ($P<0,01$), entre outros parâmetros semelhantes analisados. Os níveis de uréia plasmática são afetados pelo nível nutricional, sendo a uréia um indicador sensível e imediato da ingestão de proteínas, como ocorreu na dieta de alta PB. Ao contrário, a albumina plasmática é um indicador em longo prazo do status protéico (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2003) e o resultado obtido foi de maior concentração para o grupo da dieta de maior proteína ($P=0,02$). Portanto, provavelmente houve excesso de N-amoniacal no rúmen neste grupo, que foi direcionado ao fígado, convertido em ureia, lançado na corrente sanguínea e, em seguida, excretado, tanto via urina, quanto via leite. Este resultado contraria o observado por Bahrami-Yekdangi et al. (2014), que não detectaram nenhuma alteração nos teores plasmáticos ao variarem os teores de PB na dieta. Já Hynes et al. (2016) observaram $r = 0,79$ para a relação entre o NUL (mg/dia) e excreção de N urinário. Este aumento da excreção de N via urinária pode ter contribuído para o aumento da produção de urina (36,8 vs. 40,9 L/vaca/dia, $P<0,01$), observado na dieta de alta proteína no presente experimento.

A excreção de derivados de purina (DP) pode ser usada como indicador da quantidade de proteína microbiana produzida no rúmen. DP são os produtos da degradação de ácidos nucleicos e, como a grande maioria dos ácidos nucleicos que alcançam o intestino de um ruminante origina-se de microrganismos ruminais, há uma relação segura entre a quantidade de purinas e o fluxo microbiano do rúmen (CHEN; GOMES, 1992). O maior valor observado para excreção de ácido úrico (55,0 vs. 63,1 mmol/vaca/dia, $P < 0,01$) para o grupo AP indica que pode ter havido maior produção de proteína microbiana neste tratamento. Isso seria coerente com a observação do maior teor de proteína no leite para este grupo.

O índice PDC é uma alternativa para se estimar a produção diária de DP, que ajusta para o volume diário de produção de urina e para as diferenças de tamanho do animal, ao considerar o $PV^{0,75}$, visto que a creatinina tem sido estimada como uma função constante da massa corporal metabólica e, portanto, pode ser usada como um marcador para volume urinário. Portanto, neste trabalho, o índice PDC mostra que os valores aqui observados estão próximos aos descritos por Dórea et al. (2017), ainda que não tenha havido diferença entre os fatores avaliados ($P > 0,10$).

Observou-se tendência em melhor ECC nas vacas com maior PB dietética ($P = 0,06$), ao oposto de Bahrami-Yekdangi et al. (2014), que não observaram qualquer efeito do teor de PB sobre ECC ou mesmo sobre o peso vivo dos animais. Esta tendência poderia ser entendida como um possível maior aporte de energia nas dietas de AP, pela desaminação de AA e sua utilização como fonte de energia, via gliconeogênese, que poderia contribuir para o melhor balanço energético e, conseqüentemente, maior ECC.

Quanto à suplementação de AA protegidos da degradação ruminal, não houve efeito sobre a produção e composição do leite ($P > 0,10$), exceto pela tendência à redução da lactose no grupo suplementado ($P = 0,08$). Lean et al. (2018) não observaram efeito da Lys sobre a produção de leite, em meta-análise sobre o desempenho da suplementação de AA, mas encontraram associação com His, Leu, triptofano (Trp), treonina (Thr) e AANE. Estes autores citaram que a não resposta à suplementação de um AA pode ocorrer pela necessidade de outro, limitante, que não tenha sido devidamente identificado e, portanto, comprometeu a resposta em produção de leite ou de seus componentes. Patton (2010) não observou efeito do teor

de PB da dieta sobre a produção de proteína verdadeira no leite, em uma metanálise para avaliar dois produtos comerciais à base de MPR, assim como o observado neste trabalho. Giallongo et al. (2016) não observaram efeito da suplementação de diferentes AA, com variações na quantidade de PM, sobre o teor ou produção de lactose.

Houve efeito da suplementação de AA sobre a glicemia plasmática, com maior valor para o grupo não suplementado (67,11 vs. 66,00 mg/dL, $P<0,01$). Giallongo et al. (2016), ao avaliar o efeito da suplementação de Lys, Met e His, em dietas deficientes ou não em PM, observaram maiores concentrações de glicose plasmática quando da suplementação de Lys, em dietas intencionalmente deficientes em PM. Uma possível explicação para o resultado observado no presente estudo seria o maior gasto energético para excreção de N no grupo suplementado, visto que o valor de N ureico urinário também estava aumentado (respectivamente para os grupos não suplementado e suplementado 413,6 vs 448,6 mg/dL, $P=0,02$).

Lee et al. (2015) observaram maiores teores de N ureico urinário em dieta com adequada PM, quando comparada com dietas deficientes em PM, mas suplementadas com Lys, Met e uma combinação de ambos os AA. Assim, os resultados observados neste trabalho sugerem que ao menos parte dos AA fornecidos foram absorvidos, metabolizados no fígado e sua fração nitrogenada convertida em ureia, para excreção subsequente.

Como os teores de ácido úrico urinário (23,5 vs. 29,3 mg/dL, $P<0,01$), de excreção de ácido úrico (53,3 vs. 64,8 mmol/vaca/dia, $P<0,01$) e proporção de ácido úrico em relação aos DP estavam aumentados no grupo suplementado (0,13 vs. 0,15, $P<0,01$). Lee et al. (2015) não encontraram efeito do fornecimento de dieta adequada em PM vs. dieta deficiente em PM, associada com a suplementação com Lys, Met e uma combinação de ambos os AA sobre a concentração de ácido úrico na urina. Porém, observaram maiores concentrações de alantoína urinária no grupo com dieta de adequada PM e no de dieta deficiente em PM, mas suplementada com Lys. Neste presente trabalho, não houve efeito da suplementação de AA sobre a concentração de alantoína urinária ($P>0,10$).

4.5 CONCLUSÕES

Não houve efeito do teor de PB dietética sobre a produção de leite e produção de seus componentes. Portanto, nas condições do experimento, a utilização do menor teor de PB e sem suplementação de Lys e Met foi mais apropriada. O elevado dias médios em lactação das vacas do experimento pode ter contribuído para a ausência de resposta em produção, em razão do menor aparato hormonal para tanto.

O maior teor de PB dietética resultou em aumento teores de proteína e caseína no leite, mas também resultou em aumento do catabolismo de nitrogênio ruminal, com consequente aumento da excreção de N ureico no leite e na urina e esta maior excreção de N resultou em aumento da produção de urina. Conclui-se que o aumento do teor de PB na dieta resultou em maior excreção de N. Houve indicação de maior fluxo microbiano nas dietas com maior teor de PB, pelo aumento da excreção de ácido úrico.

A suplementação de lisina e metionina protegidas da degradação ruminal e sua interação com o teor de PB da dieta não resultaram em aumento da produção de leite, nas condições deste experimento. Houve aumento da excreção de N urinário e de ácido úrico com o fornecimento dos AA.

Novos estudos são necessários para se entender melhor o efeito da suplementação de AA protegidos para vacas em lactação, especialmente na variação de proteína bruta dietética avaliada no presente trabalho.

4.6 REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007a, method 936.15 (4.1.06)

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007b, method 942.05 – Ash of animal feed (4.1.10)

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007c, method 920.39 – Fat (crude) or ether extract in animal feed (4.5.01)

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007d, method 973.18 – Fiber (acid detergent) and lignin (K₂SO₄) in animal feed (4.6.03)

BAHRAMI-YEKDANGI, H.; KHORVASH, M.; GHORBANI, G. R.; ALIKHANI, M.; JAHANIAN, R.; KAMALIAN, E. Effects of decreasing metabolizable protein and rumen-undegradable protein on milk production and composition and blood metabolites of Holstein dairy cows in early lactation. **J. Dairy Sci.**, v.97, n.6, p.3707-3714, 2014.

BARROS, T.; QUAASSDORFF, M. A.; AGUERRE, M. J.; COLMENERO, J. J. O.; BERTICS, S. J.; CRUMP, P. M.; WATTIAUX, M. A. Effects of dietary crude protein concentration on late-lactation dairy cow performance and indicators of nitrogen utilization. **J. Dairy Sci.**, v.100, n.7, p.5434–5448, 2017.

BENTLEY Instruments, Inc. **Bentley Sistema Combinado 2300. Operator's manual**. Chaska: Bentley, 2007. 115p.

BOERMAN, J. P.; POTTS, S. B.; VANDEHAAR, M. J.; LOCK, A. L. Effects of partly replacing dietary starch with fiber and fat on milk production and energy partitioning. **J. Dairy Sci.**, v. 98, p. 7264-7276, 2015.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; CUNHA, M.; DETMANN, K.S.C.; PAULINO, M.F. Estimacão de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **R. Bras. Zootec.**, v. 38, n. 1, p. 130-138, 2009.

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**. Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992, 22p.

DÓREA, J. R. R.; DANÉS, M. A. C.; ZANTON, G. I.; ARMENTANO, L. E. Urinary purine derivatives as a tool to estimate dry matter intake in cattle: A meta-analysis. **J. Dairy Sci.**, v.100., p. 8977–8994, 2017.

E. MERCK AG. **Métodos complexiometricos de valorización com Titriplex**. 3 ed. Ed. Darmstadt. Alemanha, p. 25. s.d.

FRANK, B.; SWENSSON, C. Relationship Between Content of Crude Protein in Rations for Dairy Cows and Milk Yield, Concentration of Urea in Milk and Ammonia Emissions. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.7, p. 1829-1838, 2002.

GIALLONGO, F.; HARPER, M.T.; OH, J.; LOPES, J.C.; LAPIERRE, H.; PATTON, R.A.; PARYS, C.; SHINZATO, I; HRISTOV, A.N. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.6, p. 4437–4452, 2016.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. (Eds): **Anais do primeiro Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.73-89, 2003.

GROFF, E. B.; WU, Z. Milk production and nitrogen excretion of dairy cows fed different amounts of protein and varying of alfalfa and corn silage. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 3619–3632, 2005.

HORST, J.A. Manual de operações de campo. Curitiba: APCBRH, versão 8.0, s.d.

HYNES, D. N.; STERGIADIS, S.; GORDON, A.; YAN, T. Effects of crude protein level in concentrate supplements on animal performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows fed fresh-cut perennial grass. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.10, p. 8111–8120, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 2005, p. 748.

KALSCHEUR, K. F.; BALDWIN VI, R. L.; GLENN, B. P.; KOHN, R. A. Milk Production of Dairy Cows Fed Differing Concentrations of Rumen-Degraded Protein. **J. Dairy Sci.**, v.89, p. 249–259, 2006.

LEAN, I.J.; DE ONDARZA, M.B.; SNIFFEN, C.J.; SANTOS, J.E.P.; GRISWOLD, K.E. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. **J. Dairy Sci.**, v.101, p. 340-364, 2018.

LEE, C.; GIALLONGO, F.; HRISTOV, A.N.; LAPIERRE, H.; CASSIDY, T.W.; HEYLER, K.S.; VARGA, G.A.; PARYS, C. Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.98, n.3, p. 1885–1902, 2015.

LEONARDI, C.; STEVENSON, M.; ARMENTANO, L.E. Effect of Two Levels of Crude Protein and Methionine Supplementation on Performance of Dairy Cows. **J. Dairy Sci.**, v.86, p. 4033-4042, 2003.

LIRA, F.R.A. **Determinação da concentração de nitrogênio uréico no plasma como ferramenta auxiliar no manejo sustentável em rebanhos leiteiros sergipanos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. p.28, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy cattle**. Washington, DC: Natl. Acad. Sci., 7 ed., 2001.

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. **J. Dairy Sci.**, v.93, n. 5, p. 2105-2118, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide: Statistics**. Cary, NC: SAS Inst. Inc., 8 v., 2000.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos – **Métodos químicos e biológicos**. 3 ed., Viçosa: Ed. UFV., 2006, p.23-29.

VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C.; CLAYTON, M.K. Effect of replacing Alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **J. Dairy Sci.**, v.82, p. 2686–2696, 1999.

VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. et al. Óxido crômico e lignina na determinação dos fluxos de matéria seca em bovinos e bubalinos. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.14, n.5, p.565-574, 1985.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3583-3597, 1991.

VYAS, D.; ERDMAN, R.A. Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and methionine supplementation. **J. Dairy Sci.**, v.92, p. 5011–5018, 2009.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. **J. Dairy Sci.**, v.65, p. 495-501, 1982.

YOUSEF, M.K. In: **Basic principles. Stress physiology in livestock.**, v.1 Boca Raton: CRC Pres, 1985.

ZANTON, G.I. Analysis of production responses to changing crude protein levels in lactating dairy cow diets when evaluated in continuous or change-over experimental designs. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.6, p. 4398-4410, 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A questão central do trabalho é a melhora da eficiência do uso de N, ainda que isso não tenha sido mensurado diretamente. No primeiro experimento, atendeu-se às exigências de PM que eram o objetivo para aquele teor de produção, mas o aumento da concentração de Lys e Met como porcentagem da PM não resultou em aumento de produção ou composição do leite. Houve redução da digestão da dieta no trato total, redução da ingestão de MS e da síntese de proteína microbiana. A menor digestibilidade da FDN e menor ingestão de MS sugerem um efeito negativo dos suplementos de AA na função ruminal, possivelmente mediada por mecanismos diretos dos aminoácidos sobre a produção de proteína microbiana.

A redução do fornecimento de AA microbiano ao intestino delgado pode ter encoberto um possível efeito positivo da suplementação de AA sobre o desempenho da lactação. Manter a síntese microbiana ruminal parece ser essencial para a detecção de um efeito positivo de suplementos de AA protegidos da degradação ruminal, especialmente em dietas que dependem de uma grande proporção de AA microbianos para o fornecimento de AA metabolizáveis. Neste caso, a redução da síntese de proteína microbiana pode ter induzido a uma deficiência de AA de cadeia ramificada no plasma, tornando-os mais limitantes à síntese de proteína pela glândula mamária do que a Lys e a Met.

No segundo experimento, idealizado a partir do resultado do primeiro, objetivou-se variar a PB da dieta, buscando-se possível efeito da interação entre PB dietética e suplementação de AA protegidos da degradação ruminal. Não houve efeito do teor de PB dietética, da suplementação de AA protegidos da degradação ruminal e tampouco da interação entre ambos sobre a produção de leite.

O aumento do teor de PB da dieta resultou em aumento da excreção de N pelos animais via leite e via urina, sem benefícios à produção de leite ou à produção de componentes do leite, embora tenha havido resposta em teor de proteína total do leite e no teor de caseína.

A suplementação de uma proporção fixa de AA na PM também não resultou em resposta na produção de leite ou em componentes do leite. Pode ter havido um

efeito negativo do DEL médio elevado dos animais ou talvez da existência de outros AA limitantes.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para maior segurança de eventuais experimentos futuros neste tema, sugere-se melhorar os mecanismos de mensuração ou estimativa da ingestão de matéria seca e os possíveis impactos dos tratamentos experimentais sobre esta variável.

Também se torna imprescindível a mensuração precisa da eficiência de utilização de N pelos animais, incluindo-se as mensurações de excreção fecal. Sugere-se, ainda, a avaliação do possível efeito da suplementação de outros aminoácidos, especialmente no terço inicial de lactação.

5.2 AGRADECIMENTOS

Em especial atenção, agradece-se ao apoio da Kemin Animal Nutrition and Health Division, imprescindível para a realização do experimento, com todo o empenho e suporte à equipe executora do projeto.

Agradecimento à Pontifícia Universidade Católica do Paraná, especificamente ao Setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental Gralha Azul, pela cessão das instalações, estrutura, pessoal, animais e insumos para a realização do experimento.

REFERÊNCIAS

ALEGRANSI, L.; SOUZA, V.L.; DOSKA, M.C.; ZANETTI, G.F.; RIBAS, E.M.; OSTRENSKY, A.; ALMEIDA, R. Effects of methionine analog supplementation on milk yield and composition of primiparous dairy cows in a Brazilian dairy herd. **J. Dairy Sci.**, v. 94, E-Suppl. 1, p. 124, 2011.

ALMEIDA, R.; OLSEN, A.P.; BIER, L.P.P.; SOUZA, V.L.; NAVARRO, R.B.; OSTRENSKY, A. Efeitos da suplementação de metionina análoga sobre a produção e composição do leite de vacas leiteiras de alta produção. 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** Salvador, BA, 27 a 30 de julho de 2010, 3p.

ARRIOLA APELO, S.I.; KNAPP, J.R.; HANIGAN, M.D. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. **J. Dairy Sci.** v.97, p. 4000–4017, 2014.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007a, method 936.15 (4.1.06)

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007b, method 942.05 – Ash of animal feed (4.1.10)

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007c, method 920.39 – Fat (crude) or ether extract in animal feed (4.5.01)

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18 ed., 2007d, method 973.18 – Fiber (acid detergent) and lignin (K_2SO_4) in animal feed (4.6.03)

BAHRAMI-YEKDANGI, H.; KHORVASH, M.; GHORBANI, G. R.; ALIKHANI, M.; JAHANIAN, R.; KAMALIAN, E. Effects of decreasing metabolizable protein and rumen-undegradable protein on milk production and composition and blood metabolites of Holstein dairy cows in early lactation. **J. Dairy Sci.**, v.97, n.6, p.3707-3714, 2014.

BARROS, T.; QUAASSDORFF, M. A.; AGUERRE, M. J.; COLMENERO, J. J. O.; BERTICS, S. J.; CRUMP, P. M.; WATTIAUX, M. A. Effects of dietary crude protein concentration on late-lactation dairy cow performance and indicators of nitrogen utilization. **J. Dairy Sci.**, v.100, n.7, p.5434–5448, 2017.

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

BELASCO, I. J. Fate of carbon-14 labeled methionine hydroxy analog and methionine in the lactating dairy cow. **J. Dairy Sci.** v.63, p. 775-784, 1980.

BENTLEY Instruments, Inc. **Bentley Sistema Combinado 2300. Operator's manual**. Chaska: Bentley, 2007. 115p.

BERTHIAUME, R.; THIVIERGE, M. C.; PATTON, R. A.; DUBREULL, P.; STEVENSON, M.; MCBRIDE, B. W.; LAPIERRE, H. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 1621–1634, 2006.

BOERMAN, J. P.; POTTS, S. B.; VANDEHAAR, M. J.; LOCK, A. L. Effects of partly replacing dietary starch with fiber and fat on milk production and energy partitioning. **J. Dairy Sci.**, v. 98, p. 7264-7276, 2015.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.86, p. 1370–1381, 2003.

CAMPBELL, C.G.; TITGEMEYER, E.C.; ST-JEAN, G. Sulfur amino acid utilization by growing steers. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 230–238, 1997.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; CUNHA, M.; DETMANN, K.S.C.; PAULINO, M.F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **R. Bras. Zootec.**, v. 38, n. 1, p. 130-138, 2009.

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.** Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992, 22p.

DOEPEL, L.; PACHECO, D.; KENNELLY, J. J.; HANIGAN, M. D.; LOPEZ, I. F. ; LAPIERRE, H. Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.1279–1297, 2004.

DÓREA, J. R. R.; DANÉS, M. A. C.; ZANTON, G. I.; ARMENTANO, L. E. Urinary purine derivatives as a tool to estimate dry matter intake in cattle: A meta-analysis. **J. Dairy Sci.**, v.100., p. 8977–8994, 2017.

E. MERCK AG. **Métodos complexiometricos de valorización com Titriplex.** 3 ed. Ed. Darmstadt. Alemanha, p. 25. s.d.

FRANK, B.; SWENSSON, C. Relationship Between Content of Crude Protein in Rations for Dairy Cows and Milk Yield, Concentration of Urea in Milk and Ammonia Emissions. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.7, p. 1829-1838, 2002.

GIALLONGO, F.; HARPER, M.T.; OH, J.; LOPES, J.C.; LAPIERRE, H.; PATTON, R.A.; PARYS, C.; SHINZATO, I; HRISTOV, A.N. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.6, p. 4437–4452, 2016.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. (Eds): **Anais do primeiro Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil.** Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.73-89, 2003.

GROFF, E. B.; WU, Z. Milk production and nitrogen excretion of dairy cows fed different amounts of protein and varying of alfalfa and corn silage. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 3619–3632, 2005.

HORST, J.A. Manual de operações de campo. Curitiba: APCBRH, versão 8.0, s.d.

HYNES, D. N.; STERGIADIS, S.; GORDON, A.; YAN, T. Effects of crude protein level in concentrate supplements on animal performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows fed fresh-cut perennial grass. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.10, p. 8111–8120, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 2005, p. 748.

KAJIKAWA, H.; MITSUMORI, M.; OHMOMO, S. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. **J. Dairy Sci.**, v.85, p. 2015-2022, 2002.

KALSCHEUR, K. F.; BALDWIN VI, R. L.; GLENN, B. P.; KOHN, R. A. Milk Production of Dairy Cows Fed Differing Concentrations of Rumen-Degraded Protein. **J. Dairy Sci.**, v.89, p. 249–259, 2006.

LEAN, I.J.; DE ONDARZA, M.B.; SNIFFEN, C.J.; SANTOS, J.E.P.; GRISWOLD, K.E. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. **J. Dairy Sci.**, v.101, p. 340-364, 2018.

LEE, C.; GIALLONGO, F.; HRISTOV, A.N.; LAPIERRE, H.; CASSIDY, T.W.; HEYLER, K.S.; VARGA, G.A.; PARYS, C. Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.98, n.3, p. 1885–1902, 2015.

LEE, C.; HRISTOV, A. N.; CASSIDY, T. W.; HEYLER, K S.; LAPIERRE, H.; VARGA, G. A.; DE VETH, M. J.; PATTON, R. A.; PARYS, C. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. **J. Dairy Sci.**, v.95, p. 6042-6056, 2012.

LEONARDI, C.; STEVENSON, M.; ARMENTANO, L.E. Effect of Two Levels of Crude Protein and Methionine Supplementation on Performance of Dairy Cows. **J. Dairy Sci.**, v.86, p. 4033-4042, 2003.

LIRA, F.R.A. **Determinação da concentração de nitrogênio uréico no plasma como ferramenta auxiliar no manejo sustentável em rebanhos leiteiros sergipanos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. p.28, 2011.

MARINI, J. C.; VAN AMBURGH, M. E. Partition of nitrogen excretion in urine and the feces of Holstein replacement heifers. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 1778-1784, 2005.

MORAIS JUNIOR, N.N.; SALVATI, G.G.S.; OLIVEIRA, R.; PEREIRA, R.A.N.; PEREIRA, M.N. A controlled on farm evaluation of methionine for lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 96, E-Suppl. 1, p. 247, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy cattle**. Washington, DC: Natl. Acad. Sci., 7 ed., 2001.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R.; SYLVESTER, J. T. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 223-237, 2005.

PACHECO, D.; PATTON, R.A; PARYS, C.; LAPIERRE, H. Ability of commercially available dairy ration programs to predict duodenal flows of protein and essential amino acids in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.95, n. 2, p. 937-963, 2012.

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. **J. Dairy Sci.**, v.93, n. 5, p. 2105-2118, 2010.

PISULEWSKI, P. M.; RULQUIN, H.; PEYRAUD, J. L.; VERITE, R. Lactational and systemic responses of dairy cows to postprandial infusions of increasing amounts of methionine. **J. Dairy Sci.**, v.79, p.1781–1791, 1996.

RULQUIN, H.; PISULEWSKI, P.M.; VERITÉ, R.; GUINARD, J. Milk production and composition as a function of postprandial lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. **Liv. Prod. Sci.**, v.37, p.69-90, 1993.

SALVATI, G.G.S.; MORAIS JUNIOR, N.N.; LOPES, F.C.F.; PEREIRA, R.A.N.; PEREIRA, M.N. Performance, digestion, milk fatty acids, and plasma amino acids in response to the supplementation of methionine and plant extracts to dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 96, E-Suppl. 1, p. 240, 2013.

SALVATI, G.G.S.; MORAIS JÚNIOR, N.N.; MELO, A.C.S.; VILELA, R.R.; CARDOSO, F.F.; ARONOVICH, M.; PEREIRA, R.A.N.; PEREIRA, M.N. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. **J. Dairy Sci.**, v.98, p. 4062–4073, 2015.

SANCANARI, J.B.D. et al. Efeito da metionina protegida e não protegida da degradação ruminal sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 30, n. 1, fev. 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide: Statistics**. Cary, NC: SAS Inst. Inc., 8 v., 2000.

SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.100, n.12, p.10094–10112, 2017.

SCHWAB, C.G.; BOZAK, C.K.; WHITEHOUSE, N.L.; OLSON, V.M. Amino acid limitation and flow to the duodenum at four stages of lactation. 2. Extent of lysine limitation. **J. Dairy Sci.**, v.75, p.3503-3518, 1992.

SILVA, D.J; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos – **Métodos químicos e biológicos**. 3 ed., Viçosa: Ed. UFV., 2006, p.23-29.

SOCHA, M.T.; PUTNAM, D.E.; GARTHWAITE, B.D.; WHITEHOUSE, N.L.; KIERSTEAD, N.A.; SCHWAB, C.G.; DUCHARME, D.A.; ROBERT, J.C. Response to lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids Improving Intestinal Amino Acid Supply of Pre- and Postpartum Dairy Cows with Rumen-Protected Methionine and Lysine. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 1113–1126, 2005.

ST-PIERRE, N.R.; THRAEN, C.S. Animal grouping strategies, sources of variation, and economic factors affecting nutrient balance on dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v.82, supl. 2, p. 72–83, 1999.

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **J. Dairy Sci.**, v.75, p. 345–357, 1992.

VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. et al. Óxido crômico e lignina na determinação dos fluxos de matéria seca em bovinos e bubalinos. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.14, n.5, p.565-574, 1985.

VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C.; CLAYTON, M.K. Effect of replacing Alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **J. Dairy Sci.**, v.82, p. 2686–2696, 1999.

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

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3583-3597, 1991.

VYAS, D.; ERDMAN, R.A. Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and methionine supplementation. **J. Dairy Sci.**, v.92, p. 5011–5018, 2009.

WANG, C.; LIU H.Y.; WANG, Y.M.; YANG, Z.Q.; LIU, J.X.; WU, Y.M.; YAN, T.; YE, H.W. Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.93, p. 3661–3670, 2010.

WHITEHOUSE, N. L.; SCHWAB, C. G.; TYLUTKI, T.; SLOAN, B. K. Optimal lysine and methionine concentrations for milk protein production as determined with the latest versions of Dairy NRC (2001) and AMTS-Cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 96 (E-Suppl. 1), p. 253, 2013.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. **J. Dairy Sci.**, v.65, p. 495-501, 1982.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. **J. Dairy Sci.**, v.65, p. 495-501, 1982.

WU, Z.; SATTER, D. L. Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. **J. Dairy Sci.**, v.83, p. 1042–1051, 2000.

YAN, T.; FROST, J.P.; AGNEW, R.E.; BINNIE, R.C.; MAYNE, C.S. Relationships among manure nitrogen output and dietary and animal factors in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.89, p. 3981– 3991, 2006.

YOUSEF, M.K. In: **Basic principles. Stress physiology in livestock.**, v.1 Boca Raton: CRC Pres, 1985.

ZANTON, G.I. Analysis of production responses to changing crude protein levels in lactating dairy cow diets when evaluated in continuous or change-over experimental designs. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.6, p. 4398-4410, 2016.

ANEXO A – PARECER DE PROTOCOLO CEUA PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais



Curitiba, 12 de Novembro de 2015.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 1000 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Desempenho de vacas leiteiras suplementares com lisina e metionina protegidas da degradação ruminal em dois níveis de proteína bruta dietética.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: André Ostrensky

EQUIPE DE PESQUISA: Rodrigo de Almeida, Deivid Roni Ribeiro, Alceu Miguel Grebogi, Rebeca Mayre de Jesus, Giancarlo Negro

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Doutorado

VIGÊNCIA DO PROJETO	11/2015 a 07/2016	QUANTIDADE DE ANIMAIS	36
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Bos taurus</i> (Bois)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	27 a 68 meses / 585 a 851kg	ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	FEGA	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **24.09.2015**.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciane Fischer
Coordenadora - Comitê de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba - Paraná

Telefone: (41) 3371-2202