

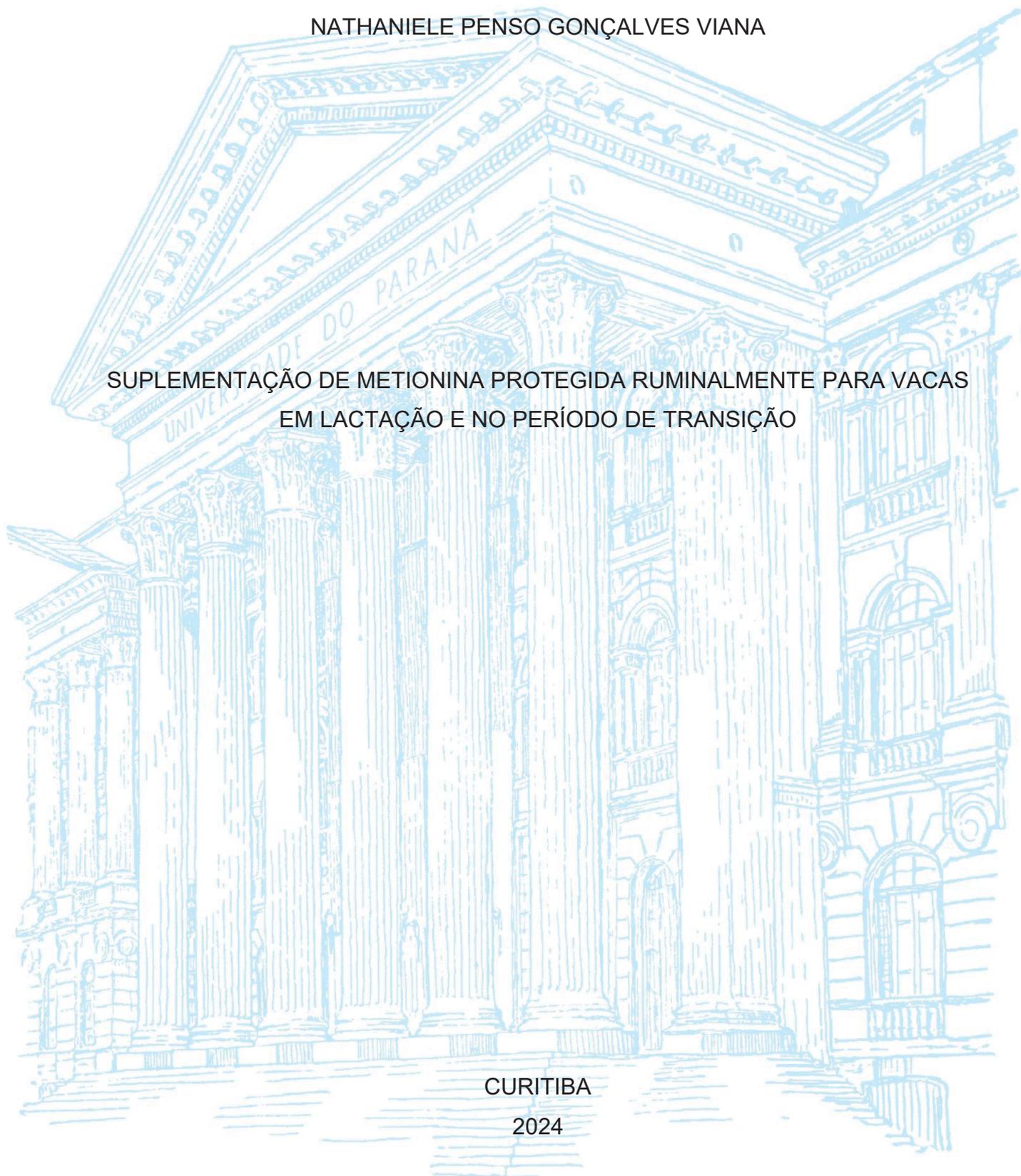
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHANIELE PENSO GONÇALVES VIANA

SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE PARA VACAS  
EM LACTAÇÃO E NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

CURITIBA

2024



NATHANIELE PENSO GONÇALVES VIANA

SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE PARA VACAS  
EM LACTAÇÃO E NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Viana, Nathaniele Penso Gonçalves

Suplementação de metionina protegida ruminalmente para vacas em lactação e no período de transição / Nathaniele Penso Gonçalves Viana. – Curitiba, 2024.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

1. Aminoácidos. 2. Leite - Proteínas. 3. Metionina. 4. Vacas. I. Almeida, Rodrigo de. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -  
40001016082P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATHANIELE PENSO GONÇALVES VIANA** intitulada: **Suplementação de metionina protegida ruminalmente para vacas em lactação e no período de transição**, sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO DE ALMEIDA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 19 de Março de 2024.

RODRIGO DE ALMEIDA

Presidente da Banca Examinadora

CAIO SEITI TAKIYA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

SIMONE GISELE DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esta pesquisa aos meus familiares, amigos e a todas as pessoas que me ouviram, incentivaram e acreditaram no meu trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais João Viana e Margarete Aparecida Viana, por sempre me apoiarem, aconselharam e acreditaram nos meus sonhos. A minha irmã, Liandra Viana, que considero minha melhor amiga, que sempre me motivou e me fez sorrir durante as fases mais difíceis da minha vida. Ao meu namorado, Erick Scholze, que esteve sempre ao meu lado, em todas as minhas dificuldades, com muita disposição e atenção para me ajudar.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade. Em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPR, à Sílvia e à Professora Maity, que sempre acompanharam minha trajetória.

Agradeço aos amigos que a Universidade Federal do Paraná me proporcionou, em especial à família Grupo do Leite por todo o aprendizado e companheirismo, criando um vínculo não somente profissional. Em especial meus colegas Milena, Liliana, Georgia, Josué e Jean. Com carinho especial às colegas Liliana e Milena, por me ajudarem na execução do meu experimento e estarem do meu lado nos momentos mais desafiantes. E ao Professor André, que sempre esteve ao meu lado durante minha graduação, me incentivando a crescer e seguir na área da pesquisa.

Agradeço à Chácara Frísia e aos colegas da Cooperativa Frísia, que sempre estiveram ao meu lado na realização do meu experimento com muito companheirismo e troca de conhecimento, em especial ao Fernando, Everton, Leopoldo e Mayuri.

Agradeço também à Agropecuária Regia pelo acolhimento e amizade que construímos durante o meu projeto de mestrado. Aos amigos Caio, Josuel, Karine, Marlise, Dulce, João Paulo, Izaldo, Lima, Jorge, Nathalie e Marcos pelo apoio durante o experimento.

Ao professor Rodrigo de Almeida, em especial, por toda orientação, ensinamentos, conselhos e paciência, durante essa grande fase da minha vida. Muito obrigada.

“O capital afetivo é o maior patrimônio que o senhor humano pode construir na sua vida. Significa capacidade de se relacionar e fazer amigos, porque amigos fazem parte do nosso trabalho” de José Luiz Tejón.

## RESUMO

A metionina é um aminoácido limitante das vacas leiteiras, e a suplementação na dieta pode favorecer a produção, a composição do leite. O objetivo do estudo do capítulo II foi avaliar os efeitos de dois produtos de metionina protegida no rúmen (MPR) na produção, composição do leite e nos parâmetros sanguíneos de vacas Holandesas. Um total de 233 multíparas e 45 primíparas ( $185 \pm 129$  DEL) produzindo  $42,0 \pm 10,4$  kg/d foram utilizadas em um rebanho comercial. As vacas foram bloqueadas por parto, produção de leite e DEL, e distribuídas aleatoriamente em 1 dos 3 tratamentos, totalizando 120 vacas suplementadas com MET\_pH (Smartamine®; Adisseo Inc., França), 116 vacas MET\_etil (Mepron®; Evonik Industrias, Alemanha) e 42 vacas controle (CT). Em delineamento de blocos casualizados, o tratamento consistiu na suplementação diária de 15 g de MPR (MET\_pH ou MET\_etil) misturado com 85 g de fubá, enquanto os animais CT receberam uma quantidade equivalente de fubá, durante 30 dias. Não houve diferença na produção de leite ( $40,54$  vs  $39,91$  kg/d;  $p=0,62$ ) entre os tratamentos MPR, mas ambos os grupos de vacas tratadas com MPR apresentaram maior produção de leite ( $40,23$  vs.  $37,75$  kg/d;  $p<0,01$ ) do que o CT. Em relação à composição do leite entre vacas tratadas com SM e MP, não foram detectadas diferenças ( $p>0,05$ ) para todos os componentes. No entanto, comparando MET\_pH e MET\_etil vs. CT, os tratamentos MPR aumentaram o rendimento de gordura, proteína, caseína, lactose e de sólidos totais do leite. Vacas suplementadas com MPR também apresentaram maior teor de proteína do leite, teor de caseína e teor de sólidos totais do que o CT. E nos metabólitos sanguíneos, as vacas MET\_etil apresentaram maior proteína total e glicose, e ureia, em relação ao grupo MET\_pH e CT. O capítulo III avaliou o efeito da suplementação de MP (Mepron®; Evonik Industrias, Alemanha) no pré-parto na produção e composição do leite, peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) e glicose no início da lactação. Um total de 214 animais Holandeses no pré-parto de um rebanho comercial, foram bloqueados por paridade (84 novilhas, 76 primíparas e 54 multíparas), data prevista de parto e produção de leite na lactação anterior. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, e o tratamento consistiu na suplementação diária de 15 g de MP, misturado com 85 g de milho grão moído fornecido *top-dressed*, enquanto que os animais do grupo CT receberam 100 g de fubá de milho, durante  $26,1 \pm 3,2$  dias até o momento do parto. Ambos os grupos receberam 9,8 g de MP no pós-parto. O PC e o ECC não foram afetados ( $p>0,05$ ) pela suplementação no pré-parto. Vacas suplementadas com MP antes do parto também não apresentaram diferenças nas concentrações sanguíneas de BHB e glicose em relação aos animais CT. Foi encontrada diferença para produção de leite de 1 a 30 DEL entre os tratamentos ( $39,03$  vs.  $41,11$  kg/d), respectivamente para MP e CT; com interação ( $p<0,01$ ) entre tratamento e parto. Não foram detectadas diferenças na produção de leite para novilhas ( $31,18$  vs.  $33,15$  kg/d;  $p=0,13$ ) e para multíparas ( $46,22$  vs.  $43,88$  kg/d;  $p=0,57$ ), mas foram encontradas para primíparas ( $39,69$  vs.  $46,30$  kg/d;  $p<0,01$ ). Os animais suplementados no pré-parto apresentaram maior teor de proteína e caseína no leite, e menor nitrogênio ureico no leite. Conclui-se que a suplementação de MPR no capítulo II, favoreceu a produção de leite e a maioria dos componentes do leite, mas sem diferença entre as metioninas, porém algumas diferenças nos resultados dos metabólitos sanguíneos. E no capítulo III, a MP suplementada no período pré-parto aumentou os teores de proteína do leite e caseína, mas inesperadamente com diminuição da produção de leite para primíparas.

Palavras-chave: aminoácido, proteína no leite, grupo metil

## ABSTRACT

Methionine is the limiting amino acid for dairy cows, and dietary supplementation can favor milk production and composition. The objective of the study in Chapter II was to evaluate the effects of two rumen-protected methionine (RPM) products on milk production, composition, and blood parameters in Holstein cows. A total of 233 multiparous and 45 primiparous ( $185 \pm 129$  DIM) cows producing  $42.0 \pm 10.4$  kg/d were used in a commercial herd. Cows were blocked by calving, milk production, and DIM and randomly assigned to one of three treatments, totaling 120 cows supplemented with MET\_pH (Smartamine®; Adisseo Inc., France), 116 cows with MET\_ethyl (Mepron®; Evonik Industries, Germany), and 42 control cows (CT). In a randomized block design, the treatment consisted of daily supplementation of 15 g of RPM (MET\_pH or MET\_ethyl) mixed with 85 g of cornmeal, while CT animals received an equivalent amount of cornmeal for 30 days. There was no difference in milk production ( $40.54$  vs  $39.91$  kg/d;  $p=0.62$ ) between the RPM treatments, but both groups of cows treated with RPM showed higher milk production ( $40.23$  vs.  $37.75$  kg/d;  $p<0.01$ ) than the CT. Regarding milk composition between cows treated with MET\_pH and MET\_ethyl, no differences ( $p>0.05$ ) were detected for all components. However, comparing MET\_pH and MET\_ethyl vs. CT, the RPM treatments increased fat, protein, casein, lactose, and total milk solids yield. Cows supplemented with RPM also had higher milk protein, casein, and total solids content than the CT. And in blood metabolites, MET\_ethyl-treated cows showed higher total protein and glucose and lower urea compared to the MET\_pH group and CT. Chapter III evaluated the effect of prepartum MP (Mepron®; Evonik Industries, Germany) supplementation on milk production, composition, body weight (BW), body condition score (BCS),  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), and glucose at the onset of lactation. A total of 214 Holstein animals in the prepartum period from a commercial herd were blocked by parity (84 heifers, 76 primiparous, and 54 multiparous), expected calving date, and milk production in the previous lactation. The experimental design was a randomized block, and the treatment consisted of daily supplementation of 15 g of MP mixed with 85 g of ground cornmeal top-dressed, while CT group animals received 100 g of ground cornmeal for  $26.1 \pm 3.2$  days until calving. Both groups received 9.8 g of MP postpartum. BW and BCS were not affected ( $p>0.05$ ) by prepartum supplementation. Cows supplemented with MP prepartum also showed no differences in blood concentrations of BHB and glucose compared to CT animals. A difference in milk production from 1 to 30 DIM was found between treatments ( $39.03$  vs.  $41.11$  kg/d), respectively for MP and CT; with an interaction ( $p<0.01$ ) between treatment and calving. No differences in milk production were detected for heifers ( $31.18$  vs.  $33.15$  kg/d;  $p=0.13$ ) and multiparous cows ( $46.22$  vs.  $43.88$  kg/d;  $p=0.57$ ), but were found for primiparous cows ( $39.69$  vs.  $46.30$  kg/d;  $p<0.01$ ). Prepartum supplemented animals had higher milk protein and casein content and lower milk urea nitrogen. It is concluded that RPM supplementation in Chapter II favored milk production and most milk components, but without difference between methionines, however some differences in blood metabolites results. And in Chapter III, prepartum supplemented MP increased milk protein and casein content, but unexpectedly decreased milk production for primiparous cows.

Keywords: amino acid, milk protein, methyl group

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas metabólicas da metionina no organismo de vacas leiteiras. ....	27
Figura 2, 3, 4 e 5. Índice de Temperatura e Umidade (ITU) dentro do barracão pré-parto nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro, com 2581 gravações em intervalos de 1 hora. ITU: $64,7 \pm 4,52$ (média $\pm$ DP). Proporção THI > 68: 14,6% das mensurações. Temperatura: $18,7 \pm 4,7^{\circ}\text{C}$ . Umidade: $77,6 \pm 11,32\%$ .....	73
Figura 6. Curvas de produção de leite até 30 dias de DEL das nulíparas dos grupos Controle e Mepron. ....	81
Figura 7. Curvas de produção de leite até 30 dias de DEL das primíparas dos grupos Controle e Mepron. ....	82
Figura 8 . Curvas de produção de leite até 30 dias de DEL das múltíparas dos grupos Controle e Mepron. ....	82
Figura 9. Concentrações de $\beta$ -hidroxibutirato nos dias +3, +7 e +14 após o parto, de vacas suplementadas com MP (Mepron) no pré-parto e não suplementadas (CT).....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes e nível de inclusão (%MS) da dieta dos animais pertencentes aos grupos Controle, MET_pH e MET_etil.....	46
Tabela 2. Composição dos nutrientes das dietas das vacas em lactação do tratamento controle e dos tratamentos MET_pH e MET_etil). ....	47
Tabela 3. Produção, composição do leite e escore linear de CCS das vacas suplementadas com MET_pH e MET_etil ou não suplementadas (CT). .....	53
Tabela 4. Efeito na concentração de metabólitos sanguíneos das vacas suplementadas com metionina protegida com revestimento sensível ao pH e metionina protegida com revestimento de etil-celulose (MET_pH e MET_etil) ou não suplementadas (CT). ....	55
Tabela 5. Médias ajustadas de peso e ECC inicial (P1), média peso e ECC final (P2) e mudança dessas variáveis ao longo do experimento.....	56
Tabela 6. Ingredientes e nível de inclusão (%MS) da dieta dos animais dos grupos Controle e Mepron no pré e no pós-parto. ....	70
Tabela 7. Composição das dietas no pré-parto dos tratamentos Controle e MP e da dieta no pós-parto. ....	71
Tabela 8. Descrição dos animais inscritos, motivos de exclusão e animais incluídos nas análises estatísticas de acordo com a paridade.....	79
Tabela 9. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) na dieta pré-parto, no desempenho produtivo de vacas leiteiras .....	80
Tabela 10. Perfil dos ácidos graxos do leite de vacas leiteiras recém-paridas suplementadas com MP (Mepron) durante o pré-parto (g/100g de gordura). ....	83
Tabela 11. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) na dieta pré-parto no peso corporal e no escore de condição corporal. ....	85
Tabela 12. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) no pré-parto nas concentrações de $\beta$ -hidroxibutirato nos dias +3, +7 e +14, e glicose no dia +7 após o parto.....	85
Tabela 13. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) na dieta pré-parto na incidência de doenças até 60 dias de lactação.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGNE	- Ácidos graxos não esterificados
AST	- Aspartato amino transferase
BEN	- Balanço energético negativo
BHB	- Beta-hidroxibutirato
BPN	- Balanço proteico negativo
CCS	- Contagem de células somáticas
CMS	- Consumo de matéria seca
CPT-1	- Carnitina palmitoil transferase-1
DEL	- Dias em leite
ECC	- Escore de condição corporal
GGT	- Gama glutamil transferase
MET_etil	- Metionina protegida com revestimento de etil-celulose
MET_pH	- Metionina protegida com revestimento pH sensível
MPR	- Metionina protegida ruminalmente
MS	- Matéria seca
NUL	- Nitrogênio ureico no leite
PDR	- Proteína degradável no rúmen
PNDR	- Proteína não degradável no rúmen
SAM	- S-adenosilmetionina
TMR	- Dieta total misturada
VLDL	- Lipoproteína de muita baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO I. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Metabolismo da proteína e dos aminoácidos .....	21
1.2.2 Suplementação da metionina .....	24
1.2.3 Metabolismo da metionina .....	26
1.2.4 Efeito da metionina no período de transição .....	29
1.2.5 Efeito da metionina na produção e composição do leite.....	32
<b>1.3 CONCLUSÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>1.4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>2 CAPÍTULO II. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE DUAS METIONINAS PROTEGIDAS RUMINALMENTE NA PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO DO LEITE E METABOLISMO DE VACAS LACTANTES.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
2.2.1 Animais e fazenda .....	44
2.2.2 Delimitação experimental e Tratamentos .....	44
2.2.3 Dieta e metioninas .....	46
2.2.5 Coleta e análises de leite.....	49
2.2.6 Peso e ECC .....	50
2.2.7 Coleta e análises de TMR e volumosos .....	50
2.2.5 Amostragem e processamento do sangue .....	51
2.2.6 Análise estatística .....	52
<b>2.3 RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
2.3.1 Produção de leite.....	53
2.3.2 Composição do leite .....	54
2.3.3 Metabólitos sanguíneos.....	54
2.3.4 Peso e ECC .....	55
<b>2.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>2.5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>2.6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>

<b>3 CAPÍTULO III. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE PARA VACAS NO PRÉ-PARTO E SEU IMPACTO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO, SAÚDE E METABOLISMO .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
3.2.1 Delineamento experimental e tratamentos .....	68
3.2.2 Vacas, alojamento e dieta .....	68
3.2.3 Manejo durante o parto e bezerros.....	73
3.2.4 Coleta e análise de amostras .....	74
3.2.5 Peso corporal e ECC .....	76
3.2.6 Amostragem e processamento do sangue .....	76
3.2.7 Categorização de doenças .....	77
3.2.8 Análise estatística.....	78
<b>3.3 RESULTADOS .....</b>	<b>79</b>
3.3.1 Produção e composição do leite.....	80
3.3.2 Colostro, IgG e peso do bezerro ao nascer .....	84
3.3.3 Peso e ECC.....	84
3.3.4 Saúde .....	85
<b>3.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>3.5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>3.6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>
<b>4 REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>97</b>

## 1 CAPÍTULO I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a atividade leiteira cresceu fortemente no Brasil, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o país está na sexta posição no ranking dos países de maior produção de leite (FAO, 2022). Além disso, o Anuário do Leite (2023), apresentado por Embrapa Gado de Leite, relata que a produtividade média do rebanho nacional é mais de três vezes superior à registrada a anos atrás, devido a intensificação dos sistemas de produção e adição de tecnologias.

Simultaneamente com o desenvolvimento do setor, houve o investimento em ganho genético, que promoveu maior produtividade dos animais. E as principais características selecionadas para bovinos leiteiros são características produtivas; produção e composição do leite. Entretanto, animais de alto desempenho genético são mais susceptíveis ao desenvolvimento de enfermidades e apresentam maiores exigências de nutrientes para manter a eficiência produtiva (SILVA et al., 2014).

Da mesma forma, a nutrição animal também acompanhou a evolução da pecuária leiteira, desenvolvendo dietas mais assertivas com nutrientes que atendam às necessidades dos animais e ofereçam maior aporte aos desafios da lactação. A suplementação de aminoácidos essenciais como a metionina protegida ruminalmente (MPR), possui grande relevância nesta evolução, mostrando melhora no desempenho das vacas lactantes (OSORIO et al., 2013). Alguns estudos revelam que esse aminoácido promove além do aumento na produção e nos componentes do leite, também incremento na imunidade. Justificado pelo maior aporte de aminoácidos no sangue, formação de lipoproteínas e

intensificação de rotas metabólicas devido a produção de S-adesonilmetionina (SAM) (ORDWAY et al., 2009; OSORIO et al., 2013).

Com isso, a suplementação de metionina tanto em vacas em lactação, quanto em vacas no período de transição, pode promover ganhos em saúde e no metabolismo envolvido em processos antioxidantes e na mobilização de proteína e gordura. Tais ações podem refletir no desempenho dos animais durante toda a lactação.

Assim, a presente revisão bibliográfica possui o objetivo de avaliar o funcionamento do aminoácido metionina na dieta de vacas leiteiras e sua relação com o metabolismo e o desempenho animal.

## **1.2 DESENVOLVIMENTO**

### **1.2.1 Metabolismo da proteína e dos aminoácidos**

As proteínas são macromoléculas, compostas por polímeros de aminoácidos, os quais realizam diversas funções no metabolismo do animal, como por exemplo: síntese de proteínas, lipídeos e nucleotídeos, funções enzimáticas, hormonais, entre outras funcionalidades relacionadas a homeostase e o desempenho produtivo (LEHNINGER et al., 1999). Para realizar essas funções com eficiência, as concentrações de proteína e aminoácidos absorvidos devem ser adequadas, por isso é necessário compreender o metabolismo desses nutrientes.

Na nutrição de ruminantes, a proteína dietética é composta por duas frações; a fração de proteína degradável no rúmen (PDR) e a fração não degradável no rúmen (PNDR). A fração PDR sofre ação da microbiota ruminal, utilizando os peptídeos, aminoácidos e amônia da estrutura para multiplicação celular e produção de proteína microbiana. Enquanto

que a proteína não degradável no rúmen (PNDR) é degradada no abomaso e seus componentes absorvidos no intestino. Entretanto, uma porção da PNDR não é disponível no abomaso e é indigestível para o animal. A proteína microbiana em conjunto com a PNDR e a proteína endógena, formam a proteína metabolizável, composta basicamente por aminoácidos provenientes dessas três frações (NASEM, 2021).

Conhecer as fontes de proteína disponíveis e sua composição é imprescindível para formular uma dieta mais assertiva. Além da origem da proteína, é importante mensurar a quantidade oferecida para evitar gastos energéticos na excreção da fração proteica.

Tanto o acúmulo de nitrogênio amoniacal no rúmen, devido ao excesso de PDR ou falta de carboidratos na dieta, quanto a amônia, que pode ser proveniente da desaminação no fígado de aminoácidos absorvidos no intestino e do catabolismo de proteínas, serão transformados em ureia e excretado nos rins. Esse produto do metabolismo das proteínas, pode atingir a corrente sanguínea e alcançar o rúmen através da saliva, ou atingir a glândula mamária, e ser excretada no leite. O nitrogênio ureico do leite (NUL) pode ser uma ferramenta para avaliar os níveis de PDR, observar a eficiência no uso do nitrogênio e sinalizar se a dieta fornecida é adequada (NRC, 2021; SCHWAB & BRODERICK, 2017; KAUFFMAN & ST-PIERRE, 2001).

Visto que o conhecimento da PB da dieta não é suficiente para formular uma dieta eficiente, é essencial compreender os níveis de PDR que serão suficientes para suprir as necessidades de amônia e de aminoácidos na fermentação ruminal para a produção de proteína microbiana, os níveis de aminoácidos da PNDR e as exigências das vacas (SCHWAB & BRODERICK, 2017).

Os aminoácidos atuam em diversas rotas metabólicas, mas são principalmente responsáveis pela síntese proteica, e em casos de deficiência energética as estruturas

dessas moléculas podem ser desaminadas e utilizadas para a produção de energia (MARTINS et al., 2018). Entretanto, apenas 20 aminoácidos são classificados como estruturais, ou seja, vitais na produção de proteínas. Dentre eles, alguns são considerados não essenciais e 9 deles são categorizados como essenciais ( histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), e 1 condicionalmente essencial (arginina). Os aminoácidos não essenciais são sintetizados no organismo animal, através de outras moléculas fontes de carbono e nitrogênio. Já os aminoácidos essenciais são sintetizados em baixas quantidades pelo organismo animal, e por isso devem ser suplementados, na tentativa de suprir a exigência animal (NRC, 2021). Entre os 10 aminoácidos categorizados como essenciais para vacas leiteiras, 5 deles são tipicamente limitantes segundo o NASEM (2021): metionina, lisina, histidina, isoleucina e leucina.

Apesar do novo NRC (NASEM, 2021) destacar a importância de verificar as concentrações destes 5 aminoácidos na proteína metabolizável na estimativa da produção de proteína do leite, tipicamente apenas lisina e metionina são considerados aminoácidos essenciais e limitantes para vacas leiteira, de acordo com diversas pesquisas (ZHOU et al., 2016; OSORIO et al., 2013). Essa conclusão foi obtida através da convergência de diversos estudos, que observaram alterações no teor e na produção de proteína no leite, variáveis sensíveis ao balanceamento de aminoácidos, quando houve variação desses dois aminoácidos (RULQUIN & KOWALCZYK, 2003; SCHWAB et al., 2007).

Nas últimas décadas, vários estudos tentam buscar a quantidade ideal de lisina e metionina que deve ser oferecido às vacas leiteiras, para maximizar a proteína metabolizável, e com isso o aumentar o desempenho dos animais. Segundo o NRC (2001), as concentrações ideais desses aminoácidos seriam de 7,2% de lisina e 2,4% de metionina na proteína metabolizável, mantendo uma relação 3:1. Entretanto, como atingir estas

concentrações é muito custoso e exigiria altas dosagens de suplementação, Schwab et al. (2007) sugeriram concentrações “mais comerciais” e um pouco inferiores desses aminoácidos, 6,6-6,9% de lisina e 2,2-2,3% de metionina na proteína metabolizável, respectivamente.

Porém, alcançar esses níveis na proteína metabolizável não é simples, devido a deficiência da metionina nos alimentos comumente utilizados nas dietas de vacas leiteiras e produção não suficiente através da síntese de proteína microbiana (ALVES, 2004). Assumindo que a principal fonte de proteína na dieta das vacas de leite no Brasil é o farelo de soja, alimento que apresenta níveis satisfatórios de lisina, mas muito baixos de metionina, tipicamente se justifica a suplementação de metionina na dieta de vacas leiteiras no nosso país.

### 1.2.2 Suplementação da metionina

Há muito tempo a metionina já é relatada como um aminoácido importante na indústria de aves e suínos, e experimentos seguintes também mostraram o impacto desta molécula no desempenho de vacas leiteiras, particularmente as de alta produção (RICHARDSON & HATFIELD, 1978). Segundo Schwab et al. (1992), a metionina é considerada um aminoácido limitante para bovinos leiteiros e sua suplementação pode promover aumento na produção de leite e na proteína do leite, principalmente nas dietas comumente formuladas, deficientes em metionina.

A adição na dieta de fontes de proteína que incluem metionina na sua composição, por exemplo, pode não ser o suficiente para alcançar o fluxo de aminoácidos necessários no intestino. Isso porque, a microbiota presente no rúmen degrada parcialmente os nutrientes da dieta, e de maneira simbiótica, utiliza-os para crescimento e proliferação no ambiente.

Por esse motivo que os nutrientes formulados e oferecidos ao animal, difere dos nutrientes disponíveis para absorção (LAPIERRE et al., 2006).

Levando isso em consideração, os aminoácidos essenciais lisina e metionina são comumente suplementados de maneira protegida da degradação ruminal. Algumas técnicas foram adotadas para impedir a degradação da molécula pelos microrganismos do rúmen, como a utilização de etil-celulose, uma película de revestimento de liberação lenta (Mepron®), permitindo uma proteção do rúmen e efetividade do aminoácido no intestino (SCHWAB, 2007). Esse produto contém 85% de DL-metionina, possuindo coeficiente de digestibilidade intestinal de 90% e (Schwab, 1995) e desvio ruminal de 80% (Overton et al., 1996), resultando em 61% de metionina metabolizável.

Uma outra forma de evitar a degradação da metionina suplementada é o encapsulamento por uma barreira física de ácidos graxos, sensíveis ao pH mais baixo do abomaso (Smartamine®), permitindo uma resistência no rúmen e liberação rápida no abomaso (SCHWAB, 2007), com 75% de DL-metionina e biodisponibilidade de 83% (RULQUIN & KOWALCZYK, 2003), o que resulta em 62% de metionina metabolizável. Entretanto o produto pode sofrer limitações se o pH do rúmen da vaca estiver baixo, devido uma acidose ruminal (RODE & KUNG, 1996).

Após a passagem pelo rúmen, ocorre a liberação da molécula no abomaso e absorção no intestino delgado, o que favorece maior concentração do aminoácido na corrente sanguínea e com isso, melhor aproveitamento dos seus benefícios (NRC, 2021). Segundo Batistel et al. (2017), o aumento do aporte de metionina no intestino, permite uma maior síntese proteica para as funções metabólicas.

A quantidade oferecida da metionina protegida da degradação ruminal (MPR) vai depender da origem do produto, bem como da recomendação do nutricionista, mas

geralmente a recomendação é de 10 a 20 g/vaca/dia, dependendo da categoria animal, da produtividade do lote ou do rebanho e da composição da dieta. A meta-análise de Wei et al. (2022) compilou dados de 2010 até 2022 e os autores relataram que a dose ideal, para alcançar eficácia do produto em composição do leite, foi de 7,5 a 12,5 g/d de MPR.

Com isso, a adição de MPR pode ser uma estratégia para alcançar um balanceamento adequado de aminoácidos na dieta. Entretanto, pode ocorrer variações na resposta da suplementação, por isso é essencial analisar o produto, a biodisponibilidade, a dosagem e a exigência dos animais em cada fase da lactação ou gestação para comprovar sua eficácia visto que, as exigências nutricionais aumentam quando as vacas estão no pré e pós-parto imediato, e conforme a vaca se aproxima do pico de lactação (NRC, 2001).

### 1.2.3 Metabolismo da metionina

Após a absorção da metionina no intestino, os níveis desse aminoácido no sangue podem aumentar e favorecer diversas rotas metabólicas, demonstradas na Figura 1. Por ser considerado uma molécula limitante, sua suplementação também favorece a eficiência dos outros aminoácidos presentes no organismo (Schwab et al., 1992). Através disso, a capacidade de síntese de proteínas é beneficiada e além do seu papel estrutural, a metionina participa de diversas rotas metabólicas.

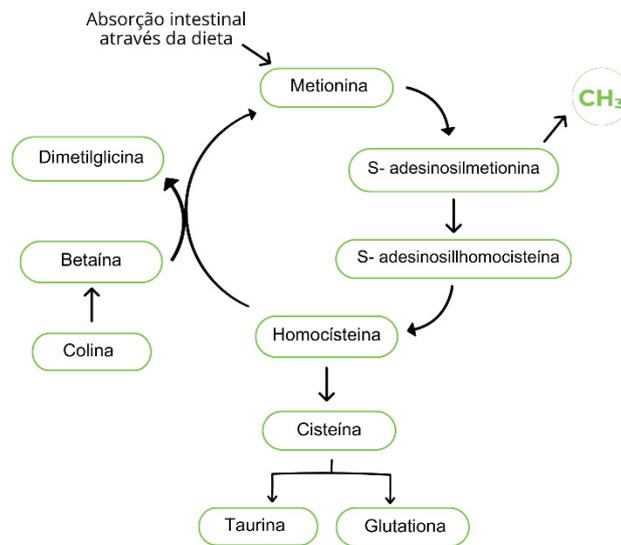


Figura 1. Rotas metabólicas da metionina no organismo de vacas leiteiras.

Um dos destinos possíveis é a metionina ser direcionada ao ciclo de 1-carbono, onde o aminoácido metionina é convertido em S-adenosilmetionina (SAM), principal doador de grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) no organismo animal (OSÓRIO et al., 2013). A molécula SAM é de extrema importância no metabolismo, podendo transferir o  $\text{CH}_3$  para estruturas proteicas, pequenas moléculas, RNA, mas principalmente para o DNA, através do processo de metilação (BROSNAN, 2006).

A metilação do DNA consiste na alteração química da estrutura, com adição do  $\text{CH}_3$ , através da enzima DNA metiltransferase, e assim, promove alterações na transcrição de genes. Dessa forma, a metilação é considerada o principal mecanismo epigenético, que consiste na modificação do DNA e das histonas, sem alteração da sequência de bases, mas são herdáveis na divisão celular (FEINBERG, 2001; TANG & HO, 2007). Por meio desse processo, ocorre o silenciamento de genes, que podem estar desfavorecendo o desempenho produtivo dos animais, como a produção de leite (SINGH et al., 2012).

Após o esgotamento de  $\text{CH}_3$ , a SAM transforma-se em S-adenosil-homocisteína, e em seguida converte-se em homocisteína, que pode seguir dois caminhos. Primeiro, pode

ocorrer adição de  $\text{CH}_3$ , regenerando a metionina, que pode ser usada novamente nas rotas metabólicas. Ou segundo, pode ocorrer síntese de cisteína através da via de transulfuração, que forma ligações dissulfeto, e assim produz glutathione e taurina (REZZI et al., 2007; NICHOLSON & LINDON, 2008).

A taurina é um aminoácido que possui um grupo sulfonato ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ), que pode doar elétrons para espécies reativas de oxigênio, assim como a glutathione com seu grupo tiol ( $-\text{SH}$ ), o que garante funções antioxidantes para ambos. Com isso, taurina e glutathione protegem as células contra ações deletérias, principalmente as do sistema imunológico, preservando sua integridade e função (BARBOSA et al., 2010; LAMBERT et al., 2015). Além dessa função, a taurina possui o potencial de modular repostas inflamatórias, através da diminuição de síntese de ocitocinas e enzimas que produzem mediadores inflamatórios (CHA & KIM, 2012).

Além dessa rota metabólica, a SAM participa da síntese de proteínas através de reações de transmetilação, que consiste na adição do  $\text{CH}_3$  em moléculas mais simples, e assim contribui para a síntese de aminoácidos, lipídeos, RNA e DNA (ZHOU et al., 2017; ZHOU et al., 2018).

O processo de doação de  $\text{CH}_3$  através da SAM, pode favorecer a síntese da fosfatidilcolina e principalmente formação das apolipoproteínas, estruturas que compõem as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), molécula produzida e secretada no fígado, responsável pelo transporte de triglicéridos para fora do órgão (ZOM et al., 2011). Além disso, a VLDL pode alcançar a glândula mamária e contribuir para a produção de gordura no leite (MARTINOV et al., 2010).

Através do ciclo de 1-carbono ocorre a produção de homocisteína, e no processo de remetilação esta é convertida em betaína, e em seguida oxidada em dimetilglicina, e por fim,

é formada a molécula de metionina. A betáina é produzida através da colina, e por participarem de rotas metabólicas análogas, a colina é o principal formador da fosfatidilcolina, responsável pela síntese de fosfolipídios que compõe o VLDL e a metionina, na formação da coenzima carnitina. Através da enzima carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), ocorre a regulação da entrada de AGNE no interior das mitocôndrias, e com isso, viabiliza-se a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos hepáticos, função de extrema importância em vacas leiteiras (LEE et al., 2011). Tanto colina quanto metionina são capazes de atuar no metabolismo hepático, favorecer a produção de carnitina e regular a expressão da CPT-1 (SERVIDDIO et al., 2011).

Sabendo desses potenciais efeitos da metionina no metabolismo das vacas leiteiras, a suplementação desse aminoácido para vacas em transição pode ser uma ferramenta nutricional para minimizar os desafios desse período e promover maior desempenho lactacional.

#### 1.2.4 Efeito da metionina no período de transição

O período de transição, tipicamente definido como o intervalo de 3 semanas pré-parto e 3 semanas pós-parto, é caracterizado por intensas mudanças metabólicas e hormonais devido ao parto, a colostrogênese e a lactogênese, que são processos que demandam energia e são considerados como homeorréticos da vaca periparturiente (BAUMAN & CURRIE, 1980). Entre essas alterações ocorre a diminuição no consumo de matéria seca (CMS), que vai se agravando até o momento do parto, e estende-se por alguns dias no pós-parto. Como consequência, o animal apresenta uma absorção limitada de nutrientes, concomitante com o aumento das exigências nutricionais durante o pré e principalmente o pós-parto (NRC, 2021; CUPERTINO et al., 2011).

Essas alterações promovem um balanço energético negativo (BEN), o que predispõe a incidência de doenças, como cetose, hipocalcemia, retenção de placenta, deslocamento de abomaso, e até mesmo algumas doenças infecciosas como metrite e mastite (PATELLI et al., 2017).

Além dos desafios do BEN, vacas leiteiras recém-paridas também se deparam com um balanço proteico negativo (BPN). Vacas no período de transição apresentam uma carência de doadores de grupo metil, estruturas intermediárias do metabolismo energético, originados da degradação de proteínas (VAN DER DRIFT et al., 2012). Como já discutido acima, a metionina participa do ciclo de 1-carbono, sendo convertida em SAM, o que favorece a doação de CH<sub>3</sub> nas rotas metabólicas, e promove mais saúde e melhor desempenho dos animais no pós-parto imediato (OSORIO et al., 2013).

A vaca em BEN mobiliza triglicerídeos do tecido adiposo, o que aumenta a concentração de AGNE no sangue, e estes em grande parte se direcionam para o fígado. Na tentativa de suprir a necessidade energética, parte destes AG são oxidados parcialmente a corpos cetônicos; acetoacetato, acetona e beta-hidroxibutirato (BHB) (MCART, 2012). Níveis elevados de AGNE e BHB refletem alta mobilização de tecido adiposo, potencial acúmulo de gordura no fígado, e intensa perda de peso e de escore das vacas. Essas alterações podem aumentar o estresse oxidativo, e com isso, elevar o status inflamatório e comprometer o sistema imune (TREVISI & MINUTI, 2018).

Já a suplementação de MPR permite a síntese de taurina e glutatona, aminoácidos e peptídeos que possuem funções antioxidantes, que atuam contra espécies reativas ao oxigênio e protegem as células do estresse oxidativo. Além de minimizar o impacto de processos inflamatórios no organismo, previnem o desenvolvimento de doenças e promovem a homeostase (BARBOSA et al., 2010).

A metionina também contribui na formação do VLDL, que no pós-parto permite menor acúmulo de AG no tecido hepático, evitando um quadro de esteatose hepática. Os AG podem ser re-esterificados e transportados através do VLDL para outros tecidos, como a glândula mamária e o tecido muscular, permitindo maior saúde hepática e aumento do teor de gordura no leite (GONZÁLEZ & SILVA, 2006; ZOM et al., 2011).

Metionina e colina atuam juntas na formação do VLDL, e também na produção de carnitina, envolvida na entrada de acil-CoA no interior da mitocôndria (SUN et al., 2016). Entretanto, estudos mais recentes afirmam que essa teoria só é válida na ausência de precursores de VLDL, como por exemplo em vacas no pós-parto imediato, em razão do efeito da limitada disponibilidade de metionina sobre essa lipoproteína nos hepatócitos (CHANDLER & WHITE, 2017). Sun et al. (2016) avaliaram a adição de 15 g de MPR no período de transição, e relataram menores concentrações de AGNE, BHB e colesterol no pós-parto em relação ao grupo controle, assim como maiores níveis de glicose, VLDL e apolipoproteínas, o que sugere alterações favoráveis no metabolismo lipídico no fígado.

Com relação a incidência de doenças no pós-parto, Toledo et al. (2023) relataram menor ocorrência apenas de hipocalcemia subclínica no dia do parto, em vacas suplementadas com 12 g de MPR (Smartamine ®; Adisseo Inc.) misturado com 215 g de resíduo de destilaria seco (DDGS) no pré-parto e 27 g no pós-parto da mesma metionina comercial, misturado com 200 g de DDGS, oferecidos na TMR. Também observaram no estudo, uma maior concentração e produção de proteína no leite em vacas tratadas em relação ao grupo controle. Uma tendência na diminuição da incidência de cetose clínica foi encontrada por Osorio et al. (2013), em vacas suplementadas com MPR(Smartamine ®; Adisseo Inc.), e ajuste diário de 0,07% na MS de forma top-dressed, 21 dias antes de parir até 30 dias de DEL.

Zhou et al. (2016) suplementaram MPR (Smartamine®; Adisseo Inc.) para vacas no pré e no pós-parto, com 0,08% da MS, e relataram aumento da atividade fagocitária pelos leucócitos e melhor função antioxidante, através do aumento de glutathione no tecido hepático, e menor incidência de cetose e retenção de placenta. Resultado muito semelhante ao estudo de Batistel et al. (2018), que encontraram menor concentração de espécies reativas ao oxigênio no sangue, provavelmente pelo aumento do antioxidante glutathione e maior atividade de neutrófilos, porém não encontrou diferença na ocorrência de doenças, ao suplementar na TMR 0,09% na MS de MPR ((Mepron®; Evonik Industrias) no pré parto e 0,10% na MS no pós-parto.

Além disso, maior atividade de antioxidantes e maior concentração hepática de carnitina foram relatadas em vacas suplementadas com MPR a 0,07% da MS (OSORIO et al., 2014). Esse mesmo estudo também relatou menor produção de colina e fosfatidilcolina, o que sugere maior utilização dessas moléculas para produção de VLDL.

Esses efeitos podem ser justificados pela melhor função imunológica, redução da inflamação e do estresse oxidativo, e alterações positivas no metabolismo hepático (ZHOU et al., 2016; BASTISTEL et al., 2017). E dessa maneira, as vacas podem responder com maior produção de leite e de sólidos, principalmente teores de proteína.

#### 1.2.5 Efeito da metionina na produção e composição do leite

Como comentado anteriormente, a metionina atua em diversas vias metabólicas que podem amenizar os desafios no período de transição. Entretanto, vacas lactantes, principalmente nas fases de pico e de alta produção, também demandam a suplementação desse aminoácido na dieta, principalmente para a síntese dos sólidos no leite.

Socha et al. (2005) sugerem que o aumento na disponibilidade de metionina pode afetar positivamente a síntese e a eficiência de outros aminoácidos proteínogênicos, que serão absorvidos na glândula mamária e convertidos em componentes do leite. Além disso, por ser um aminoácido sulfurado, a MPR pode favorecer a síntese de cisteína, homocisteína e taurina, aminoácidos que estão envolvidos em diversas rotas metabólicas.

A adição de metionina na dieta favorece a quantidade de proteína metabolizável e o balanço adequado de aminoácidos na circulação. Estes, por serem precursores da síntese proteica, proporcionam maior rendimento de proteína no leite (GAO et al., 2017), visto que a glândula mamária utiliza os aminoácidos livres da circulação para a produção dessas macromoléculas proteicas (BACKWELL et al., 1996).

Além disso, esse aminoácido sinaliza a mTOR (*mammalian target of rapamycin* ou proteína alvo da rapamicina em mamíferos), proteína quinase que além de atuar no metabolismo lipídico, também é responsável pela síntese proteica (APPUHAMY et al., 2012). Esse mecanismo também explica o aumento da caseína em animais suplementados, devido esta representar 80% da proteína no leite (NAN et al., 2014).

A gordura é um componente bastante variável na composição do leite e pode sofrer alteração com a suplementação de MPR. A formação de SAM, que promove a síntese de fosfatidilcolina e assim de VLDL, pode favorecer o transporte de ácidos graxos do fígado para a glândula mamária, visto que 40 a 60% dos ácidos graxos da gordura do leite são oriundos são oriundos do VLDL em vacas recém-paridas (BIONAZ & LOOR, 2008). Além disso, as reações de transmetilação podem favorecer a síntese *de novo* de ácidos graxos e assim, aumentar os teores de gordura no leite (SAMUELSON et., 2001).

Chiogna et al. (2021) suplementaram 23 g de MPR em vacas lactantes próximo ao pico de produção (65 ± 28 dias) e os autores relataram aumentos na produção de leite,

maiores produções e teores de proteína e caseína, maiores produções de gordura e sólidos totais, menor teor de lactose, mas sem alterações significativas em produção de lactose, teor de sólidos totais, nitrogênio ureico no leite (NUL) e CCS.

O potencial aumento na produção de leite com a suplementação de MPR ainda não está bem elucidado pelos estudos. Mesmo a metionina sendo um aminoácido considerado gliconeogênico, acredita-se que essa molécula possui prioridades maiores em outras rotas metabólicas do que a produção de glicose, que poderia favorecer o aumento no volume de leite. Isso pode ser confirmado no estudo de Doepel & Lapierre (2010), que relataram aumentos na produção e na proteína de leite, porém não encontraram aumento na captação de glicose, mas sim de BHB e lactato, outros substratos disponíveis para a glândula mamária como fonte de energia. O aumento na produção de leite também poderia ser explicado por processos epigenéticos, através da adição de CH<sub>3</sub> no DNA, que promoveria o silenciamento na expressão de genes, ou alterações moleculares em mecanismos relacionados a produção de leite e síntese de proteínas (SINGH et al., 2012).

Também não está bem elucidada a relação do NUL com os aminoácidos essenciais. Pereira et al. (2017) relataram uma melhor eficiência no uso de nitrogênio, em vacas suplementadas com MPR e lisina protegida. Da mesma forma, Noftsker & St-Pierre (2003) observaram menor quantidade de nitrogênio no plasma e conseqüentemente, menor NUL em vacas suplementadas com MPR.

A suplementação com MPR pode favorecer o metabolismo de proteínas e melhorar a utilização dos aminoácidos para a síntese de proteína no leite, e como consequência a caseína, o que normalmente resulta em NUL mais baixo (MUSCHER et al., 2010). Li et al. (2022) suplementaram 15 g de metionina por dia, em vacas com aproximadamente  $63 \pm 25$  de DEL, e não observaram diferenças na produção e nos sólidos do leite, em relação ao

grupo controle, mas a suplementação com MPR resultou em menor quantidade de nitrogênio no sangue.

A contagem de células somáticas (CCS) é um indicador de saúde da glândula mamária, e em casos de mastite, a CCS normalmente está aumentada. Entretanto, mesmo com os potenciais efeitos favoráveis da MPR na imunidade das vacas, os estudos não têm mostrado relação da CCS em vacas suplementadas (CHIOGNA et al., 2021; LI et al., 2022). Mas um estudo com suplementação de MPR com zinco mostrou resultados interessantes, onde as vacas suplementadas produziram mais leite e apresentaram melhor sanidade do úbere, com menor CCS (KELLOGG et al., 2004).

### **1.3 CONCLUSÕES**

A metionina é um aminoácido de uso crescente na pecuária de leite, particularmente em rebanhos de boa produtividade e em regiões onde há bonificação por melhoria dos sólidos do leite. Diversas pesquisas demonstram principalmente o efeito na produção e na porcentagem de proteína no leite, no metabolismo lipídico e na saúde hepática. Por esse motivo, a adição dessa molécula, em conjunto com os ajustes dietéticos necessários para alcançar a quantidade ideal de aminoácidos, possui o potencial de melhorar o desempenho dos animais.

### **1.4 REFERÊNCIAS**

ALVES, D. Nutrição aminoacídica de bovinos. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 10, 2004.

ANUÁRIO Leite 2023: leite baixo carbono. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023.

- APPUHAMY, J. R. N. et al. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *The Journal of Nutrition*, v. 142, p. 484-491, 2012.
- BACKWELL, F. R. et al. Evidence for the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat in vivo. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 271, p. R955-R960, 1996.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 480-490, 2018.
- BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 7455-7467, 2017.
- BAUMAN, D. E.; CURRIE, B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v. 63, p. 1514-1529, 1980.
- BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, v. 9, p. 366, 2008.
- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. *Journal of Nutrition*, v. 136, p. 1636-1640, 2006.
- CHA, S.; YU, H.; KIM, J. Y. Bone mineral density-associated polymorphisms are associated with obesity-related traits in Korean adults in a sex-dependent manner. *PLoS One*, v. 7, p. e53013, 2012.
- CHANDLER, T. L.; WHITE, H. M. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. *PLoS One*, v. 12, 2017.
- CHIOGNA, V. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLoS One*, v. 16, 2021.
- DOEPEL, L.; LAPIERRE, H. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 3264-3274, 2010.
- FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics take center stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 392-394, 2001.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATIONS – FAO. Dairy production and products: milk production. Rome: FAO, 2022.

- GAO, H. N. et al. Combination of histidine, lysine, methionine, and leucine promotes  $\beta$ -casein synthesis via the mechanistic target of rapamycin signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 7696-7709, 2017.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. 357 p
- GRIECO, A. J. Homocystinuria: pathogenic mechanisms. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 273, p. 120-132, 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2020.
- KAUFFMAN, A. J.; ST-PIERRE, N. R. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2284-2294, 2001.
- KELLOGG, D. W.; TOMLINSON, D. J.; SOCHA, M. T.; JOHNSON, A. B. Effects of zinc methionine complex on milk production and somatic cell count of dairy cows: twelve-trial summary. *Professional Animal Scientist*, v. 20, p. 295-301, 2004.
- LAMBERT, I. H.; KRISTENSEN, D. M.; HOLM, J. B.; MORTENSEN, O. H. Physiological role of taurine from organism to organelle. *Acta Physiologica*, v. 213, p. 191-212, 2015.
- LAPIERRE, H.; PACHECO, D.; BERTHIAUME, R. et al. What is the supply of amino acids for a dairy cow? *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. E1-E14, 2006.
- LEE, K.; KERNER, J.; HOPPEL, C. L. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 25655-25662, 2011.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. Tradução de W. R. N. Lodi e A. A. Simões. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1999.
- LI, Y. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on production performance, apparent digestibility, blood parameters, and ruminal fermentation of lactating Holstein dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 981757, 2022.
- MARTINOV, M. V. et al. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1804, p. 89-96, 2010.
- MARTINS, R. M. R. F. Transplantação hepática: novos fatores de prognóstico da regulação da função mitocondrial na isquemia/reperfusão. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.
- MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V.; OETZEL, G. R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 5056-5066, 2012.
- MUSCHER, A. S.; SCHRÖDER, B.; BREVES, G.; HUBER, K. Dietary nitrogen reduction enhances urea transport across goat rumen epithelium. *Journal of Animal Science*, v. 88, p. 3390-3398, 2010.

NAN, X. et al. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. *Physiological genomics*, v. 46, p. 268-275, 2014.

NASEM, 2021. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, v. 29, p. 1181-1189, 2008.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R. Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 958-969, 2003.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

ORDWAY, R. S. et al. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5154-5166, 2009.

OSORIO, J. S. et al. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 7437-7450, 2014.

OSORIO, J. S. et al. Supplemental smartamine m or metasmart during the transition period benefits postparturient cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6248-6263, 2013.

OVERTON, Thomas R. et al. Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 631-638, 1996.

PARK, B. et al. Effect of rumen protected methionine and  $\alpha$ -tocopherol on growth performance, carcass characteristics, and meat composition of late fattening Hanwoo steer in high-temperature seasons. *Animals*, v. 10, p. 2430, 2020.

PATELLI, T. H. C. et al. Hipocalcemia no deslocamento de abomaso de bovinos: estudo de 39 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, p. 17-22, 2017.

PEREIRA, A. B. D. et al. Production and nitrogen utilization in lactating dairy cows fed ground field peas with or without ruminally protected lysine and methionine. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 6239-6255, 2017.

REZZI, S.; RAMADAN, Z.; FAY, L. B.; KOCHHAR, S. Nutritional metabolomics: applications and perspectives. *Journal of Proteome Research*, v. 6, p. 513-525, 2007.

RICHARDSON, C. R.; HATFIELD, E. E. The limiting amino acids in growing cattle. *Journal of Animal Science*, v. 46, p. 740-745, 1978.

- ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. de. Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária. Juiz de Fora, MG: *Embrapa Gado de Leite*, 2020. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 123).
- RODE, L. M.; KUNG, L. Rumen-protected amino acids improve milk production and milk protein yield. 1996
- RULQUIN, H.; KOWALCZYK, J. Development of a method for measuring lysine and methionine bioavailability in rumen-protected products for cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v. 12, p. 465-474, 2003.
- SAMUELSON, D. J.; DENISE, S. K.; ROFFLER, R. Response of Holstein and Brown Swiss cows fed alfalfa hay-based diets to supplemental methionine at two stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 917-928, 2001.
- SCHWAB, C. G. et al. Protected proteins and amino acids for ruminants. *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*, v. 141, 1995.
- SCHWAB, C. G. Protected proteins and amino acids for ruminants. In: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, 2007.
- SCHWAB, C. G.; BOZAK, C. K.; WHITEHOUSE, N. L.; MESSBAH, M. M. A. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequences of lysine and methionine limitation. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 3486-3502, 1992.
- SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10094-10112, 2017.
- SERVIDDIO, G. et al. Oxidation of hepatic carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet. *PLoS One*, v. 6, p. e24084, 2011.
- SILVA, E. A. et al. Teores de proteína bruta para bovinos alimentados com feno de tifton 85: consumo e digestibilidades total e parcial. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 237-245, 2007.
- SILVA, J. C. P M. Manejo e administração em bovinocultura leiteira. 2. ed., ampl. e atual. Viçosa: [s.n.], 2014.
- SINGH, K. et al. Epigenetics: A possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. *Animal*, v. 6, p. 375-381, 2012.
- SOCHA, M. T. et al. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1113-1126, 2005.
- SUN, F. et al. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS One*, v. 11, 2016.

SWANEPOEL, N. Estimating amino acid limitations in California dairy rations and the effect of feeding a ruminally protected lysine supplement on animal performance. 2009. Tese (Mestrado em Nutrição Animal) - Faculdade de Ciências Naturais e Agrícolas, Universidade de Pretória, Pretória.

TANG, W. Y.; HO, S. M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 8, p. 173-182, 2007.

TOLEDO, M. Z. et al. Effects of feeding rumen-protected methionine pre-and postpartum in multiparous Holstein cows: Health disorders and interactions with production and reproduction. *Journal of Dairy Science*, v. 106, p. 2137-2152, 2023.

TREVISI, E.; MINUTI, A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Research in Veterinary Science*, v. 116, p. 47-54, 2018.

VAN DER DRIFT, S. G. A. et al. Protein and fat mobilization and associations with serum  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 4911-4920, 2012.

WEI, C. et al. Meta-analysis of rumen-protected methionine in milk production and composition of dairy cows. *Animals*, v. 12, p. 1505, 2022.

ZHOU, Y. F. et al. Methionine and choline supply alter transmethylation, transsulfuration, and cytidine 5'-diphosphocholine pathways to different extents in isolated primary liver cells from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 11384-11395, 2018.

ZHOU, Z. et al. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 8716-8732, 2016.

ZHOU, Z. et al. Hepatic activity and transcription of betaine-homocysteine methyltransferase, methionine synthase, and cystathionine synthase in periparturient dairy cows are altered to different extents by supply of methionine and choline. *The Journal of Nutrition*, v. 147, p. 11-19, 2017.

ZOM, R. L. G. et al. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 4016-4027, 2011.

## **2 CAPÍTULO II. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE DUAS METIONINAS PROTEGIDAS RUMINALMENTE NA PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO DO LEITE E METABOLISMO DE VACAS LACTANTES**

### **SUMÁRIO INTERPRETATIVO**

**Efeitos da suplementação de duas metioninas protegidas ruminalmente na produção, composição do leite e metabolismo de vacas lactantes.** *Por Viana et al.* A suplementação de 15 g de metionina protegida ruminalmente (MPR), independente do produto comercial, aumentou a produção, gordura e proteína do leite, mas sem distinção comparando MET\_pH e MET\_etil. Algumas diferenças entre os tratamentos nos parâmetros sanguíneos foram encontrados, mas novamente com similaridade entre os dois produtos fontes de MPR.

### **CABEÇALHO**

#### **EFEITOS DA METIONINA PROTEGIDA NO DESEMPENHO DE VACAS LACTANTES**

##### **Efeitos da suplementação de duas metioninas protegidas ruminalmente na produção, composição do leite e metabolismo de vacas lactantes**

N. P. G. Viana<sup>1</sup>; L. C. Obialeski<sup>1</sup>; J. T. R. Carvalho<sup>1</sup>; J. Ebeling<sup>1</sup>; L. S. Nogueira<sup>1</sup>; E. S. Vaz<sup>1</sup>; M. Poczynek<sup>1</sup>; J. C. Grossmann<sup>1</sup>; F. H. Dalmass<sup>2</sup>; L. B. Los<sup>2</sup>; R. Almeida<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Frísia Cooperativa Agroindustrial, Carambeí, PR, Brasil

\*Autor para correspondência: R. Almeida. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: ralmeida@ufpr.br

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de dois produtos de metionina protegida no rúmen (RPM) na produção e composição do leite em vacas Holandesas lactantes. Um total de 278 vacas Holandesas múltíparas ( $185 \pm 129$  dias em lactação) produzindo  $42,0 \pm 10,4$  kg/dia foram utilizadas em um rebanho comercial no estado do Paraná, sul do Brasil. As vacas foram agrupadas por paridade, produção de leite e dias em lactação e designadas aleatoriamente para 1 dos 3 tratamentos, consistindo de 120 vacas suplementadas com MET\_pH (Smartamine M®; Adisseo Inc., França), 116 vacas com MET\_etil (Mepron®; Evonik Industrias, Alemanha), e 42 vacas controle (CT). Em um delineamento de blocos ao acaso, o tratamento consistiu na suplementação diária de 15 g de RPM (MET\_pH ou MET\_etil) misturados com 85 g de farelo de milho fornecido top-dressed e dividido em dois tratamentos diários. Os animais controle receberam uma quantidade equivalente de farelo de milho. O período experimental total foi de 33 dias, com os primeiros 3 dias utilizados como covariável e 30 dias de suplementação com RPM. Amostras de leite foram coletadas nos últimos 3 dias do período experimental, completando nove ordenhas consecutivas. Os dados foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS (v.9.4), contendo os efeitos fixos de tratamento, tempo e interação tratamento\*tempo, a covariável, e os efeitos aleatórios de bloco e vaca dentro do tratamento. Não houve diferença na produção de leite ( $40,54$  vs.  $39,91$  kg/dia;  $P=0,62$ ) entre os tratamentos MET\_pH e MET\_etil, mas ambos os grupos de vacas tratadas com RPM mostraram maiores produções de leite ( $40,23$  vs.  $37,75$  kg/dia;  $P<0,01$ ) do que os controles. Em relação à composição do leite entre vacas tratadas com MET\_pH vs. MET\_etil, não foram detectadas diferenças ( $P>0,05$ ) para todos os componentes. No entanto, comparando MET\_pH e MET\_etil vs. CT, os tratamentos RPM aumentaram a produção de gordura em  $0,193$  kg/dia ( $P<0,01$ ), a produção de proteína em  $0,115$  kg/dia ( $P<0,01$ ), a produção de caseína em  $0,089$  kg/dia ( $P<0,01$ ), a produção de lactose em  $0,133$  kg/dia ( $P<0,01$ ), e a produção de sólidos totais do leite em  $0,460$  kg/dia ( $P<0,01$ ). Vacas suplementadas com RPM também apresentaram maior teor de proteína do leite ( $3,56$  vs.  $3,51\%$ ;  $P<0,01$ ), teor de caseína ( $2,83$  vs.  $2,79\%$ ;  $P<0,01$ ) e teor de sólidos totais ( $13,65$  vs.  $13,51\%$ ;  $P=0,05$ ) do que o CT, sem diferenças ( $P>0,05$ ) para os teores de gordura do leite e lactose. Em relação aos metabólitos sanguíneos, vacas suplementadas com MET\_etil mostraram maiores concentrações de proteína total e glicose, e menor ureia em relação ao MET\_pH e ao CT. Nossos resultados sugerem que não houve diferenças entre os dois produtos de RPM na produção e composição do leite, e ambas as vacas suplementadas com RPM apresentaram melhor desempenho do que os controles.

Palavras-chave: proteína, aminoácido, sólidos do leite

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os altos preços dos insumos e o valor do leite mais competitivo com Argentina e o Uruguai na atividade leiteira têm forçado os produtores e a indústria a uma nova estratégia de mercado (Anuário do leite, 2023). A bonificação pela qualidade do leite, principalmente na quantidade de proteína e gordura, motivou os produtores a buscarem opções que afetam positivamente na composição do leite. Sabendo disso, a metionina é um dos aminoácidos que mais limitam a produção de leite de vacas leiteiras, impactando também a produção de sólidos e principalmente a proteína no leite (NRC, 2021), a suplementação desse aminoácido é uma alternativa para melhorar a quantidade de sólidos e maximizar a rentabilidade da atividade.

A metionina protegida de degradação ruminal (MPR), é fornecida de maneira encapsulada, permitindo sua melhor absorção no intestino. Um dos efeitos mais relevantes da metionina é o aumento de aporte de aminoácidos no sangue, o que promove a síntese proteica e conseqüentemente a produção de proteína no leite (GAO et al., 2017). Além disso, a formação da S-adenosilmetionina (SAM), um doador universal de grupo metil, que promove a metilação do DNA (Osorio et al., 2013), afetando a expressão de genes relacionados a produção de leite (Singh et al., 2012) e a síntese de proteína do leite (Chiogna et al., 2021). Além da formação das apolipoproteínas constituintes das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e na expressão de genes lipogênicos, que parecem estar relacionados com o aumento dos teores de gordura no leite (Osorio et al., 2013; Sun et al., 2016).

Entretanto, é necessário ter cautela na escolha da fonte comercial desse aminoácido, devido a grande quantidade de produtos com diferentes graus de proteção, degradação ruminal e distintas biodisponibilidades. O produto Smartamine (Smartamine M®; Adisseo Inc., França), apresenta estrutura com sensibilidade ao pH baixo, enquanto o Mepron

(Mepron®; Evonik Industrias., Alemanha) possui uma película de revestimento de etil-celulose. Além das distintas composições na estrutura, apresentam diferenças na disponibilidade.

Com o propósito de identificar a fonte comercial de MPR mais eficiente, através da comparação entre os produtos comerciais de MPR na suplementação de vacas em lactação, avaliando seus efeitos na produção, composição do leite e parâmetros sanguíneos. A hipótese do experimento é que ambos os grupos de vacas suplementadas com MPR, produzem mais leite e principalmente com incremento de proteína, em relação ao grupo controle.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, sob o protocolo número 027/2022.

### **2.2.1 Animais e fazenda**

O experimento foi conduzido em uma propriedade leiteira, localizada na cidade de Carambeí, região Centro-Oriental do Estado do Paraná, Sul do Brasil (Latitude  $-24^{\circ} 59' 14''$  e Longitude  $-50^{\circ} 06' 39''$ ). A propriedade possui ao redor de 675 vacas em lactação da raça Holandesa, em sistema de alojamento do tipo free-stall, com camas de areia e sistema de ventilação e aspersão. O sistema de ordenha é o modelo espinha de peixe dupla e as vacas eram ordenhadas 3 vezes ao dia (4h00, 12h00 e 20h00).

### **2.2.2 Delinemaneto experimental e Tratamentos**

O experimento foi conduzido entre o final de agosto até o final de setembro de 2022, totalizando 33 dias experimentais. Os 3 primeiros dias consistiram no período covariável,

onde foram realizadas coletas de amostras individuais de leite em 9 ordenhas consecutivas. Através das informações coletadas nesse período (ordem de parição, DEL e produção de leite), as vacas foram blocadas em 1 de 3 tratamentos. Os animais foram distribuídos em 60 vacas do grupo controle, recebendo apenas uma quantidade equivalente de milho grão moído (100 g/vaca/dia), 130 vacas recebendo suplementação de MET\_pH (Smartamine M®, Adisseo Inc., França), e 130 vacas suplementadas com MET\_etil (Mepron®; Evonik Industrias, Alemanha). Como a diferença no número de animais tratados foi diferente do controle, devido uma exigência da fazenda comercial, foram totalizados 65 blocos, contendo no máximo 5 vacas por bloco (2 MET\_pH, 2 MET\_etil e 1 controle) e no mínimo 2 (1 MET\_pH e 1 MET\_etil).

Os dois grupos suplementados com MPR recebiam 15 g (dose recomendada pelos dois fabricantes do produto) de MET\_pH ou MET\_etil, misturados com 85 g de milho grão moído, na intenção de não limitar o consumo, devido ao sabor adstringente do produto. Esse fornecimento era dividido em 2 tratos, top-dressed, durante a liberação da TMR (dieta total misturada) no cocho enquanto os animais estavam em ordenha, com vagão misturador contendo a mesma dieta para os 3 grupos, no período da manhã e da tarde (4h00 e 12h00).

Para garantir melhor consumo do produto, após a chegada dos animais no cocho, após a ordenha, era realizado o travamento dos canzís, mantendo o animal em frente a comida, durante um período máximo de 15 minutos. No período da tarde (12h00) os animais não eram travados, mas era realizado o avanço da comida ao cocho, o que estimulava os animais ao cocho.

Previamente ao início do experimento, a propriedade já utilizava o produto Smartamine; por esse motivo, a MPR foi retirada da dieta de todo o rebanho um mês antes do experimento começar, sem danos ao experimento, pois a metionina não apresenta

evidências de efeito “carryover” durante a lactação nos animais. A usual utilização do produto justifica o porquê da utilização de apenas 60 animais controle, visto que o produtor não pretendia retirar o produto de mais animais, afetando a composição dos sólidos no leite de mais animais.

As vacas receberam a suplementação dos tratamentos durante 30 dias e nos 3 últimos dias foram feitas novas coletas de amostras de leite, novamente de 9 ordenhas consecutiva. Além da coleta de produção de leite durante a ordenha, mensuração de peso e ECC antes e após a suplementação e coleta de sangue no última dia do experimento, com intuito de comparar os resultados do período covariável com o período final de suplementação.

### 2.2.3 Dieta e metioninas

Em relação a dieta fornecida para as vacas, com exceção da suplementação das fontes de MPR, a dieta dos animais era igual para todos os tratamentos e os ingredientes e sua proporção na MS podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Ingredientes e nível de inclusão (%MS) da dieta dos animais pertencentes aos grupos Controle, MET\_pH e MET\_etil.

Ingredientes (%MS)	Dieta
Silagem de milho	31,32
Silagem pré-secada de azevém	12,69
Palha de trigo	1,34
Casca de soja	4,26
Milho grão moído	22,45
Caroço de algodão	4,34
Farelo de soja, PB 45,5%	14,35
Resíduo de cervejaria úmido, 28% PB	6,52
Bicarbonato de sódio	0,96
Calcário	0,86
Fosfato monocálcico	0,31
Levedura viva <sup>2</sup>	0,004

Óxido de magnésio	0,26
Mistura mineral-vitamínica 0,5% <sup>3</sup>	0,17
Sal comum	0,17

<sup>2</sup>Levucell SB® (*Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii CNCM I-1079)

<sup>3</sup>Premix Bovigold® - Contém por kg do produto: 250 g Ca, 40 g P, 20 g S, 25 g Mg, 10 g K, 70 g Na, 750 mg Cu, 20 mg Cr, 40 mg I, 2.000 mg Mn, 22 mg Se, 2.850 mg Zn, 350.000 UI Vit A, 100.000 UI Vit D3, 2.000 UI Vit E.

Os animais do grupo MET\_pH e MET\_etil receberam 7,5 g do produto durante o trato da manhã e 7,5 g no trato da tarde, totalizando 15 g/vaca/dia de metionina, misturados em 85 g/vaca/dia de milho grão moído. Já os animais do grupo controle receberam apenas 100 g/vaca/dia de fubá de milho, divididos nos 2 tratos.

Os valores da composição bromatológica dos ingredientes utilizados na TMR estão descritos na Tabela 2. Usando a versão mais recente (v.3.3.77) do software RLM Leite (Ração de Lucro Máximo), que adota o mesmo modelo de proteína que o NRC (2001), as concentrações previstas de Lys e Met na proteína metabolizável, no grupo controle foram 6,35 e 1,87% respectivamente, gerando uma relação Lys:Met de 3,39:1. Já nos grupos suplementados com MPR (MET\_pH e MET\_etil), as concentrações foram de 6,34 e 2,09%, produzindo uma relação Lys:Met em de 3,03:1.

Tabela 2. Composição dos nutrientes das dietas das vacas em lactação do tratamento controle e dos tratamentos MET\_pH e MET\_etil).

Item	Tratamentos		
	CT	MET_pH	MET_etil
Composição química da dieta, <sup>1</sup> %MS			
ELL, Mcal/kg	1,58	1,58	1,58
ED <sup>2</sup> , Mcal/kg	3,19	3,2	3,19
PB, %	16,6	17,04	16,64
MS, %	51,07	51,13	50,98
FDN, %	32,52	30,85	31,81
FDA, %	16,87	15,86	16,3
FDA/FDN proporção	0.51	0.51	0.51
FDN, forragem	21,73	21,59	21,83

Amido	28,14	27,69	27,98
RM, %	7,28	6,64	6,38
EE, %	3,72	4,5	4,06
CNF <sup>3</sup> , %	39,88	40,97	41,11
PM <sup>4</sup>	4,66	4,83	4,69
PNDR <sup>4</sup>	5,92	6,10	5,93
PDR <sup>4</sup>	10,68	10,94	10,71
MOR <sup>5</sup>	11,74	13,28	13,13
Ca, %	0,76	0,82	0,64
P, %	0,41	0,42	0,39
Fornecimento e balanço da proteína prevista, <sup>4</sup> g/d			
PM fornecida	2573	2633	2573
PM da proteína microbiana	1314	1323	1,31
PM da PNDR	1142	1193	1147
PM balanço	-373	-319	-371
Balanço de lisina e metionina, <sup>4</sup> g/d			
DLys oferecidos na dieta	170	178	170
DMet oferecidos na dieta	66	79	77
DMet oriunda do respectivo produto	-	9,3	9,15
Variável produção de leite prevista			
Produção de leite presumida para EL, kg/d	32,21	32,65	32,08
Produção de leite presumida pela PM, kg/d	34,45	35,55	34,49
Produção de leite presumida, kg/d	39,87	41,76	42,94

<sup>1</sup> Calculado a partir da composição analisada da amostra de TMR,

<sup>2</sup> Energia digestível.

<sup>3</sup> Calculado da seguinte forma:  $CNF = 100 - (PB + EE + (FDN - PIDN) + Cinzas)$ .

<sup>4</sup> Dados calculados com base no CMS observado, produção de leite, composição do leite e ECC usando RLM. PM = proteína metabolizável; PNDR = proteína não degradável no rúmen; PDR = proteína degradável no rúmen; DLys = lisina digestível; DMet = metionina digestível.

<sup>4</sup> MOR = matéria orgânica residual (CNF – amido).

O MET<sub>pH</sub> é encapsulado por um revestimento de polímero sensível ao pH (2-vinilpiridina-co-estireno), permitindo uma resistência no rúmen e liberação rápida no abomaso (Schwab, 2007). Esse produto contém 75% de DL-metionina e biodisponibilidade de 83% (Rulquin & Kowalczyk, 2003), o que resulta em 62% de metionina metabolizável. Já o MET<sub>etil</sub> é revestido por um filme de etil-celulose, carboidrato de digestão limitada, permitindo uma absorção lenta do aminoácido no intestino (Schwab, 2007). Esse produto contém 85% de DL-metionina, possuindo coeficiente de digestibilidade intestinal de 90% e

(Schwab, 1995) e desvio ruminal de 80% (Overton et al., 1996), resultando em 61% de metionina metabolizável. Logo, 15 gramas de MET\_etil e MET\_pH suplementado seriam equivalentes a 9,30 e 9,15 g de metionina metabolizável, respectivamente.

### 2.2.5 Coleta e análises de leite

Amostras de leite e resultados de produção de leite por ordenha foram coletadas em dois períodos distintos (covariável e final), com 9 ordenhas em sequência (3 dias) em cada período, com um total de 18 amostras coletadas de cada vaca experimental. O leite era coletado por amostradores á vacuo acoplados no sistema de ordenha (DeLaval<sup>®</sup>), coletando uma amostra composta do leite, individual de cada vaca durante a ordenha. Após a coleta pelo amostrador, o leite é armazenado em frascos com o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para posterior envio. Os resultados de produção de leite por ordenha eram obtidos através do software do sistema de ordenha da fazenda (DeLaval DelPro<sup>®</sup>).

Estas amostras foram enviadas ao Laboratório Centralizado de Análise de Leite da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) para análise dos teores de gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais, nitrogênio ureico no leite (NUL) e contagem de células somáticas (CCS). As amostras coletadas foram analisadas em um analisador automatizado (Nexgen, Bentley, MN, EUA) que adota a espectrofotometria do infravermelho médio Fourier-transformada no Laboratório Centralizado de Análise de Leite da APCBRH.

partir dos dados de produção e composição do leite obtidos, foi possível calcular com as fórmulas (1) a secreção diária de energia no leite;  $EL = [(0,0929 \times \% \text{gordura}) + (0,0547 \times \% \text{proteína}) + (0,0395 \times \% \text{lactose})] \times \text{kg de leite}$ , (2) a produção de leite corrigida para energia;  $PLCE = [(0,327 \times \text{produção de leite}) + (12,95 \times \text{produção de gordura}) + (7,20 \times \text{kg de proteína})]$ , e (3) a produção de leite corrigida para 4% de gordura;  $PLC4\%G = (0,4 + 15 \times \% \text{gordura}/100) \times$

kg de leite). A CCS foi transformada para uma escala linear de 0 a 9 pela equação:  $EL = [\text{Log}_2(\text{CCS}/100.000)] + 3$ , o que normaliza os dados e facilita a interpretação dos resultados.

#### 2.2.6 Peso e ECC

O peso dos animais foram estimados no período covariável e no último dia do experimento, por meio de fita que estima o peso vivo através da mensuração do perímetro torácico, no período da tarde, após serem trancados no canzil, com auxílio da equipe de manejo da fazenda. A magnitude da perda ou ganho de peso vivo foi calculada através da diferença entre  $PV_{\text{final}} - PV_{\text{inicial}}$  (kg/período). O escore de condição corporal (ECC) também foi avaliado nos mesmos dias que a mensuração do peso vivo, e a amplitude foi calculada da mesma forma, baseado em escala de 1 a 5 pontos, sendo 1 para os animais excessivamente magros e 5 para os animais obesos, conforme Edmonson et al. (1989).

#### 2.2.7 Coleta e análises de TMR e volumosos

Também foram coletadas amostras da TMR dos 3 tratamentos, no início, meio e fim do experimento, e amostras dos volumosos (silagem de milho, silagem pré-secada de azevém e palha de trigo) no início e final do experimento, com duplicatas de cada coleta. Em seguida, estas amostras foram identificadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente enviadas ao Laboratório de Nutrição Animal (LNA) da UFPR, em Curitiba-PR e descongeladas naturalmente por 24h para realização da análises.

Todo o processamento e análises das concentrações de MS, cinzas, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE) e macrominerais foram realizadas pelo mesmo laboratório. As amostras foram secas em estufa a  $55^{\circ}\text{C}$  por 72 h e moídas para passar por uma tela de malha de 1mm de diâmetro

em moinho estacionário (Wiley Mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), e armazenadas até a análise.

A concentração de MS foi determinada a 105°C por 24 h e cinzas foi avaliada a 550°C por 8 h. Todas as análises foram determinadas segundo os métodos da AOAC (Official Methods of Analysis of AOAC International, 2016). As frações de EE, FDN e FDA foram adaptadas para equipamento tipo ANKOM 2000. A fração PB seguiu o método Kjeldahl. O mineral Ca foi determinado por titulação e P por colorimetria.

#### 2.2.5 Amostragem e processamento do sangue

Amostras de sangue foram coletadas de todas as vacas, no último dia do experimento, após a coleta de leite da última ordenha, por punção dos vasos sanguíneos coccígeos em tubos vacualizados, com anticoagulante (EDTA) de 9 ml. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 2.500 x g à temperatura ambiente e o plasma sobrenadante foi pipetado e distribuído em duplicatas de microtubos de 1,5 mL, e posteriormente congelados a -20°C até a análise. Essas amostras foram destinadas para análise das concentrações de proteína total, albumina, colesterol, glicose e ureia, que são metabólitos referentes ao metabolismo de energético e proteico. E com a diferença entre o resultado de proteína total e albumina, é possível calcular o valor da globulina presente no sangue. As amostras foram analisadas em equipamento bioquímico automatizado (BS200 Mindray Starlab) no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

O metabólito proteína total foi analisado pelo método de espectrofotometria no ultravioleta e visível, enquanto albumina pelo método colorimétrico verde de bromo-cresol e através do cálculo da diferença entre proteína total e albumina, foi obtido o valor de globulina. O valor de colesterol foi analisado pelo método cinético colorimétrico e a glicose pelo método

enzimático colorimétrico. E por fim, a ureia foi analisada pelo método enzimático ultra-violeta (urease/glutamato desidrogenase).

### 2.2.6 Análise estatística

O delineamento experimental empregado foi de blocos casualizados. Para realizar a comparação entre os três tratamentos, foi utilizado contraste ortogonal. Os dados de produção e composição do leite foram analisados através do procedimento MIXED do programa SAS (v.9.4) contendo os efeitos fixos de tratamento, paridade, tempo e suas interações, a covariável e os efeitos aleatórios de bloco e vaca aninhada em tratamento. As seguintes estruturas de covariância foram testadas: componentes de variância (VC), auto-regressiva de primeira ordem [AR(1)], não estruturada (UN), simetria composta (CS) e Toeplitz (TOEP). Aquela que apresentou o menor valor do critério de informação de Akaike corrigido (AICC) foi selecionada. E os valores que não apresentaram normalidade foram submetidas à transformação de acordo com o procedimento Box-Cox (Box e Cox, 1964) usando uma macro para modelos mistos no SAS (Piepho, 2009).

Para as análises de ECC, peso vivo e metabólitos sanguíneos os dados foram avaliados pelo procedimento GLM do SAS, por não haver medidas repetidas no tempo. A significância foi declarada em  $P \leq 0,05$  e tendências foram consideradas quando  $P \leq 0,10$ .

## 2.3 RESULTADOS

Durante o período experimental, 42 animais foram removidos ( 10 animais do grupo MET\_pH, 14 do MET\_etil e 18 do controle). Dentro do grupo controle, 7 vacas foram excluídas por motivos de algum caso de 1 doença ou mais (mastite, problemas de casco, lesão nas pernas, trisiteza parasitária, doença respiratória e diarreia), também 4 vacas do grupo MET\_pH e 5 do grupo MET\_etil. Devido ao DEL lavado 7 vacas controle foram

destinadas a secagem, assim como 5 do grupo MET\_pH e 8 vacas do grupo MET\_etil. Além desse motivo, 2 vacas do grupo controle e 1 do grupo MET\_pH morreram. E apenas 2 vacas foram descartadas no grupo controle e 1 do grupo MET\_etil. Com isto, foram mantidas nas análises 120 vacas do grupo MET\_pH, 116 vacas MET\_etil e 42 vacas do grupo Controle. Esses animais apresentavam em média  $185 \pm 129$  de DEL e produziram  $42,0 \pm 10,4$  kg/d.

### 2.3.1 Produção de leite

Foi realizada a comparação das vacas dos tratamentos MET\_pH, MET\_etil e Controle, com diferenças ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Produção, composição do leite e escore linear de CCS das vacas suplementadas com MET\_pH e MET\_etil ou não suplementadas (CT).

Variável	Tratamento <sup>1</sup>			EPM	Valor <i>P</i>		
	CT	MET_pH	MET_etil		Trat.	MET_pH vs. MET_etil	CT vs. MET <sup>2</sup>
Produção de leite, kg/d	37,75	40,54	39,91	0,75	< 0,01	0,62	< 0,01
PLC4% <sup>3</sup>	38,43	42,63	42,07	0,72	< 0,01	0,73	< 0,01
PLCE <sup>4</sup>	42,40	47,01	46,28	0,79	< 0,01	0,62	< 0,01
Energy Milk <sup>5</sup>	28,23	31,26	30,74	0,52	< 0,01	0,59	< 0,01
Gordura, %	4,24	4,38	4,32	0,05	0,15	0,53	0,11
Gordura, kg/d	1,55	1,75	1,74	0,03	< 0,01	0,89	< 0,01
Proteína, %	3,51	3,58	3,55	0,01	< 0,01	0,14	< 0,01
Proteína, kg/d	1,30	1,43	1,39	0,02	< 0,01	0,24	< 0,01
Caseína, %	2,79	2,84	2,82	0,01	< 0,01	0,15	< 0,01
Caseína, kg/d	1,03	1,11	1,14	0,02	< 0,01	0,20	< 0,01
Lactose, %	4,63	4,64	4,63	0,01	0,51	0,59	0,64
Lactose, kg/d	1,73	1,88	1,84	0,04	< 0,01	0,52	< 0,01
Sólidos Totais, %	13,51	13,66	13,63	0,05	0,11	0,74	0,05
Sólidos Totais, kg/d	5,01	5,52	5,42	0,10	< 0,01	0,57	< 0,01
Escore linear CCS <sup>6</sup>	1,92	1,95	2,15	0,1	0,10	0,14	0,33

<sup>1</sup>Abreviaturas Controle (CT), metionina protegida com revestimento pH sensível (MET\_pH), metionina protegida com revestimento de etil-celulose (MET\_etil).

<sup>2</sup>Comparação entre as duas metioninas MET\_pH e MET\_etil agrupadas (MET) vs. controle.

<sup>3</sup>Produção de leite corrigida para 4% de gordura =  $[(0,4 + 15 \times \% \text{gordura}/100) \times \text{kg de leite}]$

<sup>4</sup>Produção de leite corrigida para energia =  $[(0,327 \times \text{produção de leite}) + (12,95 \times \text{produção de gordura}) + (7,20 \times \text{kg de proteína})]$

<sup>5</sup>Energia do leite =  $[(0,0929 \times \% \text{gordura}) + (0,0547 \times \% \text{proteína}) + (0,0395 \times \% \text{lactose})]$

<sup>6</sup>Escore Linear de CCS (Contagem de células somáticas) é obtido através da fórmula  $EL = [\text{Log}_2 (\text{CCS}/100.000)] + 3$ .

Vacas suplementadas com metionina (MET\_pH e MET\_etil) produziram 2,48 kg/d de leite a mais ( $p < 0,01$ ) do que vacas não suplementadas. Entretanto, não houve diferença ( $p = 0,62$ ) entre os MET\_pH e MET\_etil.

### 2.3.2 Composição do leite

Através da comparação entre os tratamentos, observou-se diferenças ( $p < 0,01$ ) nos seguintes componentes: produção de gordura, teor e produção de proteína, teor e produção de caseína, produção de lactose e produção de sólidos totais. Todas estas diferenças ocorreram a favor dos grupos metionina (MET\_pH e MET\_etil), que superaram o grupo CT para essas variáveis.

Não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) para teores de gordura, lactose e sólidos totais, quando comparamos os 3 tratamentos. Porém, teor de sólidos apresentou diferença ( $p = 0,05$ ) quando os grupos suplementados com metionina foram comparados com o grupo controle, como ilustrado na Tabela 3. Comparando as duas fontes comerciais de metionina protegida, não houve diferença entre MET\_pH e MET\_etil em nenhum componente do leite no experimento conduzido.

### 2.3.3 Metabólitos sanguíneos

Em relação as análises dos metabólitos sanguíneos, que pode ser visualizado na Tabela 4, houve diferença entre os tratamentos MET\_pH e MET\_etil nos metabólitos ureia, glicose e proteína total, assim como os tratamentos metioninas em relação ao grupo CT.

Vacas do tratamento MET\_etil apresentaram menores concentrações de ureia ( $p < 0,01$ ), e maiores concentrações de glicose ( $p < 0,01$ ) em comparação aos outros tratamentos. Em relação a proteína plasmática total, o tratamento MET\_etil foi igual ao CT, porém ambos foram maiores que o grupo MET\_pH. Já para os metabólitos colesterol, albumina e globulina, não foram observadas diferenças, tanto entre metioninas, quanto entre os tratamentos.

Tabela 4. Efeito na concentração de metabólitos sanguíneos das vacas suplementadas com metionina protegida com revestimento sensível ao pH e metionina protegida com revestimento de etil-celulose (MET\_pH e MET\_etil) ou não suplementadas (CT).

Variável	Tratamento <sup>1</sup>			EPM	Valor <i>P</i>		
	CT	MET_pH	MET_etil		Trat.	MET_pH vs. MET_etil	CT x MET <sup>2</sup>
Ureia, mg/dL	36,29	24,57	22,48	6,76	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Colesterol, mg/dL	208,99	202,07	199,95	0,86	0,68	0,96	0,41
Glicose, mg/dL	64,58	64,81	70,75	2,58	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Proteína total, g/dL	7,53	7,01	7,33	0,08	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Albumina, g/dL	3,63	3,65	3,60	0,03	0,42	0,39	0,90
Globulina, g/dL	3,87	3,49	3,68	0,19	0,42	0,67	0,32

<sup>1</sup>Abreviaturas Controle (CT), metionina protegida com revestimento pH sensível (MET\_pH), metionina protegida com revestimento de etil-celulose (MET\_etil).

<sup>2</sup>Comparação entre as duas metioninas MET\_pH e MET\_etil agrupadas (MET) vs. CT. Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

#### 2.3.4 Peso e ECC

Dados de peso corporal e ECC foram coletados em dois momentos do experimento, antes das vacas iniciarem a suplementação e no último dia de suplementação. As mudanças dessas variáveis estão demonstradas na Tabela 5. Os animais apresentaram diferenças ( $p < 0,03$ ) no ECC antes da suplementação, quando comparados os 3 tratamentos. Além disso, o grupo MET\_etil diferiu ( $p < 0,01$ ) dos grupos MET\_pH e CT, já que vacas suplementadas com MP ganharam pontuação de ECC após 30 dias. Entretanto, a mudança de ECC não foi acompanhada ( $p > 0,05$ ) por mudança no peso corporal.

Tabela 5. Médias ajustadas de peso e ECC inicial (P1), média peso e ECC final (P2) e mudança dessas variáveis ao longo do experimento.

Variável	Tratamento <sup>1</sup>			EPM	Valor <i>P</i>	
	CT	MET_pH	MET_etil		Trat.	MET_pH vs. MET_etil
Peso 1	743,1	730,0	726,1	6,62	0,29	0,57
Peso 2	737,6	731,6	727,0	6,68	0,58	0,52
Mudança Peso <sup>2</sup>	-1,30	1,60	4,70	2,99	0,40	0,33
ECC 1	3,15	3,22	3,09	0,044	0,03	0,01
ECC 2	3,07	3,11	3,17	0,046	0,31	0,27
Mudança ECC <sup>2</sup>	-0,08	-0,10	0,07	0,027	<0,01	<0,01

<sup>1</sup>Abreviaturas: Controle (CT), metionina protegida com revestimento pH sensível (MET\_pH), metionina protegida com revestimento de etil-celulose (MET\_etil).

<sup>2</sup>Mudança das variáveis peso e ECC, obtidas a partir da diferença do valor final em relação ao valor inicial.

## 2.4 DISCUSSÃO

O objetivo deste experimento foi comparar dois diferentes produtos comerciais de MPR para vacas em lactação, avaliando seus efeitos na produção, composição do leite e metabolismo. De maneira geral, o desempenho em produção e na maior parte dos sólidos do leite, não diferiram entre os tratamentos MET\_pH e MET\_etil, em contrapartida diferiu em relação às vacas do grupo controle, o que confirma a hipótese inicial.

Alguns estudos mostraram efeito da suplementação da metionina com incremento de produção de leite em vacas em lactação. Swanepoel et al. (2020) suplementaram aproximadamente 7,9 g de MPR (Smartamine) na dieta de vacas com DEL médio de 160 dias, e relataram aumento na produção de leite e na proteína do leite. Assim como, Chiogna et al. (2021) suplementaram 23 g de MPR (Smartamine) em vacas lactantes próximo ao pico de lactação ( $65 \pm 28$  dias) e também observaram aumento na produção de leite. Porém, a meta-análise de Zanton et al. (2014) não observou incrementos em produção de leite.

Assume-se que o aumento de MPR, em quantidades adequadas, favorece os valores de proteína metabolizável e o balanço de aminoácidos no organismo, e dessa forma,

pode beneficiar a produção de leite (NRC, 2001). Entretanto, as razões específicas para a heterogeneidade nas respostas em produção de leite não são totalmente compreendidas.

O aumento da eficiência no uso de aminoácidos absorvidos pela glândula mamária, pode favorecer a produção de lactose e proteína no leite, componentes do leite altamente correlacionados com a produção de leite. Além disso, o volume do leite é em grande parte influenciado pela quantidade de lactose, dissacarídeo formado principalmente a partir de glicose na glândula mamária, muitas vezes proveniente da gliconeogênese no fígado. Como a metionina é um aminoácido glicogênico, acredita-se que ele seja capaz de aumentar a quantidade de leite, através da intensificação da gliconeogênese (Aschenbach et al., 2010), embora reconheça-se que a contribuição de aminoácidos essenciais, como a metionina, é baixa para a produção de glicose (Larsen & Kristensen, 2013).

Outra hipótese, ainda não muito bem elucidada pelos pesquisadores, seria o aumento na produção de leite pelos efeitos da metionina na metilação do DNA, promovendo processos epigenéticos, como silenciamento na expressão de genes, ou alterações moleculares em mecanismos relacionados a produção de leite (Singh et al., 2012).

Em relação aos dois produtos comerciais de metionina, estudo de Benefield et al. (2010) não observou diferença em produção de leite ao comparar os produtos MET\_pH e MET\_etil, ao testar doses de 6 e 12 g de ambos os produtos, em vacas suplementadas individualmente em tie-stall, produzindo  $42,2 \pm 2,7$  kg/d de leite e DEL de  $139 \pm 16$  dias. Zang et al. (2017) também não encontraram diferenças em produção de leite entre os produtos, porém observaram maior concentração de metionina na circulação em vacas MET\_pH, ao comparar com MET\_etil e outra fonte comercial de metionina.

Em relação a composição do leite, Chiogna et al. (2021) relataram aumento do teor e da produção de gordura em vacas produzindo  $39.1 \pm 6.8$  kg/d de leite suplementadas com

23 gramas de MET\_pH durante a lactação ( $65 \pm 28$  DEL), em relação ao grupo controle. No entanto, em uma meta-análise (Patton, 2010), proveniente da avaliação de 35 estudos referentes a suplementação de metionina com MET\_pH e MET\_etil, houve decréscimo do teor de gordura em vacas suplementadas com MET\_pH e MET\_etil, provavelmente porque foi observado aumento na produção de leite e proteína em vacas suplementadas com MET\_etil, em relação as vacas MET\_pH.

Meta-análise de Zanton et al. (2014) compararam os tratamentos MET\_pH, MET\_etil, CT e mais uma fonte de metionina comercial, e observaram aumento em teor e produção de proteína em vacas suplementas com MET\_pH e MET\_etil. E assim como o presente estudo, não houve diferença em gordura e proteína entre as duas fontes de metionina. Este resultado também condiz com o estudo de Blum et al. (1999), que suplementaram vacas com MET\_pH e MET\_etil e ao compará-las, não observaram diferenças em produção, gordura, proteína, lactose e CCS.

Uma explicação para o aumento da gordura no leite seria a doação de grupos metil pela S-adenosilmetionina (SAM) para a produção de fosfatidilcolina, principal fosfolípido componente da VLDL, e dessa maneira transportar lipídios do fígado para a circulação e consequentemente para a glândula mamária (Martinov et al., 2010; Zom et al., 2011).

Metionina e colina atuam tanto na formação do VLDL, quanto na produção de carnitina, envolvida na entrada de acil-CoA no interior da mitocôndria (Sun et al., 2016). Entretanto, estudos mais recentes afirmam que essa teoria só é válida na ausência de precursores do VLDL, como por exemplo em vacas no pós-parto imediato, em razão do efeito limitado da metionina sobre essa lipoproteína nos hepatócitos (Chandler e White, 2017). Outra teoria, não muito bem compreendida pelos pesquisadores, seria a regulação de genes

lipogênicos e alteração na expressão do RNA responsável pelo equilíbrio lipídico (Li et al., 2016).

Grande parte dos estudos com suplementação de metionina observou acréscimo na proteína do leite. Patton (2010) encontrou acréscimos +0,07% no teor e +0,27 kg/d na produção de proteína do leite em vacas suplementadas com MET\_pH e MET\_etil, em relação aos animais não suplementados. De forma similar, Chiogna et al. (2021) também constataram aumento nessas duas variáveis, além de incremento no teor de caseína em vacas suplementadas com MET\_pH até a 10<sup>a</sup> semana após o parto. Estudo suplementando vacas com MET\_etil mostrou aumento apenas nas produções de leite e de proteína, quando comparado com controle (Lara et al., 2006). Zang et al. (2017) observaram aumento na produção de proteína em vacas suplementadas com MET\_pH em relação ao grupo MET\_etil, controle e outra fonte comercial de metionina, enquanto que os teores de proteína, gordura e lactose não diferiram entre os tratamentos.

Socha et al. (2005) e Wang et al. (2010) sugeriram que o aumento na disponibilidade de metionina pode afetar positivamente a síntese e a eficiência de outros aminoácidos que serão absorvidos na glândula mamária e convertidos em componentes do leite. Além disso, o aminoácido metionina sinaliza à mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), proteína quinase que além de atuar no metabolismo lipídico, é principalmente responsável pela síntese proteica (Appuhamy et al., 2012). Esse mesmo mecanismo também pode explicar o aumento de caseína, devido esta representar 80% da proteína no leite (Nan et al., 2014).

Em relação aos metabólitos sanguíneos, poucos estudos comparam os efeitos de MET\_pH e MET\_etil no sangue. Mas Sun et al. (2016) suplementaram 15 g de MP em vacas no período de transição, e relataram os resultados similares ao presente estudo; menores

concentrações de ureia e maiores de glicose no sangue de vacas suplementadas com MET\_etil, comparadas ao grupo controle.

Diferente dos outros mamíferos, os ruminantes obtêm boa parte da sua glicose através da gliconeogênese no fígado, e usam como substrato propionato, lactato, glicerol e aminoácidos glicogênicos. O tecido hepático mais saudável, com baixa exigência na mobilização de lipídeos, pode promover uma gliconeogênese mais eficiente e aumentar a glicemia (Goselink et al., 2013). Já que existe uma alta demanda por glicose para produção de lactose e posterior produção de leite, as vacas suplementadas com MPR podem produzir mais leite. Porém, tanto MET\_etil quanto MET\_pH apresentaram aumento no leite em relação ao grupo controle, sem distinção entre os produtos, mas somente MP apresentou maiores concentrações de glicose no sangue. Já as concentrações séricas mais altas de proteína total podem ser justificadas pelo melhor balanço de aminoácidos e a síntese proteica estimulada pela suplementação de MPR.

Os níveis de nitrogênio ureico no plasma (NUP) refletem a eficiência de utilização do nitrogênio no organismo animal. Quantidades altas de NUP podem indicar excesso de proteína na dieta, ou ineficiência na utilização dessas moléculas. Quando ocorre adição de metionina protegida na dieta, as concentrações de metionina plásmatica podem aumentar e favorecer a utilização dos aminoácidos para a síntese de proteínas, e como consequência aumentos na proteína e caseína do leite (Muscher et al., 2010).

Como foi demonstrado no experimento realizado, vacas suplementadas com MET\_etil tiveram menor NUP, resultado muito semelhante ao estudo de Blum et al (1999), que comparou vacas MET\_pH e MET\_etil, e também encontrou menor concentração de NUP em vacas MET\_etil.

Chiogna et al. (2021) encontraram uma tendência das vacas controle ganharem mais peso em relação às vacas suplementadas com MET\_pH, com aproximadamente  $65 \pm 28$  DEL. Em outro estudo, Lara et al. (2006) avaliando vacas suplementadas com MET\_etil, não relataram diferenças significativas em peso e ECC das vacas após a suplementação. Ainda, Patton (2010) e Blum et al. (1999) não encontraram diferenças em peso e ECC entre as vacas suplementadas com MET\_etil e MET\_pH.

## **2.5 CONCLUSÕES**

Conclui-se que a suplementação de ambas as fontes de metionina protegida da degradação ruminal interferiu positivamente na produção e em grande parte dos componentes do leite; produção de gordura, teor e produção de proteína, teor e produção de caseína, produção de lactose e produção de sólidos totais. Entretanto, não foram observadas diferenças produtivas comparando-se MET\_pH e MET\_etil. No que concerne aos parâmetros sanguíneos, MET\_etil apresentou superioridade nas variáveis glicose, proteína total e ureia em relação ao tratamento MET\_pH, o que indica uma alteração no metabolismo proteico e energético.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à CAPES e ao PPGZ-UFPR pela concessão da bolsa de auxílio e à Cooperativa Frísia pelo suporte financeiro. Em especial aos técnicos da Cooperativa pela parceria na realização deste projeto, e à equipe da Fazenda Frísia por todo o suporte para condução do experimento. Ao técnico Olair que conduziu as análises de sangue no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR e à técnica Cleuza que conduziu as análises bromatológicas dos alimentos no Laboratório de Bromatologia da Universidade Federal do Paraná.

## 2.6 REFERÊNCIAS

- AOAC International. 2016. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Arlington, VA.
- ANUÁRIO Leite 2023: leite baixo carbono. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023.
- APPUHAMY, J. R. N. et al. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *The Journal of nutrition*, v. 142, n. 3, p. 484-491, 2012.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, v. 62, n. 12, p. 869–877, 2010.
- BENEFIELD, B. C. et al. Evaluation of rumen-protected methionine sources and period length on performance of lactating dairy cows within Latin squares. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 4448–4455, 2009.
- BLUM, J. W.; BRUCKMAIER, R. M.; JANS, F. Rumen-protected methionine fed to dairy cows: Bioavailability and effects on plasma amino acid pattern and plasma metabolite and insulin concentrations. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1991–1998, 1999.
- BOX, G., and COX, D. An analysis of transformations. *Journal Royal Stat. Soc. B.* v.26, p.211-243, 1964.
- CHANDLER, T. L.; WHITE, H. M. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. *PLoS One*, v. 12, 2017.
- CHIOGNA, V. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLoS One*, v. 16, 2021.
- EDMONSON, A. J. et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 68–78, 1989.
- GOSELINK, R. M. A. et al. Efeito da suplementação de colina protegida no rúmen na expressão gênica do fígado e do tecido adiposo durante o período de transição em vacas leiteiras. *Jornal de Ciência Leiteira*, 2013.
- LARA, A. et al. Produção de leite em vacas Holandesas suplementadas com diferentes níveis de metionina protegida no rúmen. *Livestock Science*, v. 105, p. 105–108, 2006.
- LARSEN, M.; KRISTENSEN, N. B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*, v. 7, p. 1640–1650, 2013.
- LI, Y. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on production performance, apparent digestibility, blood parameters, and ruminal fermentation of lactating Holstein dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 981757, 2022.

- MARTINOV, M. V. et al. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1804, p. 89–96, 2010.
- NASEM, 2021. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- OSORIO, J. S. et al. Supplemental smartamine m or metasmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6248–6263, 2013.
- PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2105–2118, 2010.
- PIEPHO, H. P. Data transformation in statistical analysis of field trials with changing treatment variance. *Agronomy Journal*, v.101, p.865-869, 2009.
- SINGH, K. et al. Epigenetics: A possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. *Animal*, v. 6, p. 375–381, 2012.
- SOCHA, M. T. et al. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1113–1126, 2005
- SÜDEKUM, K. H. et al. Bioavailability of three ruminally protected methionine sources in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, v. 113, p. 17-25, 2004.
- SUN, F. et al. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS One*, v. 11, 2016.
- SWANEPOEL, N. Estimating amino acid limitations in California dairy rations and the effect of feeding a ruminally protected lysine supplement on animal performance. 2009. Tese (Mestrado em Nutrição Animal) - Faculdade de Ciências Naturais e Agrícolas, Universidade de Pretória, Pretória.
- VAN SOEST, P. J. et al. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3583–3597, 1991.
- WANG, C. et al. Efeitos da suplementação dietética de metionina e lisina na produção de leite e na utilização de nitrogênio em vacas leiteiras. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 3661–3670, 2010.
- ZANG, Y. et al. Comparative effects of multiple sources of rumen-protected methionine on milk production and serum amino acid levels in mid-lactation dairy cows. *Professional Animal Scientist*, v. 33, p. 692–699, 2017.

ZANTON, G. I. et al. Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 7085–7101, 2014.

ZOM, R. L. G. et al. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 4016–4027, 2011.

### **3 CAPÍTULO III. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE PARA VACAS NO PRÉ-PARTO E SEU IMPACTO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO, SAÚDE E METABOLISMO**

#### **SUMÁRIO INTERPRETATIVO**

**Efeitos da suplementação de metionina protegida ruminalmente para vacas no pré-parto e seu impacto na produção, composição do leite, saúde e metabolismo.** *Por Viana et al.* A suplementação de 15 g de metionina protegida ruminalmente (MPR) aumentou os teores de proteína e caseína e diminuiu o nitrogênio ureico no leite. Em relação a produção de leite, não houve diferença estatística entre os tratamentos nas múltiparas. Entretanto, primíparas do grupo controle produziram mais leite na produção acumulada nos primeiros 60 dias de DEL, enquanto que novilhas controle produziram mais leite aos 60 dias de DEL. Mas não foram encontradas diferenças em PLCE, PLC4% e energia do leite entre os tratamentos.

#### **CABEÇALHO**

##### **EFEITOS DA METIONINA PROTEGIDA PARA VACAS LEITEIRAS NO PRÉ-PARTO**

**Efeitos da suplementação de metionina protegida ruminalmente para vacas no pré-parto e seu impacto sobre o desempenho produtivo, saúde e metabolismo**

N. P. G. Viana<sup>1</sup>; L. C. Obialeski<sup>1</sup>; M. Bugoni<sup>1</sup>; C. G. Cordeiro<sup>2</sup>; T. L. Resende<sup>3</sup>; R. Almeida<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Agropecuária Regia, Palmeira, PR, Brasil

<sup>3</sup>Evonik Brasil, São Paulo, SP, Brasil

\*Autor para correspondência: R. Almeida. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: ralmeida@ufpr.br

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação pré-parto de metionina protegida ruminalmente (MPR) na produção e composição do leite, peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC),  $\beta$ -hidroxibutirato, glicose e incidência de doenças no início da lactação. Um total de 214 animais da raça Holandesa de um rebanho comercial no estado do Paraná, no sul do Brasil, foram blocadas com base na paridade (84 novilhas, 76 primíparas e 54 múltiparas), data esperada de parto e produção de leite na lactação anterior para múltiparas. Em um delineamento de blocos ao acaso, o tratamento consistiu na suplementação diária de 15 g de MPR (Mepron®, Evonik Industries, Alemanha) misturada com 85 g de milho grão moído, fornecido de maneira top-dressed a partir de  $26 \pm 4$  dias antes do parto, enquanto os animais controle (CT) receberam 100 g de milho grão moído. Ambos os grupos receberam 9,8 g de MPR pós-parto. Os dados foram analisados através do procedimento MIXED do SAS contendo os efeitos fixos do tratamento, tempo, paridade e suas interações, e os efeitos aleatórios de bloco e vaca dentro do tratamento. O PC e ECC das vacas foram avaliados 30 dias antes do parto, no parto e 21 dias pós-parto. O PC e ECC não foram afetados ( $P > 0,05$ ) pela suplementação pré-parto de MPR. Da mesma forma, a suplementação pré-parto de MPR não afetou ( $P > 0,05$ ) o peso ao nascer do bezerro, a concentração de IgG no colostro e o valor de Brix. As vacas suplementadas com MPR antes do parto também não mostraram diferenças nas concentrações sanguíneas de  $\beta$ -hidroxibutirato em relação aos animais CT no D+3 (0,62 vs. 0,65 mmol/L;  $P = 0,64$ ), D+7 (0,68 vs. 0,77 mmol/L;  $P = 0,13$ ) e D+14 (0,64 vs. 0,75 mmol/L;  $P = 0,23$ ), e glicose no D+7 (47,07 vs. 45,88 mg/dL;  $P = 0,29$ ). Foi encontrada diferença na produção de leite de 1 a 30 de DEL, entre os tratamentos (39,03 vs. 41,11 kg/dia, respectivamente para MPR e CT;  $P < 0,01$ ), com interação ( $P < 0,01$ ) entre tratamento e paridade. Não foram detectadas diferenças na produção de leite para novilhas (31,18 vs. 33,15 kg/dia;  $P = 0,13$ ) e múltiparas (46,22 vs. 43,88 kg/dia;  $P = 0,57$ ), mas foi encontrada para primíparas (39,69 vs. 46,30 kg/dia;  $P < 0,01$ ). Mas não foram observadas diferenças para ECM, FCM e energia do leite. Em relação à composição do leite, os animais suplementados com MPR pré-parto mostraram maior teor de proteína total do leite (3,84 vs. 3,71%;  $P < 0,01$ ), maior teor de caseína do leite (3,07 vs. 2,96%;  $P < 0,01$ ) e menor teor de nitrogênio ureico do leite (18,29 vs. 19,06;  $P = 0,02$ ). Não foram detectadas diferenças ( $P > 0,05$ ) para os demais componentes do leite. Concluiu-se que a suplementação com MPR durante o período pré-parto aumentou os teores de proteína e caseína do leite, mas inesperadamente com uma diminuição na produção de leite para os animais mais jovens.

Palavras-chave: aminoácido, proteína do leite, período de transição.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O período de transição consiste em uma fase desafiadora para as vacas leiteiras, devido as diversas alterações metabólicas e fisiológicas, durante as três semanas anteriores e as três semanas seguintes ao parto. Nessa fase ocorre uma diminuição no consumo de matéria seca (CMS), concomitante a um aumento das exigências nutricionais e o comprometimento do sistema imune, o que predispõe a manifestação de distúrbios metabólicos (Drackley, 1999; Cupertino et al., 2011).

Na tentativa de minimizar o impacto dos eventos metabólicos do pós-parto e permitir melhor desempenho das vacas durante toda a lactação, a suplementação da MPR é uma alternativa nutricional que está ganhando popularidade, principalmente nos rebanhos mais produtivos e localizados em regiões que adotam sistemas de pagamento de leite por qualidade.

Um dos efeitos “funcionais” da metionina é a ativação da S-adenosilmetionina (SAM), um doador de grupo metil, que promove a metilação do DNA (Osorio et al., 2013), e conseqüentemente a expressão de genes relacionados a produção e proteína do leite (Singh et al., 2011; Chiogna et al., 2021). Além disso, contribuem na formação de VLDL e carnitina, que atuam no transporte e metabolismo de lipídeos (Sun et al., 2016) e na produção de antioxidantes (Chandler e White, 2017).

Entretanto, grande parte dos estudos que suplementam a MPR no pré e no pós-parto ou apenas no pós-parto (Batistel et al., 2018; Toledo et al., 2023), mas poucos estudos avaliaram a real necessidade da suplementação no pré-parto (Lee et al., 2019; Kudrna et al., 2009) e os impactos que a adição ou não de MPR no pré-parto pode causar no pós-parto e seus efeitos no desempenho do animal no início da lactação.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da metionina protegida ruminalmente em vacas no pré-parto sobre produção e composição de leite, saúde e

metabolismo. Embora já exista um consenso na literatura que vacas leiteiras de alta produção sejam beneficiadas pela suplementação de metionina no pós-parto, ainda não é coeso quanto aos benefícios da suplementação de metionina no pré-parto. Desta forma, a hipótese do presente trabalho é que vacas leiteiras de alta produção se beneficiam da suplementação de metionina no pré-parto, favorecendo a produção e composição do leite e diminuindo a ocorrência de enfermidades.

### **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo número 035/2023).

#### **3.2.1 Delineamento experimental e tratamentos**

O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados. Data prevista do parto, ordem de parição (nulíparas, primíparas e múltíparas) e produção de leite na lactação anterior (primíparas e múltíparas) foram usadas como critérios de blocagem e na cováriável. Os animais dentro de cada bloco os animais foram aleatoriamente distribuídos nos tratamentos: Controle (CT) e MP (Mepron M85<sup>®</sup>; Evonik Industrias, Alemanha), totalizando 224 animais, 112 em cada grupo. Já no pós-parto, ambos os grupos receberam suplementação dietética com MPR.

#### **3.2.2 Vacas, alojamento e dieta**

O experimento foi conduzido em rebanho comercial localizado em Palmeira, região centro-oriental do Estado do Paraná, Sul do Brasil, no período de agosto a dezembro de 2023. Um total de 91 novilhas, 76 primíparas e 57 múltíparas da raça Holandesa, prenhas

com aproximadamente 250 dias de gestação, foram incluídas no estudo. Primíparas apresentaram produção média na lactação anterior de  $37,2 \pm 3,7$  kg/d, enquanto que as multíparas, com duas ou mais lactações, produziram em média  $41,9 \pm 3,9$  kg/d.

Antes das vacas serem transferidas para o estábulo pré-parto, as vacas secas estavam acomodadas em sistema free-stall com ventilação, e alimentadas *ad libitum* com dieta total misturada (TMR), fornecida duas vezes ao dia. Semanalmente os animais eram transferidos ao lote pré-parto, quando os animais estavam com aproximadamente 250 dias de gestação, 25 a 30 dias antes de parir. O lote pré-parto era alojado em um *compost barn*, com espaçamento de cocho de 0,70 cm, com camas de serragem e ventiladores, em lotação de 10 a 12m<sup>2</sup> com alimentação *ad libitum* em TMR, divididos em dois lotes (CT e MP), onde os animais permaneceram por  $26,1 \pm 3,2$  dias.

Os 112 animais do grupo tratamento receberam 15 g do produto Mepron (dosagem indicada pelo fabricante), misturados com 85 g de milho grão moído, na intenção de não limitar o consumo, devido ao sabor adstringente da metionina. Já os 112 animais do grupo controle receberam apenas quantidade equivalente de milho grão moído (100 g/vaca/dia). Esse fornecimento era feito uma vez ao dia, até o momento do parto, *top-dressed*, durante a colocação da TMR no cocho, com vagão misturador que fornecia a mesma dieta para os 2 tratamentos, em um único período, às 10h00.

Após o parto, os animais foram direcionados para instalação do tipo free-stall, onde ambos os grupos permaneceram com a mesma dieta. O estábulo possuía em média 90% de lotação, com ventilação e camas de areia, e espaçamento de cocho de 1,10cm. A alimentação era *ad libitum* em TMR, oferecida duas vezes ao dia (11h00 e 16h00), com a inclusão da metionina Mepron, na inclusão de 9,8 g/vaca/dia. Em média, esses animais permaneceram neste lote por  $18,6 \pm 2,9$  dias, até a mudança para os lotes de alta produção,

onde também recebiam dieta com MPR, na dosagem de 9,1 g/vaca/dia. Diferentemente do pré-parto, essa dieta com adição de MPR (MET\_etil) no pós-parto era comumente utilizada pela fazenda antes da realização do experimento. Vacas no lote pós-parto eram ordenhadas três vezes ao dia (03h00, 10h00 e 18h00). As vacas recém-paridas utilizavam a ordenha acessória tipo espinha-de-peixe durante 2 dias, a fim de eliminar o risco de resíduo de antibiótico feito na secagem, enquanto que as novilhas já eram encaminhadas a ordenha em sistema de carrossel.

A dieta fornecida às vacas era igual para os dois tratamentos no pré-parto, com exceção da suplementação de MPR no tratamento MP. Os alimentos das dietas do pré e do pós-parto, e suas proporções na MS podem ser visualizadas na Tabela 6. Os valores da composição bromatológica dos alimentos utilizados nas dietas estão representados na Tabela 7.

Tabela 6. Ingredientes e nível de inclusão (%MS) da dieta dos animais dos grupos Controle e Mepron no pré e no pós-parto.

Ingredientes (%MS)	Pré-parto		Pós-parto
	Controle	Mepron	
Silagem de milho	76,87	76,86	35,04
Silagem pré-secada de azevém	--	--	3,84
Silagem pré-secada de alfafa	--	--	4,52
Palha de trigo	4,57	4,57	--
Casca de soja	--	--	4,76
Milho grão moído	0,68	0,58	20,56
Caroço de algodão	--	--	6,08
Farelo de soja 46%	15,5	15,5	17,66
Resíduo de cervejaria, 28% PB	--	--	4,40
Metionina Mepron <sup>1</sup>	--	0,12	0,04
Núcleo mineral-vitamínico lactação <sup>2</sup>	--	--	3,05
Núcleo micromineral e vitamínico <sup>3</sup>	2,35	2,35	--

<sup>1</sup> Mepron® (Evonik Industria, Alemanha).

<sup>2</sup> Contém por kg: 140 g Ca, 17 g P, 6 g S, 54 g Mg, 300 g K, 115 g Na, 11 mg Co, 400 mg Cu, 16 mg Cr, 16 mg I, 1.120 mg Mn, 14 mg Se, 2.200 mg Zn, 160.000 UI Vit A, 57.600 UI

Vit D3, 960 UI Vit E, 64 mg biotina, 21 g bentonita  $2,5 \times 10^9$  UFC *Eubacterium sp.*, 30 U/g *Fumonisina esterase*,  $6,0 \times 10^8$  UFC/g *Trichosporon mycotoxinivorans*.

<sup>3</sup>Contém por kg: 130 g Ca, 30 g P, 90 g S, 20 g Mg, 31 g Na, 130 g Cl, 12 mg Co, 600 mg Cu, 30 mg Cr, 600 mg Fe, 60 mg I, 1.600 mg Mn, 16 mg Se, 2.400 mg Zn, 480.000UI Vit A, 200.000 UI Vit B3, 12.000 UI Vit E, 80 mg biotina,  $1,5 \times 10^9$  UFC *Saccharomyces cerevisiae*, 500 mg monensina.

Segundo o NRC (2001), os níveis adequados dos aminoácidos lisina e metionina devem manter uma relação 3,0:1. Usando a versão mais recente (v.3.3.77) do software RLM Leite (Ração de Lucro Máximo), o qual se baseia no NRC (2001), as concentrações estimadas de Lys e Met foram 7,35 e 1,94% na proteína metabolizável, respectivamente, na dieta pré-parto do grupo controle. Já na dieta do grupo MET\_etil, os valores estimados ficaram em 7,35 e 2,45%, gerando uma relação Lys:Met na proteína metabolizável de 3:1. Já no pós-parto, as concentrações foram de 6,49 e 2,03%, evidenciando que a inclusão de Met adotada no pós-parto muito provavelmente era insuficiente.

Tabela 7. Composição das dietas no pré-parto dos tratamentos Controle e MP e da dieta no pós-parto.

Item	Pré-parto		Pós-parto
	CT	MP	
Composição química da dieta, <sup>1</sup> %MS			
EL <sub>L</sub> , Mcal/kg	1,62	1,62	1,62
ED <sup>2</sup> , Mcal/kg	3,08	3,08	3,28
PB, %	12,48	12,54	16,19
MS, %	38,99	38,71	44,23
FDN, %	37,67	37,32	32,40
FDA, %	19,29	19,8	15,5
FDA/FDN proporção	0,51	0,53	0,48
FDN, forragem	32,99	33,00	17,37
Amido	26,26	26,2	17,37
RM, %	4,90	4,90	6,02
EE, %	2,97	2,97	4,23
CNF <sup>3</sup> , %	45,01	44,96	42,92
PM <sup>4</sup>	3,11	3,16	5,16
PNDR <sup>4</sup>	3,75	3,81	6,31
PDR <sup>4</sup>	8,73	8,73	11,03

MOR <sup>4</sup>	18,75	18,76	25,55
Ca, %	2,68	2,68	4,52
P, %	0,97	0,97	0,88
Na, %	0,77	0,77	3,55
K, %	1,00	1,00	10,22
Fornecimento e balanço da proteína prevista, <sup>4</sup> g/d			
PM fornecida	1,153	1,159	2,512
PM da proteína microbiana	703,6	703,0	1,234
PM da PNDR	390,2	396,4	1,170
PM balanço	345	350	-567
Balanço de lisina e metionina, <sup>4</sup> g/d			
DLys oferecidos na dieta	76	76	187
DMet oferecidos na dieta	23	34	70
DMet oriunda do respectivo produto	-	9,15	5,50
Variável produção de leite prevista			
Produção de leite presumida para EL, kg/d	-	-	24,74
Produção de leite presumida pela PM, kg/d	-	-	30,68
Produção de leite presumida, kg/d	-	-	40,90

<sup>1</sup> Calculado a partir da composição analisada da amostra de TMR,

<sup>2</sup> Energia digestível.

<sup>3</sup> Calculado da seguinte forma:  $CNF = 100 - (PB + EE + (FDN - PIDN) + Cinzas)$ .

<sup>4</sup> Dados calculados com base no CMS observado, produção de leite, composição do leite e ECC usando RLM. PM = proteína metabolizável; PNDR = proteína não degradável no rúmen; PDR = proteína degradável no rúmen; DLys = lisina digestível; DMet = metionina digestível.

<sup>4</sup> MOR = matéria orgânica residual (CNF – amido).

A temperatura ambiente e a umidade no interior do barracão foram medidas em intervalos de 1 hora (GFX Data Logger Series and EL USB-TC; Lascar Electronics Inc., USA), e a extração dos dados através do Software EasyLog (EasyLog USB; Lascar Electronics Inc., USA). Esse aparelho permaneceu pendente na altura das vacas, mas longe do alcance dos animais, no meio dos dois lotes pré-parto. A utilização do Data Logger possui o objetivo de mensurar a temperatura e a umidade relativa do ambiente, na tentativa de indicar algum grau de estresse calórico nos animais.

O Índice de Temperatura-Umididade (ITU) foi calculado de acordo com Yousef (1985), através da fórmula  $THI = T + 0,36 \times SD + 41,2$ ; onde T = temperatura (°C) e SD = ponto de

orvalho (°C), relatado na Figura 3, 4, 5 e 6, correspondentes ao mês de agosto, setembro, outubro e novembro.

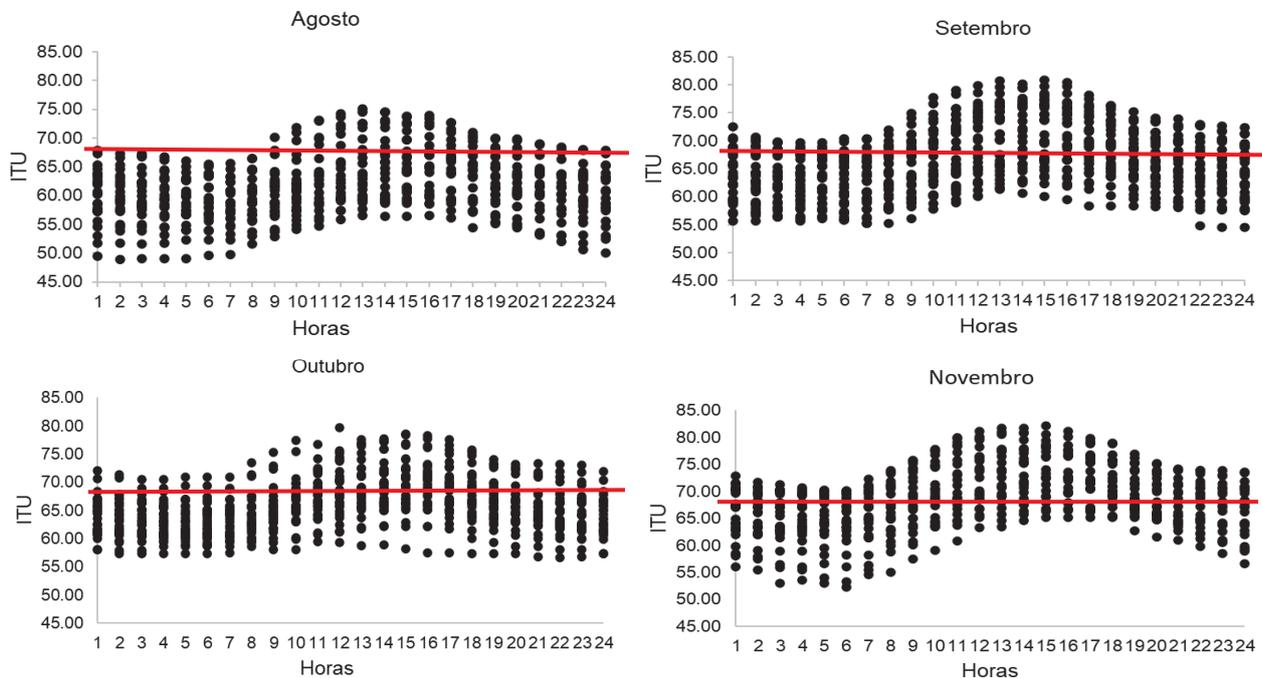


Figura 2, 3, 4 e 5. . Índice de Temperatura e Umidade (ITU) dentro do barracão pré-parto nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro, com 2581 gravações em intervalos de 1 hora. ITU:  $64,7 \pm 4,52$  (média  $\pm$  DP). Proporção THI > 68: 14,6% das mensurações. Temperatura:  $18,7 \pm 4,7^\circ\text{C}$ . Umidade:  $77,6 \pm 11,32\%$ .

### 3.2.3 Manejo durante o parto e bezerras

Novilhas que adiantaram o parto em demasia e apresentaram menos de 15 dias de suplementação dos tratamentos foram excluídas do experimento, enquanto que as vacas eram excluídas do experimento se o período de suplementação fosse inferior a 20 dias. Isso devido ao número maior de novilhas entrando no lote pré-parto, em comparação a primíparas e multíparas, na tentativa de conseguir animais com mais tempo de suplementação no pré-parto.

Quando os primeiros sinais de parto começavam a aparecer, a equipe de manejo da fazenda realizava a separação do animal para a baia maternidade, localizada dentro do lote

pré-parto, com cama de palha e cepilho, e era feita intervenção apenas se houvesse complicações no parto, e oferecido uma solução de eletrólitos de consumo voluntário (Nutridrench Salus Avril Group, Santo Antônio de Posse, SP), apenas em casos de vacas com complicações no parto. Após o nascimento da bezerra, o primeiro manejo realizado era a contenção da vaca no canzil da própria baia maternidade e era realizada a ordenha do colostro. Em seguida, era mensurado a qualidade do colostro através do refratômetro portátil de Brix (Agatige, RZ120). Se o colostro fosse de boa qualidade ( $\geq 25\%$ ), este era oferecido para a bezerra recém-nascida; do contrário, era descongelado do banco de colostro da fazenda.

Os recém-nascidos eram alimentados com 4 litros de colostro logo após o nascimento, através de uma sonda esofágica, e após 6 horas, eram oferecidos mais 4 litros na mamadeira. Os recém-natos também eram pesados com fita de pesagem específica para bezerros, realizado a cura do umbigo e colocação de brinco de identificação. Após 48 h de vida, era avaliada a eficácia da colostragem através da concentração de IgG no sangue das bezerras, através do refratômetro portátil de Brix (Agatige, RZ120). Todas essas informações de qualidade e volume de colostro, peso do bezerro ao nascimento e valor de IgG foram anotados pela equipe de manejo e utilizada no presente experimento. Casos de parto gemelar não foram motivos de exclusão do animal, pois não apresentaram complicações após o parto, e informações dos dois bezerros foram coletadas, e considerado o resultado da média entre eles.

#### 3.2.4 Coleta e análise de amostras

Foram coletadas amostras da TMR semanalmente e dos volumosos (silagem de milho, silagem pré-secada de azevém, silagem pré-secada de alfafa e palha de trigo) a cada 15 dias. Em seguida, foram congeladas e posteriormente enviadas ao Laboratório de

Nutrição Animal (LNA) da UFPR, em Curitiba-PR. As amostras foram secas em estufas de ventilação forçada a 55°C por 72 h e moídas em peneira com crivos de 1 mm de diâmetro (Thomas Wiley Mills, Thomas Scientific, Swedesboro, EUA).

O teor de matéria seca (MS) foi determinado por secagem a 105°C por 24 h e as cinzas por incineração a 550°C por 6 h. O extrato etéreo (EE) e a proteína bruta (PB) foram analisados de acordo com AOAC (2012). O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi analisado em cadinhos porosos segundo Van Soest (1991) com amilase e sulfito de sódio. E a fração de carboidratos não fibrosos foi estimada:  $100 - (PB + EE + RM + FDN)$ . O mineral Ca foi determinado por titulação, P por colorimetria, Na e K por fotometria.

As vacas foram ordenhadas três vezes ao dia, em ordenhadeira tipo carrossel com identificação automática (DeLaval®). A produção de leite foi registrada individualmente por ordenha durante todo o experimento por meio de medidores automáticos, e arquivadas pelo software de gerenciamento de rebanho (DeLaval DelPro®).

Amostras de leite foram obtidas por um amostrador com vácuo da própria ordenhadeira, que era acoplado no sistema, no momento da ordenha. Essas amostras foram coletadas 2 vezes na semana (quarta e sexta-feira), sempre na ordenha da manhã, durante o período pós-parto, do primeiro dia até 18 dias de DEL, devido a permanência dos animais no pós-parto de  $18,6 \pm 2,9$  dias, e armazenados em frascos com o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para análise. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório Centralizado de Análise de Leite da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) para análise dos teores de gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais, contagem de células somáticas (CCS) e perfil de ácidos graxos no leite (avaliação de AG envolvidos na mobilização hepática). Essas amostras foram avaliadas

através de um analisador automatizado (Nexgen, Bentley, MN, EUA) que adota a espectrofotometria do infravermelho médio Fourier-transformada.

A partir dos dados de produção e composição do leite obtidos, foi possível calcular com as fórmulas (1) a secreção diária de energia no leite;  $EL = [(0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg de leite}$ , (2) a produção de leite corrigida para energia;  $PLCE = [(0,327 \times \text{produção de leite}) + (12,95 \times \text{produção de gordura}) + (7,20 \times \text{kg de proteína})]$ , e (3) a produção de leite corrigida para 4% de gordura;  $PLC4\%G = (0,4 + 15 \times \% \text{ gordura}/100) \times \text{kg de leite}$ . A CCS foi transformada para uma escala linear de 0 a 9 pela equação:  $EL = [\text{Log}_2 (\text{CCS}/100.000)] + 3$ , o que normaliza os dados e facilita a interpretação dos resultados.

### 3.2.5 Peso corporal e ECC

A pesagem e mensuração do escore de condição corporal (ECC) foi realizada em três períodos; na entrada dos animais no lote pré-parto, no momento do parto e no dia da saída dos animais do lote pós-parto. Foi utilizado uma fita que estima o peso vivo através da mensuração do perímetro torácico, específica para animais da raça Holandesa e o ECC foi baseado em escala de 1 a 5 pontos, sendo 1 para os animais excessivamente magros e 5 para os animais obesos, conforme Edmonson et al. (1989). A magnitude da perda ou ganho de peso vivo foi calculada através da diferença entre  $PV_{\text{final}} - PV_{\text{inicial}}$  (kg/período).

### 3.2.6 Amostragem e processamento do sangue

A partir da data de previsão do parto, o sangue foi coletado de todas as vacas dos tratamentos controle e MP, nos dias -14, -7, +1, +3 e +7 em relação a data do parto, através da punção dos vasos sanguíneos coccígeos em tubos a vácuo de tampa vermelha (sem

anticoagulante) de 9 mL. Após a coleta, os tubos foram centrifugados por 15 min a 2.500 x g à temperatura ambiente e o soro sobrenadante foi pipetado e distribuído em duplicatas, e algumas coletas em triplicatas de microtubos de 2 mL, e posteriormente congelados a -20°C até a análise.

As incidências de hipercetonemia e hipoglicemia do rebanho também serão monitoradas pelo uso de tiras de cetonas e de glicose nos dias +3, +7 e +14, com o auxílio de glicosímetros portáteis Optium Xceed, da marca Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). O limiar para hipercetonemia será BHB  $\geq$  1,2 mmol/L e para hipoglicemia, glicose  $\leq$  40mg/dL, segundo McArt et al. (2012).

### 3.2.7 Categorização de doenças

Durante os primeiros 60 dias de lactação, foram diagnosticadas as seguintes enfermidades: cetose clínica, retenção de placenta, metrite puerperal, hipocalcemia clínica, deslocamento de abomaso e mastite clínica. Os casos subclínicos de cetose e hipocalcemia serão avaliados através dos resultados das amostras de sangue enviadas ao laboratório, considerando BHB  $\geq$  1,2 mmol/L para cetose subclínica, conforme McArt et al. (2012). Já para a hipocalcemia subclínica, a concentração limiar de cálcio sérico será  $<$  2,0 mmol/L (ou  $<$  8,0 mg/dL), conforme Reinhardt et al. (2011). E para mastite subclínica, foi levado em consideração o valor de CCS acima de 200.000 células/mL como valor referência de acordo com a indicação de Sharma et al. (2011).

A cetose clínica é diagnosticada através da redução na produção de leite, diminuição do apetite e das motilidades ruminais e prostração do animal, em conjunto com valor de BHB  $\geq$  1,2 mmol/L (McArt et al., 2012). A retenção de placenta é caracterizada pela falha na expulsão das membranas fetais dentro de 24 horas após o parto. A metrite puerperal foi

definida para presença de secreção fétida no canal vaginal, com presença ou não de febre. A hipocalcemia clínica foi diagnosticada pela permanência do animal em decúbito esternal e diminuição na produção de leite, e Ca sanguíneo abaixo de 8,0 mg/dL (Reinhardt et al., 2011). O deslocamento do abomaso foi diagnosticado com base na ausculta e percussão próximo às fossas paralombares, confirmado som metálico característico de “ping”, foi feita a intervenção cirúrgica para correção por omentopexia. E por fim, a mastite clínica é definida pela presença de leite anormal e sinais de inflamação em um ou mais quartos. E vacas com mais de uma doença clínica foram classificadas como portadoras de múltiplas doenças.

### 3.2.8 Análise estatística

O delineamento experimental empregado foi o de blocos casualizados, utilizando contraste ortogonal para comparar os tratamentos. Os dados de produção e composição do leite foram analisados através do procedimento MIXED do programa SAS (v.9.4) contendo os efeitos fixos de tratamento, DEL, ordem de parição e as interações tratamento\*ordem e tratamento\*DEL, além da inclusão dos efeitos aleatórios de bloco e vaca aninhada em tratamento. As seguintes estruturas de covariância foram testadas: componentes de variância (VC), auto-regressiva de primeira ordem [AR(1)], não estruturada (UN), simetria composta (CS) e Toeplitz (TOEP). Aquela que apresentou o menor valor do critério de informação de Akaike corrigido (AICC) foi selecionada. E os valores que não apresentaram normalidade foram submetidas à transformação de acordo com o procedimento Box-Cox (Box e Cox, 1964) usando uma macro para modelos mistos no SAS (Piepho, 2009).

Para as análises de ECC, peso vivo, qualidade e volume de colostro, peso do bezerro e IgG, os dados foram avaliados pelo procedimento GLM do SAS, por não haver medidas repetidas no tempo, com o modelo contendo apenas os efeitos fixos de bloco e tratamento.

Finalmente as variáveis binárias, como incidência de doenças, foram analisadas com o procedimento GLIMMIX do SAS, e significância foi declarada em  $P \leq 0,05$ , e as tendências foram consideradas quando  $P \leq 0,10$ .

### 3.3 RESULTADOS

No início do experimento foram incluídos 224 animais, porém, após a aplicação dos critérios de exclusão, apenas 214 vacas foram incluídas nas análises estatísticas, 84 novilhas, 76 primíparas e 54 multíparas. A Tabela 8 descreve os motivos de exclusão (morte, doença e pouco tempo de suplementação) e o número de animais por tratamento e paridade, que foram incluídos nas análises estatísticas.

Tabela 8. Descrição dos animais inscritos, motivos de exclusão e animais incluídos nas análises estatísticas de acordo com a paridade

Item	Controle	Mepron	Total
Inscritos	112	112	224
Paridade			
Novilha	46	45	91
Primípara	38	38	76
Multípara	28	29	57
Excluídas	5	5	10
Morte	0	1	1
Doença	1	1	2
Pouco tempo no tratamento	4	3	7
Incluídos na análise estatística	107	107	214
Paridade			
Novilha	42	42	84
Primípara	38	38	76
Multípara	27	27	54

<sup>1</sup>Novilhas com menos de 15 dias no pré-parto foram excluídas, assim como as vacas com menos de 20 dias no pré-parto.

### 3.3.1 Produção e composição do leite

Em relação aos resultados de produção e composição do leite demonstrado na Tabela 9, a produção de leite foi retratada de três formas, através da produção de leite até 18 dias de DEL (data prevista para a saída dos animais do pós-parto), até 30 e 60 dias.

Tabela 9. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) na dieta pré-parto, no desempenho produtivo de vacas leiteiras

Variável	Tratamento <sup>1</sup>			Valor-P		
	CT	MP	EPM	Ordem x Trat.	DEL x Trat.	Trat.
Produção de leite 1-18d (kg)	38.52	36.71	0.43	<0,001	0.04	<0,001
Produção de leite 1-30d (kg)	41.11	39.03	0.42	<0,001	0.04	<0,001
Produção de leite 1-60d (kg)	43.66	41.70	0.48	<0,001	0.07	<0,001
PLCE, kg/d	46.24	45.24	0.68	0.43	0.59	0.30
PLC4%Gord, kg/d	41.86	40.95	0.64	0.456	0.50	0.32
Energia do leite (Mcal/d)	31.31	30.58	0.45	0.56	0.53	0.26
Gordura, %	4.67	4.65	0.05	0.71	0.57	0.77
Gordura, kg/d	1.75	1.70	0.03	0.85	0.58	0.24
Proteína, %	3.71	3.84	0.02	0.31	< 0,01	< 0,01
Proteína, kg/d	1.40	1.36	0.02	0.52	0.81	0.21
Caseína, %	2.96	3.07	0.02	0.38	< 0,01	< 0,01
Caseína, kg/d	1.12	1.09	0.02	0.51	0.80	0.23
Lactose, %	4.62	4.62	0.01	0.02	0.81	0.79
Lactose, kg/d	1.80	1.73	0.02	0.11	0.71	0.05
Sólidos Totais (%)	14.06	14.13	0.07	0.60	0.84	0.49
Sólidos Totais, kg/d	5.34	5.16	0.08	0.40	0.81	0.11
NUL (mg/dL) <sup>2</sup>	19.06	18.29	0.23	0.57	0.18	0.02
Escore linear de CCS <sup>3</sup>	2.49	2.59	0.11	0.04	0.29	0.51

<sup>1</sup>Produção de leite corrigida para energia = [(0,327 x produção de leite) + (12,95 x produção de gordura) + (7,20 x kg de proteína)]

<sup>2</sup>Produção de leite corrigida para 4% de gordura = [(0,4 + 15 x % gordura/100) x kg de leite]

<sup>3</sup>Energia do leite = [(0,0929 x % gordura) + (0,0547 x % proteína) + (0,0395 x % lactose)]

<sup>4</sup>Nível de nitrogênio ureico no leite

<sup>5</sup> Escore Linear de CCS (Contagem de células somáticas) é obtido através da fórmula EL = [Log2 (CCS/100.000)] + 3.

Houve significância nas três interações na produção de leite de 18 dias, justificado pela produção de leite maior nas primíparas do grupo controle em relação ao tratamento, respectivamente (44,25 vs. 38,22;  $P<0,01$ ), mas que não foi encontrado nas novilhas (30,30 vs. 28,54;  $P=0,28$ ), e mesmo as multíparas com valor numericamente menor do grupo controle com o tratamento, não houve significância (41,00 vs. 43,35;  $P=0,54$ ). As curvas de produção de leite até 30 dias de DEL, das novilhas, primíparas e multíparas, podem ser visualizadas nas Figura 6, 7 e 8 respectivamente.

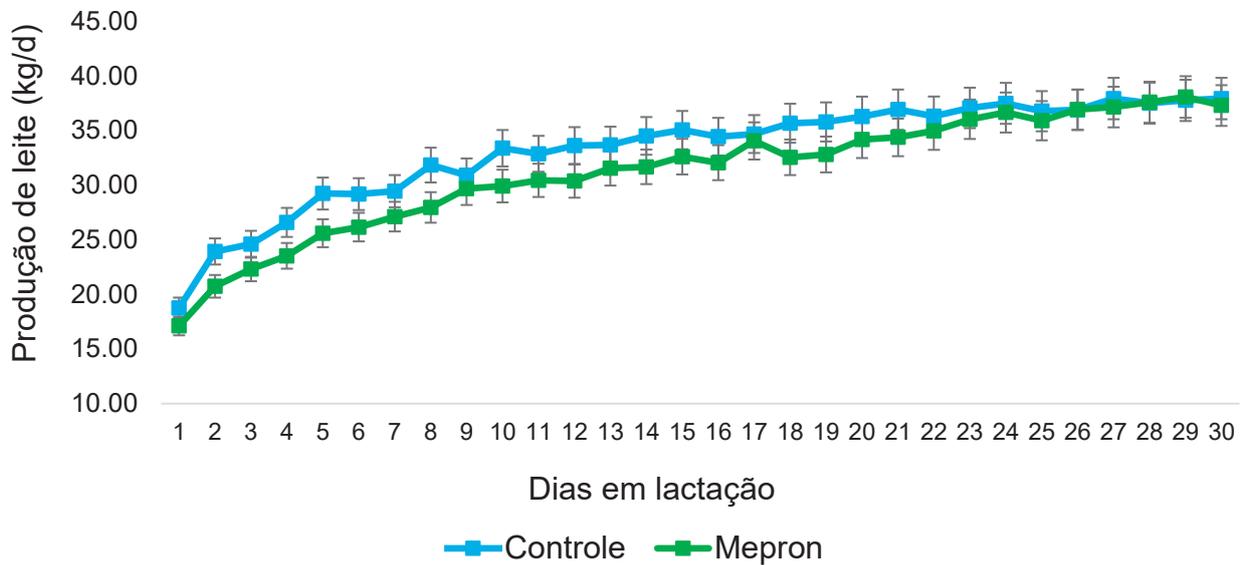


Figura 6. Curvas de produção de leite até 30 dias de DEL das nulíparas dos grupos Controle e Mepron.

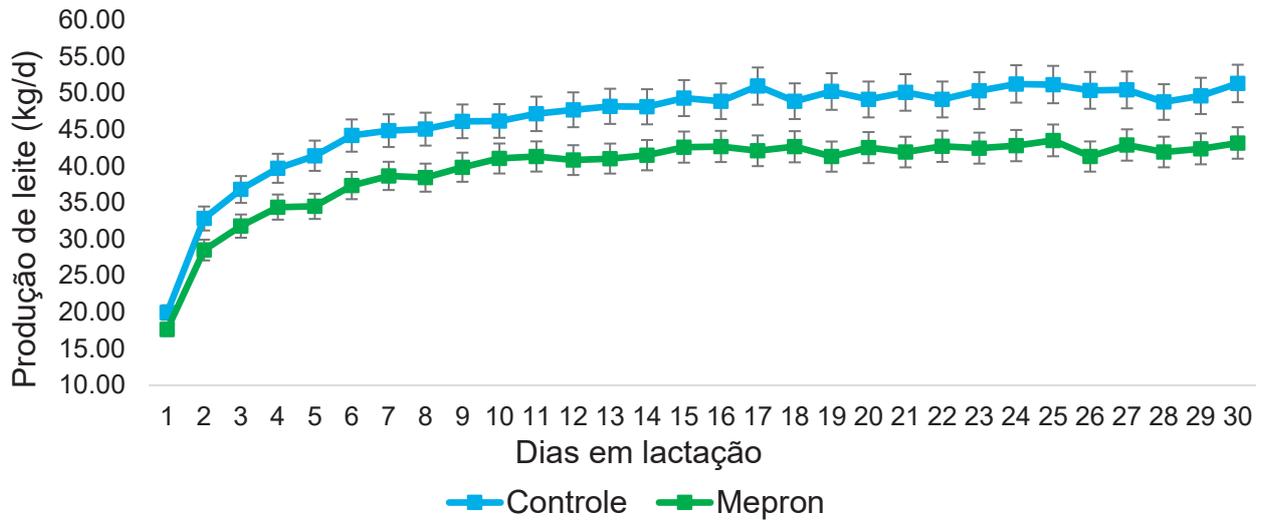


Figura 7. Curvas de produção de leite até 30 dias de DEL das primíparas dos grupos Controle e Mepron.

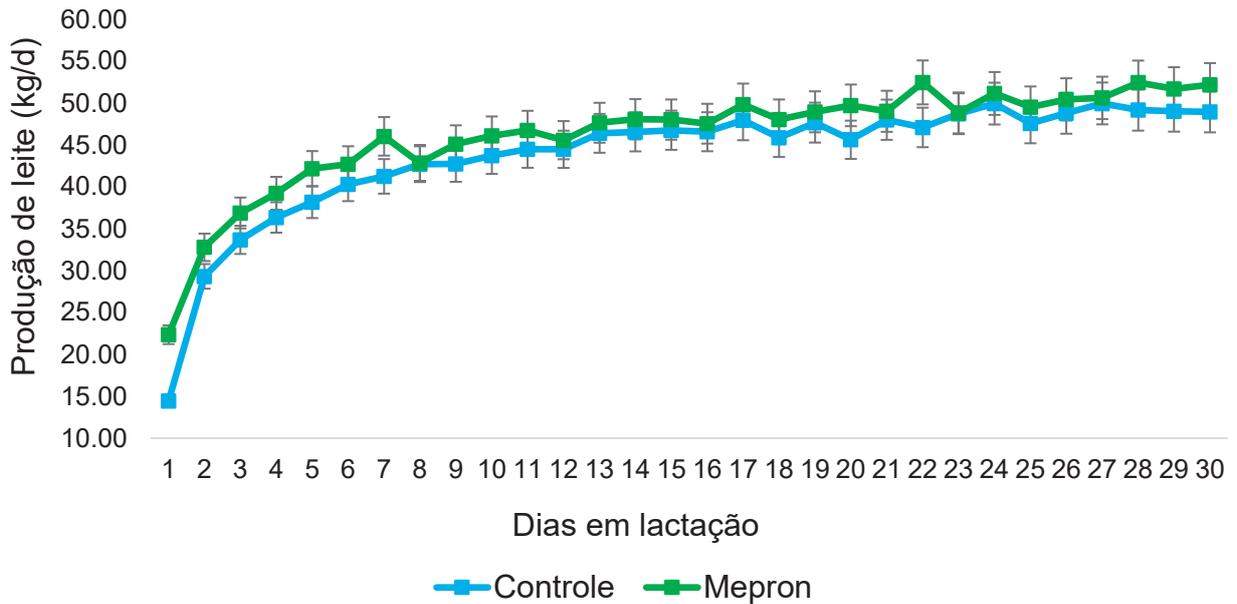


Figura 8. Curvas de produção de leite até 30 dias de DEL das múltiparas dos grupos Controle e Mepron.

Foi observado o mesmo comportamento com as primíparas (46,30 vs. 39,69;  $P < 0,01$ ) maior produção no grupo controle comparado ao tratamento, mas não foi encontrado significância para as novilhas (33,15 vs. 31,18;  $P = 0,13$ ) e nas multíparas (43,88 vs. 46,22;  $P = 0,57$ ). Assim como, na produção de leite até dos 60 dias de DEL, onde primíparas também produziram mais leite no grupo controle (47,28 vs. 41,79;  $P < 0,01$ ), e novilhas também (36,92 vs. 34,27;  $P = 0,02$ ), apenas multíparas continuaram produzindo a mesma quantidade de leite nos grupos controle e tratamento (46,79 vs. 49,05;  $P = 0,77$ ).

Entretanto, quando a produção de leite é convertida para PLCE, PLC4% de gordura e energia do leite, não houve diferença entre os tratamentos. Como também não houve diferença no restante das variáveis da composição do leite, com exceção ao teor de proteína e caseína do leite e o NUL. Vacas suplementadas com MP no pré-parto demonstraram maior teor de proteína no pós-parto, e como a caseína está diretamente relacionada com os níveis de proteína no leite, essa variável também obteve significância. Em relação ao NUL, vacas suplementadas também apresentaram menor quantidade no leite quando comparadas com as vacas que não receberam MP na dieta. Também foi observado significância na variável escore linear de CSS, na interação ordem e tratamento, justificado pelo escore do grupo controle maior que do tratamento nas primíparas (2,08 vs 2,65;  $P = 0,01$ ).

Além dessas variáveis, foi realizado a análise do perfil de ácidos graxos da gordura do leite, nas amostras coletadas para avaliação da composição, os resultados estão apresentados na Tabela 10. E não foi observado nenhuma diferença significativa quando comparado os ácidos graxos dos dois tratamentos.

Tabela 10. Perfil dos ácidos graxos do leite de vacas leiteiras recém-paridas suplementadas com MP (Mepron) durante o pré-parto (g/100g de gordura).

Variável	Tratamento <sup>1</sup>		EPM	Valor- <i>P</i>		
	CT	MP		Ordem x Trat	DEL x Trat	Trat.

AG Monoinsaturados (MFA)	0.29	0.28	0.003	0.01	0.27	0.26
AG Poli-insaturados (PFA)	0.34	0.04	0.001	0.70	0.67	0.22
AG Saturados (SFA)	0.56	0.57	0.002	0.28	0.01	0.28
AG Insaturados (UFA)	0.32	0.32	0.003	0.01	0.16	0.35
Ácido Palmítico (C16:0)	0.26	0.27	0.001	0.20	0.35	0.21
Ácido Esteárico (C18:0)	0.11	0.11	0.001	0.18	0.67	0.95
Ácido Oleico (C18:1)	0.25	0.25	0.003	0.09	0.76	0.38
Pré-formados	0.34	0.34	0.003	0.25	0.88	0.67
Misto	0.30	0.30	0.001	0.45	0.06	0.60
De Novo	0.26	0.26	0.002	0.54	0.36	0.62

<sup>1</sup> Tratamento CT = controle e MP = Mepron® (Evonik, Industrias, Alemanha).

### 3.3.2 Colostro, IgG e peso do bezerro ao nascer

Essas variáveis foram coletadas no momento do parto, e informadas na ficha individual de cada vaca. Com relação ao grau de brix do colostro, não houve diferença estatística entre o grupo controle e tratamento, respectivamente (24,63 vs. 23,00;  $P=0,15$ ). Assim como, volume do colostro produzido no momento do parto (5,00 vs. 4,77;  $P=0,67$ ) e IgG sérico dos bezerros (6,01 vs. 6,12;  $P=0,31$ ). O peso do bezerro foi mensurado através de uma fita de pesagem específica para recém-nascido, considerando animais machos e fêmeas, através da medição da circunferência da coroa do casco, e também não observou diferença que o controle e tratamento (37,44 vs. 37,79;  $P=0,46$ ). Em casos de parto gemelar, era realizado o peso médio entre os bezerros.

### 3.3.3 Peso e ECC

O peso corporal e o ECC estão apresentados na Tabela 11, e foram realizados na entrada dos animais no lote pré-parto, no momento do parto e na saída do lote pós-parto. Não foi observado nenhuma diferença entre os tratamentos controle e MP. Apenas uma tendência ( $P=0,08$ ), em mudança de ECC, onde os animais do grupo Controle perderam maior pontuação de ECC, em relação ao grupo tratamento.

Tabela 11. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) na dieta pré-parto no peso corporal e no escore de condição corporal.

Item	CT	MP	EPM	Valor- <i>P</i>
Peso 1	707.64	699.20	4.61	0.20
Peso 2 <sup>2</sup>	690.93	682.51	4.96	0.23
Peso 3 <sup>3</sup>	688.87	684.12	4.93	0.50
Mudança Peso	-19.55	-16.20	3.32	0.48
Ecc 1 <sup>2</sup>	3.26	3.21	0.03	0.28
Ecc 2 <sup>2</sup>	3.35	3.33	0.31	0.55
Ecc 3 <sup>3</sup>	3.16	3.19	0.35	0.57
Mudança ECC <sup>5</sup>	-0.10	-0.02	0.33	0.08

<sup>1</sup>Peso vivo e Escore de condição corporal na entrada do lote pré-parto

<sup>2</sup>Peso vivo e Escore de condição corporal no momento do parto

<sup>3</sup>Peso vivo e Escore de condição corporal na saída do lote pós-parto

<sup>4</sup>Mudança de peso e ecc, obtido pela subtração dos valores no pré-parto com os valores na saída do pós-parto.

### 3.3.4 Saúde

Os níveis de BHB foram mensurados nos dias: D3, D7 e D14, e glicose no D7, através do glicosímetro portátil, na intenção de avaliar o balanço energético dos animais. Entretanto, não foi encontrado diferença estatística nos tratamentos, como demonstrado na Tabela 12 e na Figura 7.

Tabela 12. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) no pré-parto nas concentrações de  $\beta$ -hidroxibutirato nos dias +3, +7 e +14, e glicose no dia +7 após o parto

Variável	CT	MP	SEM	Valor- <i>P</i>
$\beta$ -hidroxibutirato D3	0.65	0.62	0.04	0.64
$\beta$ -hidroxibutirato D7	0.77	0.68	0.04	0.13
$\beta$ -hidroxibutirato D14	0.75	0.64	0.06	0.23
$\beta$ -hidroxibutirato	0.73	0.69	0.30	0.34
Glicose D7	45.88	47.07	0.79	0.29

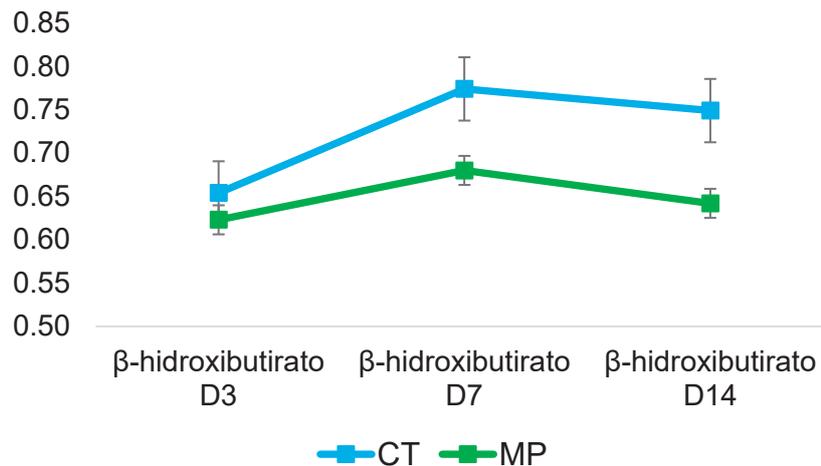


Figura 9. Concentrações de  $\beta$ -hidroxibutirato nos dias +3, +7 e +14 após o parto, de vacas suplementadas com MP (Mepron) no pré-parto e não suplementadas (CT).

Com relação a incidência de doenças até os 60 dias de lactação, demonstrado na Tabela 13, houve um número muito baixo de ocorrências nos animais, e não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 13. Efeitos da suplementação de MP (Mepron) na dieta pré-parto na incidência de doenças até 60 dias de lactação.

Variável	Incidência (%)	CT	MP	EPM	Valor-P
Cetose clínica	4,67 (10/214)	3.74	5.61	0.67	0.50
Hipocalcemia clínica	1,87 (4/214)	1.87	1.87	1.03	1.00
Deslocamento de abomaso	3,27 (7/214)	3.74	2.80	0.80	0.69
Retenção de placenta	1,40 (3/214)	1.87	0.93	1.23	0.56
Metrite	1,87 (4/214)	3.74	0.00	0.53	0.97
Mastite	6,07 (13/214)	6.54	5.61	0.57	0.77
Incidência de 1+ doença	6,07 (13/214)	7.48	4.67	0.60	0.37

### 3.4 DISCUSSÃO

O objetivo deste experimento foi avaliar a eficiência da suplementação de MPR no pré-parto, com posterior suplementação no pós-parto, com a intenção de observar se suplementação no pré-parto é necessária e possui efeitos positivos no desempenho animal.

No presente estudo, não foi encontrado diferença na produção de leite nas novilhas e nas multíparas, apenas nas primíparas, que produziram mais leite no grupo controle. Entretanto, não houve diferença nas variáveis PLCE, PLC4% de gordura e energia do leite. Estudo de Cardoso et al. (2021) também comparou vacas suplementadas com metionina no pré (0,09% da MS) e no pós-parto (0,13%), e não relatou aumento na produção de leite nas multíparas e nas primíparas, e em PLCE, em relação ao grupo controle, mas aumentou a concentração de gordura e sólidos totais no leite. Enquanto, Potts et al. (2020) suplementara, 9 g no pré-parto e 13,5 g no pós-parto, e observou aumento no teor de gordura no leite e a PLC4%G nas vacas multíparas, mas em primíparas não houve efeito na produção e composição do leite. Essa informação demonstra que primíparas e multíparas podem apresentar respostas diferentes frente a suplementação de metionina, devido a exigências diferentes do animal, ou diferença na produção de leite.

Variações na resposta da suplementação de MPR no período de transição, podem acontecer por diversos motivos, como: duração da suplementação, quantidade de MPR oferecida, nível de produção do animal e estado fisiológico. As diferenças no metabolismo de vacas primíparas e multíparas no pré e pós-parto ainda não está bem elucidado (Arshad et al., 2020). Visto que, no presente estudo houve interação de paridade com tratamento, apenas na produção de leite durante os 3 períodos acumulados (18, 30 e 60 dias), mas não houve interação na composição do leite. Logo, as primíparas podem ter se beneficiado com aumento de proteína e caseína no leite, e melhor eficiência de nitrogênio, porém a adição de MPR parece ter prejudicado a produção de leite. Mais estudos devem ser realizados, analisando com mais cautela a diferença na demanda de metionina entre primíparas e multíparas.

Estudo avaliando diferentes níveis de MPR no pós-parto (8, 16 e 24g), relatou que a aumento na produção de leite em todos os níveis, em multíparas e primíparas, mas a suplementação de 16g foi a mais produtiva entre os níveis. As vacas suplementadas com MPR, independente da quantidade, também produziram maiores teores de proteína no leite (Lara et al., 2016). Assim como Guinard e Rulquin (1995), esses estudos indicam que a dose ideal de metionina para favorecer a máxima produção de leite no pós-parto é de 15-16 g/vaca/dia, e valores inferiores, como a dosagem utilizada no presente estudo, podem tornar o produto ineficiente, entretanto apenas 8 g trouxe resultados na proteína do leite, semelhante a dosagem de 9,8 g que foi utilizada no experimento realizado.

Sun et al. (2016), adicionou 15 g de metionina no período de pré e pós-parto, e assim como no experimento conduzido, não relatou aumento na produção de leite, mas aumento nos teores de proteína no leite. Elsaadawy et al. (2022) suplementaram multíparas no pré-parto com MPR a 0,16% da MS e 0,12% no pós-parto, não observou aumento na produção de leite, mas teores de gordura, proteína e lactose, superiores comparados ao grupo controle.

Esses efeitos favoráveis a suplementação de MPR são reflexo da suplementação das vacas no pré e no pós-parto, sem a possibilidade de definir se os resultados são devido a MPR no pré, ou a suplementação contínua (pré e pós). E o objetivo do presente estudo foi avaliar os benefícios da suplementação no pré-parto, em conjunto com a adição desse aminoácido após o parto, em comparação com animais que receberam apenas MPR no pós-parto, porém, poucos estudos fizeram esse delineamento experimental. Lee et al. (2019) notaram aumento no teor de proteína no leite nos animais suplementados no pós-parto, independente se houve suplementação ou não no pré-parto. Trabalho muito parecido de Kudrna et al. (2009) também relatou aumento na produção e proteína do leite em vacas

suplementas após o parto, mas não observou efeito oriundo da suplementação de MPR no pré-parto. Diferente do resultado do experimento realizado, que a suplementação pré-parto, respondeu no aumento de teor de proteína, caseína e melhor NUL no pós-parto.

Muitos trabalhos mostram efeito principalmente no aumento no teor e na produção de proteína no leite com a suplementação de MPR no pré e no pós-parto (Sun et al., 2016; Zhou et al., 2016; Elsaadawy et al., 2022). Isso pode ser justificado porque o aumento na disponibilidade de metionina, pode favorecer a quantidade de proteína metabolizável e o balanço adequado de aminoácidos na circulação, e por serem precursores da síntese proteica, proporcionam maior rendimento de proteína no leite (Gao et al., 2017). Visto que, a glândula mamária utiliza os aminoácidos livres da circulação para a produção dessa macromolécula (Backwell et al., 1996). Além disso, esse aminoácido sinaliza a mTOR (alvo mecanístico de rapamicina), proteína quinase que além de atuar no metabolismo lipídico, é principalmente responsável pela síntese proteica (Appuhamy et al., 2012). Esse mesmo mecanismo também pode explicar o aumento de caseína, devido esta representar 80% da proteína no leite (NAN et al., 2014).

Os níveis de NUL podem refletir a eficiência no uso de nitrogênio. Quando ocorre adição de MPR na dieta, os níveis de metionina plásmatico podem aumentar e favorecer a utilização dos aminoácidos para a síntese de proteína, e como consequência aumento na proteína e caseína do leite (Muscher et al., 2010). O estudo realizado mostrou menor concentração de NUL em vacas suplementadas com MPR no pré e pós-parto, que é um resultado favorável para o desempenho das vacas. Uma vez que a suplementação também favoreceu os níveis de proteína e caseína na dieta. Ainda não foi bem explicado a relação do NUL com os aminoácidos essenciais, mas Broderick et al. (2008) encontraram menor NUL quando as vacas foram suplementadas com 15g de metionina durante a lactação.

Entretanto, estudos com suplementação no período de transição, não encontraram efeito em NUL (Zhou et al., 2016; Toledo et al., 2023).

Ainda sobre os componentes no leite, era esperado encontrar algum resultado no perfil de ácidos graxos na gordura do leite, devido a relação principalmente do ácido oleico em mobilização de ácidos graxos para o fígado, e possivelmente vacas não suplementadas poderiam apresentar maior quantidade desse componentes lipídico e de BHB, que pode ser um indicador de saúde hepática, mas não foi observado diferença em nenhum perfil de ácido graxo na gordura do leite entre os tratamentos.

Os principais componentes dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) são o ácido esteárico, palmítico e oleico. Essas moléculas também são os principais ácidos graxos do tecido adiposo subcutâneo de vacas leiteiras e em processos de lipomobilização, esses componentes são liberados na circulação e transportadas por albuminas (Douglas et al., 2007; Kershaw et al., 2006). Esse transporte de ácidos graxos no metabolismo, promove uma alteração no fluxo de ácidos graxos que chegam na glândula mamária, e pode impactar o perfil da gordura do leite.

Em relação a incidência de doenças, não foi encontrado diferença estatística entre os tratamentos, provavelmente porque o numero experimental pode ser considerado baixo para encontrar essa resposta, e como consequência houve poucas ocorrências de doenças no rebanho experimental. Assim como, Skenandore et al. (2017) que avaliou a saúde de vacas suplementadas no pré e pós-parto com 0,08% de MPR na MS, e não observou diferença na incidência de doenças em relação ao grupo controle. Toledo et al. (2023) relatou menor ocorrência apenas de hipocalcemia subclínica no dia do parto, em vacas suplementadas com 13 g de MPR no pré-parto e 28 no pós-parto, e maior concentração e produção de proteína no leite. Também não foi relatado efeito em BHB e glicose,

colaborando com o presente trabalho e outros estudos (Socha et al., 2005; Preynat et al., 2009). Enquanto Elsaadawy et al. (2022) encontrou menores níveis de BHB durante o pré-parto e com tendência no pós-parto.

Outros estudos avaliando a suplementação de MPR no período de transição, também não encontraram efeito no níveis de BHB e glicose no pós-parto (Zhou et al., 2016; Batistel et al., 2018). Mas encontraram efeitos na ação de antioxidantes, principalmente a glutatona, menor quantidade de espécies reativas ao oxigênio e melhor atividade imunológica. Entretanto, Zhou et al. (2016) suplementou vacas no pré e no pós-parto com 0,08% da MS de MPR e observou uma tendência em menor ocorrência de cetose clínica e retenção de placenta no grupo tratamento. Osório et al. (2013) também relata uma tendência à diminuição de cetose. Esses autores relatam que as vacas suplementadas com MPR no pré-parto apresentaram melhor sistema imunológico e maior consumo de MS e por isso tenderam a ter menos doenças no pós-parto.

Com relação a suplementação de MPR no pré-parto impactando na ocorrência de doenças no pós-parto, Lee et al. (2019) relataram menor quantidade de CCS no leite de vacas suplementadas com MPR no pré e no pós-parto, em relação as vacas suplementadas apenas no pós-parto, mas não notou diferença na ocorrência de mastite. E no estudo demonstrado, não foi encontrado resultado em CCS, apenas as primíparas controle, que tiveram maior CCS quando comparado com as primíparas tratadas.

Colaborando com o resultado encontrado, estudos suplementando MPR no pré-parto, também não encontram efeito no peso corporal e no ECC das vacas no pós-parto (Socha et al., 2015; Ordway et al., 2009). Mas Elsaadawy et al. (2022) observou menor mudança de ECC no pós-parto em vacas suplementadas no pré e no pós-parto com MPR.

A adição da metionina na dieta pode promover aumento de aminoácidos na circulação da vaca parturiente, e favorecer o transporte placentário desses aminoácidos para o feto (Batistel et al., 2017). Nesse mesmo estudo, foi realizada a coleta de placentomas para análise de expressão de genes e encontraram resultado positivo na expressão de mRNA de genes envolvidos no transporte de aminoácidos, glicose e sinalização da mTOR, o que pode justificar o maior tamanho dos bezerros no nascimento. Entretanto, o presente estudo não encontrou resultado no tamanho do bezerro ao nascer, assim como Potts et al. (2020) também não notou efeito no peso de bezerro no nascimento, de vacas suplementadas com MPR no pré-parto.

### **3.5 CONCLUSÕES**

Os animais suplementados no pré-parto, com superior suplementação no pós desse estudo produziram maior teor de proteína, caseína e menor NUL, em relação aos animais suplementados apenas no pós-parto. Entretanto, com um resultado inesperado na maior produção de leite das primíparas no grupo controle. Porém, é necessário mais estudo para compreender o funcionamento da MPR no pré-parto, a concentração adequada na dieta e investigar as supostas diferenças entre paridade e as suas necessidades de suplementação com MPR nas primíparas. E assim, criar estratégias nutricionais mais assertivas e preventivas aos desafios do pós-parto.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à CAPES e ao PPGZ-UFPR pela concessão da bolsa de auxílio e à Evonik Brasil pelo suporte financeiro. Aos proprietários e colaboradores da Agropecuária Regia pelo companheirismo e suporte na realização deste experimento. Ao técnico Olair que conduziu as análises sanguíneas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR

e à técnica Cleuza que conduziu as análises bromatológicas dos alimentos no Laboratório de Bromatologia da Universidade Federal do Paraná.

### 3. 6 REFERÊNCIAS

ALHARTHI, A. S. et al. Maternal supply of methionine during late-pregnancy enhances rate of Holstein calf development in utero and postnatal growth to a greater extent than colostrum source. *Journal of animal science and biotechnology*, v. 9, p. 1-12, 2018.

AOAC International. 2016. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Arlington, VA.

APPUHAMY, J. R. N. et al. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *The Journal of nutrition*, v. 142, p. 484-491, 2012.

APPUHAMY, J. R. N. et al. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *The Journal of nutrition*, v. 142, p. 484-491, 2012.

ARSHAD, U. et al. Meta-analysis of the effects of supplemental rumen-protected choline during the transition period on performance and health of parous dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 103, p. 282-300, 2020.

BACKWELL, F. R. et al. Evidence for the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat in vivo. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 271, p. R955-R960, 1996.

BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 480-490, 2018.

BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 7455-7467, 2017.

BOX, G., and COX, D. An analysis of transformations. *Journal Royal Stat. Soc. B.* v.26, p.211-243, 1964.

BRODERICK, G. A. et al. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 1092-1102, 2008.

CARDOSO, F. F. et al. Effect of protein level and methionine supplementation on dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5467-5478, 2021.

CHANDLER, T. L.; WHITE, H. M. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. *PLoS One*, v. 12, 2017.

CHIOGNA, V. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLoS One*, v. 16, 2021.

CUPERTINO, C. F. et al. Avaliação do perfil metabólico em vacas leiteiras de alta produção no período de transição. *Pubvet*, v. 5, p. 1112-1117, 2011.

DOUGLAS, G. N. et al. Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 90, p. 2941-2959, 2007.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*, v.82, p.2259-2273, 1999.

EDMONSON, A. J. et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 68–78, 1989.

ELSAADAWY, S. A. et al. Supplementing ruminally protected lysine, methionine, or combination improved milk production in transition dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 780637, 2022.

GAO, H. N. et al. Combination of histidine, lysine, methionine, and leucine promotes  $\beta$ -casein synthesis via the mechanistic target of rapamycin signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, v. 100, p. 7696-7709, 2017.

GUINARD, J and RULQUIN, H. Effects of graded amounts of duodenal infusions of methionine on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 78, p. 2196-2207, 1995.

JACOMETO, C. B. et al. Maternal rumen-protected methionine supplementation and its effect on blood and liver biomarkers of energy metabolism, inflammation, and oxidative stress in neonatal Holstein calves. *Journal of dairy science*, v. 99, p. 6753-6763, 2016.

KERSHAW, E. E. et al. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, v. 55, p. 148-157, 2006.

KUDRNA, VVUZVP et al. Feeding ruminally protected methionine to pre-and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. *Journal of Animal Science*, v. 54, p. 395-402, 2009.

LARA, A. et al. Produção de leite em vacas Holandesas suplementadas com diferentes níveis de metionina protegida no rúmen. *Livestock Science*, v. 105, p. 105–108, 2006.

LEE, C.; LOBOS, N. E.; WEISS, W. P. Effects of supplementing rumen-protected lysine and methionine during prepartum and postpartum periods on performance of dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 102, p. 11026-11039, 2019.

MUSCHER, A. S.; SCHRÖDER, B.; BREVES, G.; HUBER, K. Dietary nitrogen reduction enhances urea transport across goat rumen epithelium. *Journal of Animal Science*, v. 88, p. 3390-3398, 2010.

NAN, X. et al. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. *Physiological genomics*, v. 46, p. 268-275, 2014.

NASEM, 2021. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

ORDWAY, R. S. et al. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5154-5166, 2009.

OSORIO, J. S. et al. Supplemental smartamine m or metasmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6248–6263, 2013.

OVERTON, Thomas R. et al. Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 631-638, 1996.

POTTS, S. B., SCHOLTE, C. M., MOYES, K. M., ERDMAN, R. A Production responses to rumen-protected choline and methionine supplemented during the periparturient period differ for primi-and multiparous cows. *Journal of dairy science*, v. 103, p. 6070-6086, 2020.

PIEPHO, H. P. Data transformation in statistical analysis of field trials with changing treatment variance. *Agronomy Journal*, v.101, p.865-869, 2009.

PREYNAT, A. et al. Influence of methionine supply on the response of lactational performance of dairy cows to supplementary folic acid and vitamin B12. *Journal of dairy science*, v. 92, p. 1685-1695, 2009.

REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; McCLUSKEY, B.J.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*, v.188, p.122-124, 2011.

SHARMA, N., SINGH, N. K., BHADWAL, M. S. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 24, p. 429-438, 2011.

SINGH, K. et al. Epigenetics: A possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. *Animal*, v. 6, p. 375–381, 2012.

SCHWAB, C. G. et al. Protected proteins and amino acids for ruminants. *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*, v. 141, 1995.

SKENANDORE, C.S. et al. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on vaginal discharge and uterine cytology of Holstein cows. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v.5, p.1-7, 2017.

SOCHA, M. T. et al. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1113–1126, 2005.

SUN, F. et al. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS One*, v. 11, 2016.

TOLEDO, M. Z. et al. Effects of feeding rumen-protected methionine pre-and postpartum in multiparous Holstein cows: Health disorders and interactions with production and reproduction. *Journal of Dairy Science*, v. 106, p. 2137-2152, 2023.

ZHOU, Z. et al. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 8716-8732, 2016.

#### 4 REFERÊNCIAS GERAIS

- ALHARTHI, A. S. et al. Maternal supply of methionine during late-pregnancy enhances rate of Holstein calf development in utero and postnatal growth to a greater extent than colostrum source. *Journal of animal science and biotechnology*, v. 9, p. 1-12, 2018.
- ALVES, D. Nutrição aminoacídica de bovinos. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 10, 2004.
- ANUÁRIO Leite 2023: leite baixo carbono. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023.
- AOAC International. 2016. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Arlington, VA.
- APPUHAMY, J. R. N. et al. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *The Journal of Nutrition*, v. 142, p. 484-491, 2012.
- ARSHAD, U. et al. Meta-analysis of the effects of supplemental rumen-protected choline during the transition period on performance and health of parous dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 103, p. 282-300, 2020.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, v. 62, p. 869–877, 2010.
- BACKWELL, F. R. et al. Evidence for the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat in vivo. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 271, p. R955-R960, 1996.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 480-490, 2018.
- BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 7455-7467, 2017.
- BAUMAN, D. E.; CURRIE, B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v. 63, p. 1514-1529, 1980.
- BENEFIELD, B. C. et al. Evaluation of rumen-protected methionine sources and period length on performance of lactating dairy cows within Latin squares. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 4448–4455, 2009.
- BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, v. 9, p. 366, 2008.

- BLUM, J. W.; BRUCKMAIER, R. M.; JANS, F. Rumen-protected methionine fed to dairy cows: Bioavailability and effects on plasma amino acid pattern and plasma metabolite and insulin concentrations. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1991–1998, 1999.
- BOX, G., and COX, D. An analysis of transformations. *Journal Royal Stat. Soc. B.* v.26, p.211-243, 1964.
- BRODERICK, G. A. et al. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 1092-1102, 2008.
- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. *Journal of Nutrition*, v. 136, p. 1636-1640, 2006.
- CARDOSO, F. F. et al. Effect of protein level and methionine supplementation on dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5467-5478, 2021.
- CHA, S.; YU, H.; KIM, J. Y. Bone mineral density-associated polymorphisms are associated with obesity-related traits in Korean adults in a sex-dependent manner. *PLoS One*, v. 7, p. e53013, 2012.
- CHANDLER, T. L.; WHITE, H. M. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. *PLoS One*, v. 12, 2017.
- CHIOGNA, V. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLoS One*, v. 16, 2021.
- CUPERTINO, C. F. et al. Avaliação do perfil metabólico em vacas leiteiras de alta produção no período de transição. *Pubvet*, v. 5, p. 1112-1117, 2011.
- DOEPEL, L.; LAPIERRE, H. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 3264-3274, 2010.
- DOUGLAS, G. N. et al. Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 90, p. 2941-2959, 2007.
- DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*, v.82, p.2259-2273, 1999.
- EDMONSON, A. J. et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 68–78, 1989.
- ELSAADAWY, S. A. et al. Supplementing ruminally protected lysine, methionine, or combination improved milk production in transition dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 780637, 2022.
- FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics take center stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 392-394, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATIONS – FAO. Dairy production and products: milk production. Rome: FAO, 2022.

GAO, H. N. et al. Combination of histidine, lysine, methionine, and leucine promotes  $\beta$ -casein synthesis via the mechanistic target of rapamycin signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, v. 100, p. 7696-7709, 2017.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. 357 p

GOSELINK, R. M. A. et al. Efeito da suplementação de colina protegida no rúmen na expressão gênica do fígado e do tecido adiposo durante o período de transição em vacas leiteiras. *Jornal de Ciência Leiteira*, 2013.

GRIECO, A. J. Homocystinuria: pathogenic mechanisms. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 273, p. 120-132, 1997.

GUINARD, J and RULQUIN, H. Effects of graded amounts of duodenal infusions of methionine on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 78, p. 2196-2207, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2020.

JACOMETO, C. B. et al. Maternal rumen-protected methionine supplementation and its effect on blood and liver biomarkers of energy metabolism, inflammation, and oxidative stress in neonatal Holstein calves. *Journal of dairy science*, v. 99, p. 6753-6763, 2016.

KAUFFMAN, A. J.; ST-PIERRE, N. R. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2284-2294, 2001.

KELLOGG, D. W.; TOMLINSON, D. J.; SOCHA, M. T.; JOHNSON, A. B. Effects of zinc methionine complex on milk production and somatic cell count of dairy cows: twelve-trial summary. *Professional Animal Scientist*, v. 20, p. 295-301, 2004.

KERSHAW, E. E. et al. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, v. 55, p. 148-157, 2006.

KUDRNA, VVUZVP et al. Feeding ruminally protected methionine to pre-and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. *Journal of Animal Science*, v. 54, p. 395-402, 2009.

LAMBERT, I. H.; KRISTENSEN, D. M.; HOLM, J. B.; MORTENSEN, O. H. Physiological role of taurine from organism to organelle. *Acta Physiologica*, v. 213, p. 191-212, 2015.

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

LARA, A. et al. Produção de leite em vacas Holandesas suplementadas com diferentes níveis de metionina protegida no rúmen. *Livestock Science*, v. 105, p. 105–108, 2006.

LARSEN, M.; KRISTENSEN, N. B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*, v. 7, p. 1640–1650, 2013.

LEE, C.; LOBOS, N. E.; WEISS, W. P. Effects of supplementing rumen-protected lysine and methionine during prepartum and postpartum periods on performance of dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 102, p. 11026-11039, 2019.

LEE, K.; KERNER, J.; HOPPEL, C. L. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 25655-25662, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. Tradução de W. R. N. Lodi e A. A. Simões. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1999.

LI, Y. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on production performance, apparent digestibility, blood parameters, and ruminal fermentation of lactating Holstein dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 981757, 2022.

MARTINOV, M. V. et al. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1804, p. 89-96, 2010.

MARTINS, R. M. R. F. Transplantação hepática: novos fatores de prognóstico da regulação da função mitocondrial na isquemia/reperfusão. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.

MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V.; OETZEL, G. R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 5056-5066, 2012.

MUSCHER, A. S.; SCHRÖDER, B.; BREVES, G.; HUBER, K. Dietary nitrogen reduction enhances urea transport across goat rumen epithelium. *Journal of Animal Science*, v. 88, p. 3390-3398, 2010.

NAN, X. et al. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. *Physiological genomics*, v. 46, p. 268-275, 2014.

NASEM, 2021. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, v. 29, p. 1181-1189, 2008.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R. Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 958-969, 2003.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

ORDWAY, R. S. et al. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5154-5166, 2009.

OSORIO, J. S. et al. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 7437-7450, 2014.

OSORIO, J. S. et al. Supplemental smartamine m or metasmart during the transition period benefits postparturient cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6248-6263, 2013.

OVERTON, Thomas R. et al. Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 631-638, 1996.

PARK, B. et al. Effect of rumen protected methionine and  $\alpha$ -tocopherol on growth performance, carcass characteristics, and meat composition of late fattening Hanwoo steer in high-temperature seasons. *Animals*, v. 10, p. 2430, 2020.

PATELLI, T. H. C. et al. Hipocalcemia no deslocamento de abomaso de bovinos: estudo de 39 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, p. 17-22, 2017.

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

PEREIRA, A. B. D. et al. Production and nitrogen utilization in lactating dairy cows fed ground field peas with or without ruminally protected lysine and methionine. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 6239-6255, 2017.

PIEPHO, H. P. Data transformation in statistical analysis of field trials with changing treatment variance. *Agronomy Journal*, v.101, p.865-869, 2009.

POTTS, S. B., SCHOLTE, C. M., MOYES, K. M., ERDMAN, R. A. Production responses to rumen-protected choline and methionine supplemented during the periparturient period differ for primi-and multiparous cows. *Journal of dairy science*, v. 103, p. 6070-6086, 2020.

PREYNAT, A. et al. Influence of methionine supply on the response of lactational performance of dairy cows to supplementary folic acid and vitamin B12. *Journal of dairy science*, v. 92, p. 1685-1695, 2009.

REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; McCLUSKEY, B.J.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*, v.188, p.122-124, 2011.

REZZI, S.; RAMADAN, Z.; FAY, L. B.; KOCHHAR, S. Nutritional metabolomics: applications and perspectives. *Journal of Proteome Research*, v. 6, p. 513-525, 2007.

RICHARDSON, C. R.; HATFIELD, E. E. The limiting amino acids in growing cattle. *Journal of Animal Science*, v. 46, p. 740-745, 1978.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. de. Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária. Juiz de Fora, MG: *Embrapa Gado de Leite*, 2020. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 123).

RODE, L. M.; KUNG, L. Rumen-protected amino acids improve milk production and milk protein yield. 1996

RULQUIN, H.; KOWALCZYK, J. Development of a method for measuring lysine and methionine bioavailability in rumen-protected products for cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v. 12, p. 465-474, 2003.

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

SCHWAB, C. G. et al. Protected proteins and amino acids for ruminants. *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*, v. 141, 1995.

SCHWAB, C. G. Protected proteins and amino acids for ruminants. In: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, 2007.

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

SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10094-10112, 2017.

SERVIDDIO, G. et al. Oxidation of hepatic carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet. *PLoS One*, v. 6, p. e24084, 2011.

SHARMA, N., SINGH, N. K., BHADWAL, M. S. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 24, p. 429-438, 2011.

SILVA, E. A. et al. Teores de proteína bruta para bovinos alimentados com feno de tifton 85: consumo e digestibilidades total e parcial. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 237-245, 2007.

SILVA, J. C. P M. Manejo e administração em bovinocultura leiteira. 2. ed., ampl. e atual. Viçosa, 2014.

SINGH, K. et al. Epigenetics: A possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. *Animal*, v. 6, p. 375–381, 2012.

SKENANDORE, C.S. et al. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on vaginal discharge and uterine cytology of Holstein cows. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v.5, p.1-7, 2017.

SOCHA, M. T. et al. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1113–1126, 2005.

SÜDEKUM, K. H. et al. Bioavailability of three ruminally protected methionine sources in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, v. 113, p. 17-25, 2004.

SUN, F. et al. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS One*, v. 11, 2016.

SWANEPOEL, N. Estimating amino acid limitations in California dairy rations and the effect of feeding a ruminally protected lysine supplement on animal performance. 2009. Tese (Mestrado em Nutrição Animal) - Faculdade de Ciências Naturais e Agrícolas, Universidade de Pretória, Pretória.

TANG, W. Y.; HO, S. M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 8, p. 173-182, 2007.

TOLEDO, M. Z. et al. Effects of feeding rumen-protected methionine pre-and postpartum in multiparous Holstein cows: Health disorders and interactions with production and reproduction. *Journal of Dairy Science*, v. 106, p. 2137-2152, 2023.

TREVISI, E.; MINUTI, A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Research in Veterinary Science*, v. 116, p. 47-54, 2018.

VAN DER DRIFT, S. G. A. et al. Protein and fat mobilization and associations with serum  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 4911-4920, 2012.

VAN SOEST, P. J. et al. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3583–3597, 1991.

WANG, C. et al. Efeitos da suplementação dietética de metionina e lisina na produção de leite e na utilização de nitrogênio em vacas leiteiras. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 3661–3670, 2010.

WEI, C. et al. Meta-analysis of rumen-protected methionine in milk production and composition of dairy cows. *Animals*, v. 12, p. 1505, 2022.

ZANG, Y. et al. Comparative effects of multiple sources of rumen-protected methionine on milk production and serum amino acid levels in mid-lactation dairy cows. *Professional Animal Scientist*, v. 33, p. 692–699, 2017.

ZANTON, G. I. et al. Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 7085–7101, 2014.

ZHOU, Y. F. et al. Methionine and choline supply alter transmethylation, transsulfuration, and cytidine 5'-diphosphocholine pathways to different extents in isolated primary liver cells from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 11384-11395, 2018.

ZHOU, Z. et al. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 8716-8732, 2016.

ZHOU, Z. et al. Hepatic activity and transcription of betaine-homocysteine methyltransferase, methionine synthase, and cystathionine synthase in periparturient dairy cows are altered to different extents by supply of methionine and choline. *The Journal of Nutrition*, v. 147, p. 11-19, 2017.

ZOM, R. L. G. et al. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 4016-4027, 2011.