

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Luís Otávio da Costa de Lima

**LISINA E METIONINA NA DIETA DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO  
MANTIDAS EM PASTAGENS DE AZEVÉM (*Lolium multiflorum* Lam.) E  
SUPLEMENTADAS COM CONCENTRADO DE BAIXO TEOR PROTEICO**

PPGZ/UFSM, RS

LIMA, Luís Otávio da Costa de

Mestre, 2017

Santa Maria, RS  
2017

**Luís Otávio da Costa de Lima**

**LISINA E METIONINA NA DIETA DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO  
MANTIDAS EM PASTAGENS DE AZEVÉM (*Lolium multiflorum* Lam.) E  
SUPLEMENTADAS COM CONCENTRADO DE BAIXO TEOR PROTEICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS  
2017

**Luís Otávio da Costa de Lima**

**LISINA E METIONINA NA DIETA DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO  
MANTIDAS EM PASTAGENS DE AZEVÉM (*Lolium multiflorum* Lam.) E  
SUPLEMENTADAS COM CONCENTRADO DE BAIXO TEOR PROTEICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**.

**Defesa em 26 de Janeiro de 2017**

---

**Julio Viégas, Dr. (UFSM)  
(Orientador)**

---

**Rogério Fôlha Bermudes, Dr. (UFPel)**

---

**Gilmar Alberto Meinerz, Dr. (UFFS)**

Santa Maria, RS  
2017

## AGRADECIMENTOS

Toda e qualquer conquista é realizada e obtida a várias mãos. O projeto desta pós-graduação é um sonho pessoal antigo e que com ajuda de muitos colegas e amigos foi possível.

Agradeço aos meus pais, Gelson e Silvana, pela educação, formação e conceitos passados, além do apoio na escolha profissional e são eles minhas referências pessoais, de conduta, posicionamento e integridade, com orgulho.

As manas Dani e Fran, e aos cunhados Ângelo, Luísa e Júnior, e ao afilhado Theodoro, que são razão de alegria e é para rever e voltar para esta família bárbara que todo o trabalho se justifica a cada manhã, pois este é sem dúvida, o bem maior!

A mulher da minha vida, Laura, pelo enorme carinho e apoio desde a decisão de participar do processo de seleção, vibrando comigo coma notícia da aprovação, além da gigante paciência e compreensão que foram fundamentais para a condução e elaboração de todo o projeto.

Agradeço a CCGL, através da direção, pela aposta e suporte neste processo, em especial ao chefe e amigo Jair Melo que foi um entusiasta e determinante para que tudo pudesse ser executado em paralelo com os deveres do dia a dia.

Agradeço também aos colegas e amigos do Tambo Experimental, Rudinei, Cláudio, Vitor, Ari, Joanito, Orlando, Ricardo e Alessandro, equipe esta que jamais exitou nos desafios propostos e conduziu com perfeição todos os procedimentos inerentes ao experimento. Não menos importantes, os colegas da Difusão Jader e Michel, que também cooperaram muito no processo, encarando viradas de noite monitorando e coletando material para as avaliações, e a Letícia, que não pode contar comigo em muitos momentos em que minha dedicação estava toda voltada as demandas da pós graduação. A equipe do Suprimento, que organizou amostras e resultados, em especial a Silvana e Ariane, e sempre estiveram auxiliando na busca de dados junto ao laboratório e de metodologias de análises.

Ao amigo Wagner Beskow, referência profissional, responsável pela minha decisão de viver e pesquisar produção de leite, que me mostrou um modelo de trabalho de encher os olhos, de muito pasto, muito leite e acima de tudo muita satisfação! Uma amizade e dívida que vou levar para a vida, um colega que nunca olhou relógio, tampouco calendário sempre que precisei de um costado.

Agradeço com entusiasmo ao professor e orientador Dr. Júlio Viégas, que acreditou e me deu a oportunidade de ingressar no programa de Pós Graduação em Zootecnia da UFSM,

e com paciência, entendeu algumas limitações que dificuldades que existiram pelo desafio de conciliar o projeto com o trabalho, mas sempre estive disposto a dividir os ensinamentos e com certeza os resultados obtidos ao longo destes dois anos e meio só foram possíveis pelo seu suporte e amizade.

Por fim a UFSM que abriu as portas para que tudo isso fosse possível e aos professores, que a cada dia contribuem para a formação de profissionais que possam transformar positivamente o setor agropecuário do nosso país.

A todos, meu muito obrigado!

“Sistemas forrageiros eficientes não acontecem por acaso, eles são planejados!”

(Southern Forages)

## RESUMO

### LISINA E METIONINA NA DIETA DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO MANTIDAS EM PASTAGENS DE AZEVÉM (*Lolium multiflorum* Lam.) E SUPLEMENTADAS COM CONCENTRADO DE BAIXO TEOR PROTEICO

AUTOR: Luís Otávio da Costa de Lima

ORIENTADOR: Júlio Viégas

Neste trabalho, avaliou-se os efeitos da adição dos aminoácidos essenciais L-lisina e DL-metionina na dieta de vacas em lactação, mantidas em pastagens de azevém anual e suplementadas com concentrado de baixo teor proteico. Foram utilizadas 20 vacas da raça holandesa em um delineamento experimental *crossover* (2x2), submetidas a dois tratamentos e dois períodos. Ambos tratamentos receberam dietas iguais, com exceção da inclusão ou não de 20 e 60g dos aminoácidos lisina e metionina, respectivamente, buscando atingir os níveis de 6,92% de lisina e 2,34% de metionina na proteína metabolizável, sugeridos pelo Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS). Não foram encontradas diferenças significativas para produção de leite (36,19 vs. 35,97kg), produção total de proteína bruta (1,14 vs. 1,15kg) e de lactose (1,62 vs. 1,66kg), teor de caseína (2,55 vs. 2,55%), contagem de células somáticas (309 vs. 363cél.mL<sup>-1</sup>), nitrogênio ureico no leite (12,40 vs. 12,15mg.dL<sup>-1</sup>) e ureia no sangue (25,01 vs. 25,09mg.dL<sup>-1</sup>) para os grupos controle e com adição de lisina e metionina, respectivamente. O grupo que recebeu a suplementação apresentou menor teor de gordura no leite (3,58 vs. 3,39%), mas igual volume de gordura produzido (1,29 vs. 1,21kg), não interferindo na produção de leite quando esta variável foi corrigida para 4% de gordura (33,8 vs. 32,6kg). O teor menor de gordura fez com que o teor de sólidos totais fosse menor no grupo que recebeu os aminoácidos (12,56 vs. 12,26%), embora este tenha apresentado teor igual de proteína (3,17 vs. 3,20%) e superior de lactose (4,48 vs. 4,61%). Os animais que receberam os aminoácidos também apresentaram teores inferiores de creatinina no sangue (0,74 vs. 0,89mg.dL<sup>-1</sup>) sugerindo uma mobilização menor de tecidos musculares, embora tenham apresentado níveis semelhantes de ureia na urina (264,15 vs. 351,30 mg.dL<sup>-1</sup>) e creatinina na urina (42,46 vs. 38,04mg.dL<sup>-1</sup>). O fornecimento dos aminoácidos lisina e metionina protegidos na degradação ruminal, não influenciou a produção total de leite, mas sim sua composição, além de reduzir os níveis de creatinina sérica.

**Palavras-chave:** aminoácidos, lisina, metionina, leite, pastagem temperada.

## ABSTRACT

### LYSINE AND METHIONINE TO HIGH YIELDING COWS GRAZING ANNUAL RYEGRASS (*Lolium multiflorum* Lam.) AND RECEIVING A LOW PROTEIN CONCENTRATE MEAL

AUTHOR: Luís Otávio da Costa de Lima

ADVISOR: Júlio Viégas

Current research looked into the effects of supplementing essential amino acids L-lysine and DL-methionine to lactating dairy cows, grazing annual ryegrass and receiving a low protein concentrate meal. Twenty Holstein cows were managed in a 2x2 crossover experimental design, with two treatments and two periods. Cows received the same diet in both treatments, except for the inclusion of 20g lysine and 60g methionine in one treatment. This aimed at supplying 6.92% and 2.34% of the metabolizable protein in lysine and methionine, respectively, as suggested by the Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS). No significant differences were found in milk (36,19 vs. 35,97kg), total crude protein (1,14 vs. 1,15kg) and lactose (1,62 vs. 1,66kg) yields, casein content (2,55 vs. 2,55%), somatic cell count (309 vs. 363 cél.mL<sup>-1</sup>), milk urea nitrogen (12,40 vs. 12,15mg.dL<sup>-1</sup>), and blood urea (25,01 vs. 25,09mg.dL<sup>-1</sup>) for the control and the amino acid supplemented treatments, respectively. The amino acid supplemented treatment presented a lower milk fat content (3,58 vs. 3,39%), but no differences yield (1,29 vs. 1,21kg), which led to the same 4% milk fat corrected milk yield (33,8 vs. 32,6kg). The lower milk fat content resulted in a lower total milk solids content (12,56 vs. 12,26%) in the amino acid supplemented treatment, in spite of this treatment presenting similar crude protein (3,17 vs. 3,20%) and lactose (4,48 vs. 4,61%) contents. Animals receiving the amino acid supplementation also presented lower creatinine blood (0,74 vs. 0,89mg.dL<sup>-1</sup>) suggesting a lower muscle tissue mobilization, in spite of their similar urine urea nitrogen test (264,15 vs. 351,30 mg.dL<sup>-1</sup>) and urine creatinine (42,46 vs. 38,04mg.dL<sup>-1</sup>). Rumen-protected lysine and methionine supplementation did not affect milk yield but did affect milk composition and reduced serum creatinine.

**Keyword:** Amino acids, lysine, methionine, milk, temperate pasture.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos perfis de AAEs entre os tecidos corporais e do leite com os de microrganismos ruminais e fontes comum de alimentos para ruminantes. ....	19
Tabela 2 - Resumo dos dados de desempenho lactacional de vacas leiteiras alimentadas com HMBi. ....	22
Tabela 3 - Dados climáticos obtidos junto a estação experimental do INMET durante o período experimental (agosto e setembro de 2015). ....	24
Tabela 4 - Análise química do solo da área experimental, Cruz Alta, RS. ....	25
Tabela 5 - Caracterização das vacas no período pré-experimental. ....	26
Tabela 6 - Composição dos alimentos utilizados para a formulação das dietas para vacas holandesas mantidas em pastagem de azevém anual ( <i>Lolium multiflorum</i> cv. Baqueano), suplementadas ou não com L-Lisina e DL-Metionina. ....	27
Tabela 7 - Composição da dieta experimental (kg MS.dia <sup>-1</sup> ) de vacas holandesas mantidas em pastagem de azevém anual ( <i>Lolium multiflorum</i> cv. Baqueano), suplementadas ou não com L-Lisina e DL-Metionina. ....	27
Tabela 8 - Níveis de nutrientes obtidos nas dietas experimentais (%MS). ....	31
Tabela 9 - Resultados de produção e composição de leite de vacas holandesas mantidas em pastagem de azevém anual ( <i>Lolium multiflorum</i> cv. Baqueano), suplementadas ou não com L-Lisina e DL-Metionina. ....	34

## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>11</b>
1.1. Introdução .....	11
1.2. Hipóteses .....	13
1.3. Objetivos .....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1. Sistema de produção baseado em pastagens temperadas e suplementação energética.....	14
2.2. Importância e princípios do balanceamento de aminoácidos.....	17
2.3. Requerimentos de lisina e metionina para vacas em lactação .....	20
2.4. Efeitos do balanceamento de aminoácidos essenciais.....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1. Local, época e clima .....	24
3.2. Período experimental.....	25
3.3. Animais experimentais .....	25
3.4. Tratamentos experimentais .....	26
3.5. Manejo dos animais e da pastagem.....	28
3.6. Controle leiteiro e amostragem .....	29
3.7. Determinação da composição química dos alimentos .....	30
3.8. Coleta de sangue e urina .....	31
3.9. Manejo nutricional .....	31
3.10. Delineamento experimental e análise estatística .....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
4.1. Produção e composição de leite .....	34
4.1.1. Produção de leite.....	35
4.1.2. Teor de gordura.....	37
4.1.3. Teor de proteína bruta e caseína .....	38
4.1.4. Nitrogênio ureico do leite .....	39
4.1.5. Teor de lactose .....	41
4.1.6. Teor de sólidos totais .....	43
4.1.7. Contagem de células somáticas .....	43
4.1.8. Teores de ureia e creatinina no sangue e urina .....	45
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

# 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1.1. Introdução

Com o aumento da interação entre países e mercados, produtores e consumidores, o cenário mercadológico de produção de leite tem apresentado oscilações cada dia mais dependentes do cenário econômico mundial o que inclui variações cambiais, exigências de mercados compradores e ações políticas, em detrimento às simples oscilações climáticas. Diante destes argumentos, é possível constatar que crescentes desafios têm sido impostos a produção de leite em todo o mundo, exigindo assim maior eficiência que permita maior estabilidade produtiva, além da elevação da rentabilidade na atividade.

Silva et al.(2008) comparando diferentes níveis de suplementação para a produção de leite, concluiu que os custos são sensivelmente reduzidos quando se consegue manter rebanhos produtivos à base de pastagens, utilizando-se recursos forrageiros de boa qualidade.

Economicamente, o sistema mais dependente da pastagem apresentou um custo sensivelmente menor e melhor resultado, além de que este modelo permite maior flexibilidade quanto à inversão de sistemas de produção, podendo ser intensificado ou desintensificado, dependendo da conjuntura econômica.

Entre os mecanismos que interferem neste nível de intensificação, o uso de nitrogênio se caracteriza como um dos mais importantes, visto que a deficiência do nutriente na planta resulta em queda acentuada na capacidade de suporte e ganho animal (Rocha et al., 2002).

Traduzindo em números, altas doses de adubação nitrogenada, entre 200 e 500 kg.ha<sup>-1</sup>, são necessárias para permitir taxas de lotação de 6 a 10 vacas.ha<sup>-1</sup> durante a estação chuvosa, de 6 a 7 meses (Santos et al., 2005). Pellegrini et al. 2010, encontraram valores de PB de 21,21% em azevém anual submetidos a diferentes doses de adubação nitrogenada, o que, de forma geral, supera a necessidade de vacas em lactação que necessitam consumir uma dieta com 14 a 18% de PB, garantindo o aporte necessário do nutriente (NRC, 2001).

Neste sentido, em sistemas onde através da forragem se obtém grande aporte de proteína, a suplementação de dietas para vacas de alta produção pode ser basicamente composta por carboidratos, em especial o amido, que será o precursor gliconeogênico da dieta destes animais. Esta suplementação irá permitir um balanço adequado de Energia

Metabolizável (EM) e Proteína Metabolizável (PM), de acordo com as exigências apresentadas no NRC 2001.

Ribeiro Filho & Fischer Sbrissia (2012), apontam que o uso de concentrados energéticos tem como propósito sincronizar o aporte de nitrogênio e energia, para o crescimento microbiano, com redução nas perdas ruminais de N e aumento no fluxo de nutrientes para o intestino delgado. Entretanto, Yang et al. (2010) afirma que os estudos conduzidos com o objetivo de melhorar a sincronia na disponibilidade de nutrientes para os microrganismos ruminais têm apresentado resultados contraditórios, sugerindo que o conceito de sincronia de nutrientes deve ser melhor investigado antes de aplicado às situações de campo. Neste contexto, existe o desafio da utilização dos atuais modelos de predição de dietas, visto que estes são desenvolvidos com base em estudos conduzidos em dietas totalmente misturadas em rebanhos confinados.

A Proteína Metabolizável é composta pelo aporte de aminoácidos fornecidos pela proteína microbiana sintetizada no rúmen, pela proteína oriunda da dieta, que não foi degradada no ambiente ruminal (PNDR) e pela proteína endógena, que são oriundas de descamação e tecidos reciclados do próprio animal (CHALUPA, 1975).

Contudo, além do correto balanceamento de energia e proteína da dieta, diversos estudos tem demonstrado a necessidade de um correto balanço de aminoácidos, principalmente lisina e metionina, que são os primeiros aminoácidos limitantes para a produção de leite e proteína do leite (NRC, 2001; SCHWAB et al.,1992). O correto balanceamento desses aminoácidos eleva a eficiência do uso da proteína metabolizável para a produção de proteína do leite, o que permite o fornecimento de dietas com menores teores de proteína bruta, permitindo uma maior eficiência do uso do nitrogênio, com menores riscos de fornecimento em excesso aos animais e menor risco de contaminação ambiental, sem afetar negativamente os níveis produtivos (DINN et al, 1998; LEE et al., 2012).

Tanto lisina quanto metionina foram identificadas como limitantes quando vacas em lactação foram alimentadas com dietas sem ou com uma mínima suplementação proteica (SCHWAB et al, 1976). Este nível reduzido de suplementação proteica caracteriza o sistema de produção de leite no inverno do Rio Grande do Sul como potencialmente deficiente na disponibilidade de ambos os aminoácidos, visto que a suplementação é basicamente energética.

Além das questões supracitadas, os perfis de lisina e metionina na proteína de quase a totalidade das fontes comerciais são inadequados, o que dificulta o balanceamento de rações

que atendam os níveis adequados destes AAE na proteína metabolizável para animais de alta produção, sem o uso de aminoácidos protegidos na degradação ruminal (SANTOS, 2006).

## **1.2. Hipóteses**

Quando utilizada em vacas, pastejando gramíneas temperadas e recebendo concentrado sem fontes proteicas, e que apresentam elevado requerimento em função da produção, a suplementação dos aminoácidos lisina e metionina, se protegidos da degradação ruminal, contribuem para a elevação da produção e afetam a composição do leite, além de elevarem a eficiência da utilização do nitrogênio pelo animal.

## **1.3. Objetivos**

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação de dos aminoácidos lisina e metionina para vacas de alta produção mantidas em pastejo de azevém anual e suplementadas com silagem de milho e concentrado de baixo teor proteico.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do ajuste do balanço de lisina e metionina da dieta na produção de leite;
- Avaliar as alterações físico-químicas do leite produzido a partir de dietas com balanço adequado de lisina e metionina;
- Avaliar a eficiência de utilização da proteína metabolizável em vacas com dietas com adequado balanço de lisina e metionina;

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Sistema de produção baseado em pastagens temperadas e suplementação energética

Sistemas de produção de leite com base em pastagens vêm novamente despertando o interesse de produtores em diversas regiões do mundo, especialmente de climas temperados e subtropicais do mundo, resultado de preços baixos, remoção de subsídios e tarifas, bem como elevação no custo da mão de obra, equipamentos e preocupações ambientais e de bem estar animal associados a sistemas mais intensivos de produção (DILLON, 2006).

Nos sistemas intensivos de produção de leite a pasto, o manejo correto da fertilidade do solo é o ponto de partida para o sucesso na atividade (MARTINS et al., 2004). A melhoria da fertilidade do solo aumenta a produtividade das pastagens e permite intensificar a sua utilização com maior taxa de lotação animal (LUGÃO et al., 2003).

Para os teores de fósforo e potássio utilizou-se de uma proposta elaborada por Fiorin et al. (2012) a partir dos dados adquiridos em Schlindwein (2003). Neste estudo foram utilizados experimentos conduzidos por diferentes instituições, em vários solos, com diferentes épocas de cultivo, tempo de condução, delineamento experimental e tratamentos. Foram utilizados 35 experimentos, com doses de P (18) e K (17), de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, permitindo re-calibrar os teores críticos de P e K do solo. Com base nos resultados relatados e discutidos em Schlindwein (2003), Fiorin et al. (2012) apresenta proposta de novas faixas de interpretação dos teores de P e K no solo, que estão sendo usadas desde 2008 no sistema cooperativo do Rio Grande do Sul.

Neste mesmo raciocínio, Schlindwein (2003) sugere doses maiores que as recomendadas pela Comissão... (2004) e estas, podem aumentar mais rapidamente os teores de fósforo e de potássio do solo e a produtividade das culturas. Seus estudos indicaram a necessidade de teores críticos de fósforo e de potássio maiores no sistema plantio direto do que os sugeridos pela Comissão... (2004) o que otimizaria a eficiência dos fertilizantes.

Ball e Lacefield (2011) definem o azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) como uma espécie de fácil estabelecimento e extremamente versátil, por se adaptar em uma ampla gama de tipos de solo. Caracteriza-se por uma gramínea frondosa, que produz forragem altamente palatável, que muitas vezes excede 70% de digestibilidade e 20% de proteína bruta na matéria

seca. Estas características permitem que os animais atinjam níveis de ingestão excepcionalmente altos e que resultam em excelente desempenho animal.

Neste mesmo contexto, Clark e Kanneganti (1998) caracterizam pastagens para alta produtividade como “jóvens e exuberantes”, apresentando de 18 a 24% de matéria seca, 18 a 25% de proteína bruta, 40 a 50% de fibra em detergente neutro e 1,53 a 1,67 Mcal.kg MS<sup>-1</sup>. Transformando isto em potencial, segundo o NRC (2001), uma vaca de 600kg, na terceira lactação e com 60 dias de parida e produzindo 30kg de leite.dia<sup>-1</sup>, apresenta uma necessidade de 10,958Mcal.dia<sup>-1</sup> para manutenção e 19,930Mcal.dia<sup>-1</sup> para produção. Se considerarmos a forragem citada anteriormente, seria necessária a ingestão de 18,5 a 20,18kg de matéria seca de pasto por dia, ou 1,23 a 1,68% do peso corporal em FDN, o que segundo o modelo de predição não seria possível.

Buscando maiores produções, fica evidente a necessidade de suplementação dos animais com alimentos concentrados, e foi neste contexto que Bargo et al. (2002) conduziram um estudo, onde vinte vacas Holandesas múltiparas (quatro delas fistuladas) foram divididas em 4 grupos para avaliar o efeito da suplementação com concentrado (1kg para 4kg de leite) quando em pastejo, submetidas a duas ofertas distintas de forragem (25 vs. 40kg.MS.vaca<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>). Verificaram que a suplementação com concentrado reduziu a ingestão de matéria seca de pasto em 2,0kg.dia<sup>-1</sup> em baixa oferta (17,5 vs. 15,5 kg.dia<sup>-1</sup>) e 4,4kg.dia<sup>-1</sup> em alta oferta (20,5 vs. 16,1 kg.<sup>-1</sup>).

Quando avaliaram a taxa de substituição, em baixa oferta de forragem foi de 0,26kg de pastagem.kg de concentrado<sup>-1</sup>, menor do que em alta oferta, que foi de 0,55kg de pasto.kg de concentrado<sup>-1</sup>. A ingestão total de matéria seca de ambos os tratamentos suplementados foi em média de 24,4kg.dia<sup>-1</sup> e a produção de leite de 29,8kg.dia<sup>-1</sup>, bem superior aos tratamentos não suplementados que foram de 19,1 e 22,2kg de leite.vaca<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> em baixa e alta oferta de pastagem, respectivamente, gerando uma resposta em leite à suplementação concentrada de 1,36 e 0,96kg de leite. kg de concentrado<sup>-1</sup> para ambas ofertas, baixa e alta, respectivamente.

Os autores ainda relacionam a substituição aos efeitos associativos negativos no rúmen (redução do pH ruminal, da taxa de digestão da pastagem e da digestibilidade da FDN) e a redução no tempo de pastejo, sendo este último o mais importante e respondendo quantitativamente em cerca de 80% da redução na ingestão de matéria seca de pastagem, colocando um desafio maior de manejo e suplementação para vacas de alta produção, com alta oferta de forragem, onde o desafio é potencializar a ingestão de matéria seca, tanto de pasto quanto de concentrado.

Para Hodgson e Brookes (1999), existem três fatores importantes que afetam a ingestão de matéria seca de forragem pelos animais em pastejo:

- 1) Requisitos de nutrientes das vacas (requerimento);
- 2) "Saciedade física" ou fatores associados a distensão ruminal (limitação física); e
- 3) Restrições de comportamento que limitem a máxima ingestão, relacionadas com a combinação entre o pasto e os fatores animais que influenciam o pastejo (manejo).

Após uma revisão de literatura, Bargo et al. (2003) concluiu que aumentando a suplementação concentrada em vacas que estavam exclusivamente em pastejo, se eleva a ingestão de matéria seca total em 24%, a produção de leite em 22%, a proteína do leite em 4%, mas se reduz o teor de gordura em 6% e o pH ruminal em 0,08. Ainda nesta revisão, os autores citam que a suplementação com concentrados energéticos, não afetaram a digestibilidade da matéria orgânica, mas reduziram a digestibilidade da fibra em detergente neutro e a ingestão de nitrogênio. Entretanto, vale ressaltar que nenhum dos estudos que embasaram estas conclusões foram realizados em animais com produção superior a 30kg de leite.dia<sup>-1</sup>.

Beskow (2016) salienta de forma intensiva para ajustar um modelo produtivo que atenda as necessidades fisiológicas do pasto e dos animais envolvidos no processo, necessidades estas que são grandes quando as variáveis são espécies e cultivares de alto potencial de incremento diário de matéria seca e animais de alta produção, quebrando o paradigma de que “vacas sobre pastagens são rebanhos de baixo mérito genético”. O Sistema Intensivo à Pasto com Suplementação (SIPS), como denomina o autor, busca maximizar a ingestão de matéria seca colhida pela própria vaca, onde a interferência do homem seja estritamente de ajustar o modelo e manejo diário que não limite o acesso a pastagens de alta qualidade e em grande quantidade, e mais do que isso, potencialize este consumo através de estratégias simples e de grande impacto.

Reforça ainda, que a colheita de pasto pelo animal é a base do SIPS, mas que a utilização de volumosos conservados e a suplementação são estratégias fundamentais para ajustar as oscilações do crescimento do pasto garantindo volumoso de qualidade todos os dias e atingir altas produtividades na vaca otimizando componentes presentes na pastagem (proteína por exemplo). Sem a suplementação, em pastagens de alta qualidade utilizadas no RS, é possível fazer com que as vacas colham 17kg MS.pasto<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, convertendo isto em 17litros.vaca<sup>-1</sup>.dia.<sup>-1</sup> como regra geral, mesmo sendo possível, em momentos altamente ajustados (vaca em pico de ingestão em alta qualidade de forragem) chegar a 22litros.vaca<sup>-1</sup>.



$^1$ .dia $^{-1}$ . A partir desta cifra, o aumento de produtividade é totalmente dependente da suplementação, que quando ajustada, responde entre 1,5 e 2kg leite.kg concentrado $^{-1}$ , atingindo a máxima rentabilidade quando o rebanho atinge média de produção em torno de 34litros.vaca $^{-1}$ .dia $^{-1}$ .

Quando atendidas as demandas nutricionais, de energia e proteína metabolizáveis, voltamos os desafios a atender o requerimento de aminoácidos, pois neste ponto, a produção de proteína microbiana já está otimizada, mas não consegue suprir toda a demanda das vacas de alta produção. Neste aspecto, metionina e lisina foram identificadas como os aminoácidos mais limitantes para a síntese de proteína do leite em vacas em lactação alimentadas com silagem de milho, e frequentemente a histidina em vacas de alta produção alimentadas com pastagens (KELLEY & HARRINGTON, 2003).

## **2.2. Importância e princípios do balanceamento de aminoácidos**

O balanceamento de dietas para vacas em lactação vem sofrendo constantes ajustes com o intuito de potencializar a fermentação ruminal e melhorar a eficiência produtiva. Uma importante evolução nos ajustes das necessidades de proteína tem permitido avanços importantes em produção e rentabilidade, desde quando os aportes proteicos eram medidos em proteína bruta (PB), na primeira versão do NRC (1978), posteriormente divididos em proteínas degradáveis no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR), chegando à proteína metabolizável (PM) e mais recentemente chegando ao balanceamento de aminoácidos essenciais em porcentagem da PM.

Os aminoácidos são mencionados para destacar o impacto que exercem no metabolismo e da provável importância do ajuste na nutrição de aminoácidos tem sobre a saúde, a fertilidade e desempenho da produção de animais. Estes aminoácidos são classificados de acordo com algumas particularidades específicas, pois alguns não podem ser sintetizados pelo animal ou pelo menos com a rapidez necessária para satisfazer a síntese de proteínas. Estes foram denominados Aminoácidos Essenciais (AAE). Os demais são igualmente necessários para a síntese de proteínas, porém podem ser sintetizados pelo próprio animal.

A Lisina (Lis) e a Metionina (Met), juntamente com a Arginina (Arg), a Histidina (His), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Fenilalanina (Phe), Treonina (Trh), Triptofano (Trp) e Valina (Val) fazem parte dos Aminoácidos Essenciais (AAE). (NRC,2001; SANTOS, 2007).

Embora existam linhas de pesquisa que abordam um complexo grupo de AAAs, os primeiros aminoácidos limitantes para a produção são a lisina e a metionina, de acordo com diversas pesquisas com vacas em lactação onde tem sido demonstrado que concentrações crescentes de lisina e metionina em relação à proteína metabolizável nos níveis recomendados têm aumentado a eficiência do uso da PM para síntese da proteína do leite (SCHWAB, 2012; NRC, 2001). Lisina foi identificada como o primeiro aminoácido limitante em novilhas pós desmame, novilhas em crescimento (ABE et al, 1997) e vacas em lactação (SCHWAB et al, 1992), quando a base alimentar era milho e outros alimentos oriundos de milho eram as principais fontes de proteína não degradável no rúmen da dieta. Já a metionina foi identificada como principal limitante para novilhas pós desmame (SCHWAB et al, 1982), novilhas em crescimento (ROBERT et al., 1994) quando pequenas quantidades de milho eram suplementadas, quando dietas de alto teor de forragem oriundas de pastagem era fornecidas ou quando a maioria do suprimento de proteína não degradável de rúmen era proveniente de subprodutos oriundos da soja.

Na tabela abaixo, são apresentadas diferenças importantes entre os perfis de AAA dos principais alimentos utilizados na nutrição de vacas em lactação e os perfis dos produtos da síntese de tecidos corpóreos e leite.

**Tabela 1 - Comparação dos perfis de AAAs entre os tecidos corporais e do leite com os de microrganismos ruminais e fontes comum de alimentos para ruminantes.**

	Lisina	Metionina
	% AAAs Totais	
<b>Produtos Animais</b>		
Leite	16	5,5
Tecidos	16,3	5,1
<b>Microorganismos Ruminais</b>		
Bactérias	15,8	5,2
Protozoários	20,6	4,2
<b>Alimentos Volumosos</b>		
Feno de Alfafa	12,4	3,8
Silagem de Alfafa	12,1	3,8
Silagem de Milho	7,9	4,8
Feno de gramínea	10,5	3,9
Silagem de gramínea	10,1	3,7
<b>Alimentos Concentrados</b>		
Milho quebrado	7,1	5,3
Farelo de Soja	13,9	3,2

Fonte: Adaptado por Santos & Mendonça (2006) do NRC (2001)

Com os dados apresentados na Tabela 1, fica evidente que potencializar a produção de proteína microbiana através do ajuste entre proteína degradável no rúmen em balanço de carboidratos da dieta é fundamental, visto que a proteína microbiana é compatível com a necessidade para otimizar a resposta animal. Entretanto, para vacas de alta produção, a proteína microbiana não é capaz de suprir toda a exigência em proteína metabolizável do animal, fazendo com que o aporte de proteína não degradável no rúmen passe a ter papel fundamental (SANTOS & PEDROSO, 2006).

Equilibrar, portanto, a dieta para estes dois AAAs é de fundamental importância na utilização eficiente de N, trazendo benefícios ao produtor e as suas vacas, especialmente quando houver interesse de otimizar a saúde do rebanho e sua rentabilidade (SCHWAB, 2012). Segundo este autor, o equilíbrio de lisina e metionina na proteína metabolizável têm levado a muitos benefícios importantes, incluindo:

1) redução da necessidade de suplementar PNDR para um dado nível de produção de leite, ou aumento na produção de leite e proteína do leite com a mesma ingestão de PNDR; 2) redução da excreção de N por unidade de leite ou de proteína do leite produzidas; 3) mudanças mais previsíveis na produção de leite e proteína do leite para mudanças na oferta PNDR; 4) melhora na saúde e reprodução do rebanho; e 5) aumento rentabilidade do rebanho.

Outros benefícios com a adição de lisina e metionina na dieta de vacas em lactação, como melhoria no escore de locomoção e saúde no período de transição (pré e pós parto imediatos), também são citados por Garthwaite et al. (1999); NRC (2001); Rulquin e Verite (1993); Schwab et al. (2007), Sloan (2005); e Lee et al. (2012).

Porém, o fornecimento de suplemento de lisina e metionina na forma natural não foram considerados eficazes, porque ocorre uma rápida deaminação em nível ruminal (ONODERA, 1993). Assim, é de fundamental importância que estes aminoácidos sejam fornecidos sob alguma forma de proteção que permita o escape da degradação em nível ruminal, tornando-os não degradáveis no rúmen e disponíveis para a absorção ao nível de intestino delgado (NRC, 2001).

### **2.3. Requerimentos de lisina e metionina para vacas em lactação**

As primeiras recomendações e parâmetros para balanceamento de aminoácidos utilizados de forma consistente por nutricionistas foram expressas pelo NRC 2001, utilizando experimentos in vivo de dose resposta em grupos “controle” e “tratamentos”, chegando a um ponto de estabilidade após a plotagem dos resultados, todos expressos em % do AA em relação à proteína metabolizável da dieta, de 7,2% e 2,4% para Lisina e Metionina respectivamente (NRC, 2001).

Outro modelo de predição de requerimentos de AAes, o Sistema Cornell (CNCPS), estima o suprimento de aminoácidos utilizando a degradação da proteína no rúmen e a síntese de proteína microbiana, calculada pelo aporte de carboidratos fermentáveis no rúmen, a eficiência da síntese microbiana e a taxa de passagem da digesta pelo ambiente ruminal. Já os requerimentos foram quantificados de acordo com a composição dos tecidos e leite, além da eficiência de utilização dos aminoácidos nas sínteses proteicas. Os valores sugeridos pelo CNCPS são 7,46% e 2,57% (O’CONNOR et al., 1993).

Como última versão do modelo de predição da Universidade de Cornell, o sistema AMTS - Cattle utiliza base de cálculos do modelo CNCPS, porém, modificou as frações mais

solúveis dos carboidratos (como açúcares, nitrogênio não proteico etc.) ajustando as taxas de passagem destas com a fase líquida da digesta e não a sólida, além de ajustar as equações das taxas de passagem. Isto acarretou em menor digestibilidade dos carboidratos em nível ruminal, aporte maior de proteína não degradável no rúmen, menor fluxo de proteína microbiana e conseqüentemente menor fluxo de lisina e metionina para o intestino delgado. Os requerimentos utilizados foram obtidos através de meta-análise das publicações e os valores foram estabelecidos em 6,93% de Lisina e 2,34% de metionina na proteína metabolizável (WHITEHOUSE et al., 2013).

#### **2.4. Efeitos do balanceamento de aminoácidos essenciais**

Mais experiências recentes sublinham o valor de concentrações crescentes de Lisina e Metionina no aumento da eficiência do uso de PM para a produção de leite e proteína do leite (por exemplo, Noftsker e St-Pierre, 2003; Chen et al., 2011).

Em um grupo de vacas primíparas e múltiparas, incrementando metionina na proteína metabolizável, de 1,73% para 2,09% (21% de incremento) para atingir uma relação mais favorável com lisina (6,7-6,8% da PM), Noftsker & St-Pierre (2003) conseguiram reduzir a proteína não degradável no rúmen de 7,6 a 6,4% da matéria seca da dieta atingindo maior porcentagem de proteína do leite (3,09 vs. 2,98%) e maior produção total de proteína (1,44 vs. 1,38kg), porém não identificaram diferença entre a produção total de leite entre dietas balanceadas e não balanceadas, 46,2 vs. 46,6 kg, respectivamente.

Avaliando a adição de metionina em distintos tratamentos com o intuito de avaliar diferentes fontes comerciais de suplementação, Chen et al. (2011) não encontraram diferenças na produção de leite com a suplementação (média de 41,7 kg), mas identificaram diferenças na porcentagem de proteína do leite, 3,17% para os grupos suplementados contra 3,03% do grupo controle. O estudo indicou um retorno sobre o custo alimentar positivo em US\$ 0,30 quando são fornecidas dietas com menor teor de proteína não degradável no rúmen e balanço adequado de aminoácidos.

Em outro experimento, utilizando quatro vacas holandesas frísias, duplamente fistuladas (rúmen e duodeno), delineadas em quadrado latino, com duas semanas de duração de cada período e quatro diferentes dietas, sendo duas com dois níveis de proteína na dieta (151 e 169 g/kg de matéria seca) e dois níveis de adição de aminoácidos (controle e 8g de metionina + 24g de lisina) protegidos em nível ruminal. Verificou-se que o aumento da

concentração de N na dieta tendeu a aumento da produção de leite ( $P < 0,06$ ), enquanto que a adição AA protegidos um aumento na proteína do leite de tal modo que ambos os fatores tendeu ao aumento na produção de proteína verdadeira do leite (+ 40 g), porém não de forma significativa ( $P < 0,1$ ). A concentração de caseína de leite foi melhorada com a adição AA protegidos, com efeito na concentração de uréia do leite (ROBERT et al., 1989).

Greco (2008), apresentou uma compilação de 6 trabalhos utilizando éster isopropílico análogo de metionina (HMBi), demonstrando que o incremento na produção de leite e gordura não são consistentes, mas existe uma tendência importante no incremento no teor de proteína do leite. O resumo do compilado do autor encontra-se na Tabela 02, abaixo:

**Tabela 2 - Resumo dos dados de desempenho lactacional de vacas leiteiras alimentadas com HMBi.**

Leite kg.dia <sup>-1</sup>	Leite kg.dia <sup>-1</sup>	Gordura (%)	Proteína (%)	
<b>Controle</b>	<b>HMBi</b>			
38,5	38,3	+ 0,07	+ 0,11	Noftsgger, et al., 2005
39,8	42,3	+ 0,21	+ 0,16	St-Pierre & Sylvester, 2005
42	42	-	+ 0,11	Hindle, et al., 2006
-	-	-	+ 0,12	Jurjanz, et al., 2006
31,4	31,5	+ 0,04	+ 0,1	Rulquin, et al., 2006
25,6	25,6	- 0,08	- 0,01	Strzetelski, et al., 2006

Fonte: Greco, 2008.

Contudo, outras variáveis devem ser levadas em consideração quando este tipo de tecnologia é empregada, como a fase da lactação, além do simples cálculo de requerimento. Polan et al. (1991) demonstra isto utilizando a análise de produção de 259 vacas, durante todo período lactacional, alimentadas com silagem de milho e milho moído como dieta basal, que formaram 5 grupos, além do controle (sem suplementação adicional) mais dois grupos em função da suplementação de farelo de soja ou glúten de milho, sendo estes dois últimos subdivididos em dois subgrupos cada: com e sem a adição de lisina e metionina protegidos no ambiente ruminal. No estudo, as vacas indicam a influência da lisina de forma quadrática na média e no total da lactação no espaço de tempo, demonstrando a importância do período produtivo das vacas à resposta.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local, época e clima

O experimento foi realizado no período de agosto a setembro de 2015 e conduzido no Tambo Experimental, Unidade de Pesquisa da Cooperativa Central Gaúcha LTDA / FUNDACEP (CCGL TEC), situado na RS 342, km 149, município de Cruz Alta, RS. Cruz Alta esta localizada na região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul, à latitude de 28°36' Sul, longitude 53° 40' Oeste e a uma altitude média de 409 metros.

O clima dominante é do tipo Cfa da Classificação de Koeppen (KOTTEK et al., 2006), onde descreve este sendo subtropical úmido, com verão quente acima dos 22°C. A temperatura média anual é de 18°C e a precipitação normal é de 1700 mm. Os dados climáticos durante o período experimental foram obtidos junto a estação meteorológica automática do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) localizado na própria CCGL.

**Tabela 3 - Dados climáticos obtidos junto à estação experimental do INMET durante o período experimental (agosto e setembro de 2015).**

Mês	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Média (°C)	Precipitação (mm)	Dias de Chuva	Umidade Relativa (%)
Agosto	31,1	6,7	18,6	99,8	6	70,0
Setembro	32,0	0,6	17,0	141,0	8	71,7

Fonte: Base de dados da estação meteorológica do INMET na CCGL.

O solo do local é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico com textura argilosa (EMBRAPA, 1999), pertencente à Unidade de Mapeamento de Passo Fundo (BRASIL, 1973). As características químicas, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, para a caracterização da condição inicial da área experimental estão apresentadas na Tabela 4, a seguir:



**Tabela 4 - Análise química do solo da área experimental, Cruz Alta, RS.**

	Arg.	pH	CTC	Al	Ca	Mg	P	K	M.O	Bases
	%		-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----				--mg/dm <sup>3</sup> --		-----%-----	
0-20cm	54,0	5,6	13,2	0,0	6,3	2,5	16,4	193	2,7	70,4

Onde: Arg.: argila; pH: pH em água; CTC: capacidade de troca de cátions; Al: alumínio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; P: fósforo; K: potássio; M.O: matéria orgânica; Bases: saturação por bases; Registro no laboratório de solos da CGL: 27858

### 3.2. Período experimental

A fase pré-experimental ou de adaptação, foi realizada por 21 dias, tendo início dia 05 de agosto de 2015, quando os animais foram agrupados e passaram a receber a dieta padrão.

O período experimental de 42 dias ocorreu nos meses de agosto e setembro de 2015, sendo subdividido em dois subperíodos de 21 dias cada com inversão dos tratamentos entre grupos. Os primeiros 19 dias de cada período experimental foram para a adaptação dos animais e nos últimos dois dias realizadas as coletas dos dados.

### 3.3. Animais experimentais

Para a realização do estudo, foram utilizadas 20 vacas da raça Holandês com peso corporal médio de 630 kg e média de 142 dias em lactação no início do experimento. Nos 02 últimos dias do período pré-experimental, foram mensurados a produção e composição individual de leite, além de quantificados os níveis de ureia e creatinina do sangue e urina.

Os animais foram alocados em dois grupos homogêneos nos quesitos ordem de lactação e produção individual, subjugando que possíveis desequilíbrios em outras variáveis seriam minimizados pelo delineamento experimental (crossover).

Os dados estão expressos na Tabela 5, abaixo.

**Tabela 5 - Caracterização das vacas no período pré-experimental.**

Característica	Valor Médio	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
Número de partos	3,2	0,5	5	1
Dias em lactação	142	50	182	40
<i>Produção e composição de leite</i>				
Produção de leite (kg.dia <sup>-1</sup> )	35,34	5,82	47,47	26,80
Proteína (%)	3,05	0,38	3,80	2,45
Caseína (%)	2,43	0,11	2,67	2,24
Gordura (%)	3,08	0,12	3,36	2,93
Lactose (%)	4,57	0,14	4,74	4,29
Sólidos Totais (%)	11,76	0,47	12,76	10,92
Ureia	10,02	1,20	12,53	8,49
CCS (cs.ml <sup>-1</sup> )	352	494	1512	9
<i>Níveis de ureia e creatinina no sangue</i>				
Creatinina (mg.dL <sup>-1</sup> )	0,88	0,12	1,19	0,74
Ureia (mg.dL <sup>-1</sup> )	16,40	4,12	25,00	10,00
<i>Níveis de ureia e creatinina na urina</i>				
Creatinina (mg.dL <sup>-1</sup> )	39,58	7,89	51,48	26,40
Ureia (mg.dL <sup>-1</sup> )	453,25	199,21	825,00	140,00

### 3.4. Tratamentos experimentais

No presente estudo foi avaliada a inclusão de 20g.vaca<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de DL-Metionina (MetiPEARL<sup>TM</sup> - Kemin) e 60g.vaca<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de Monocloridrato de L-Lisina (LysiPEARL<sup>TM</sup> - Kemin) na dieta de vacas em lactação mantidas em pastagens de azevém anual.

Ambos os produtos comerciais são fontes de aminoácidos encapsulados por óleo vegetal hidrogenado, adquirindo proteção parcial da degradação no ambiente ruminal (“by pass”), chegando com alta liberação lenta no intestino (“slow-release”), indicados para utilização em ruminantes. A empresa garante uma concentração mínima de 50 e 47,5% de metionina e de L-Lisina, respectivamente, além de 60% de proteção ruminal e 90% de liberação no intestino para ambos aminoácidos, ambos valores obtidos em avaliações *in vitro*.

Os aminoácidos foram adicionados diariamente e diretamente em cochos individualizados e misturados ao concentrado, monitorando as sobras a fim de garantir que houvesse a certeza de consumo pelos animais. O concentrado foi adquirido já misturado e peletizado na COTRIEL - Cooperativa Tritícola de Espumoso, cuja formulação e composição foi previamente calculada sobre as análises dos alimentos.

Para os cálculos da formulação do concentrado, da dieta total e do nível necessário de lisina e metionina para balanceamento dos aminoácidos, foi utilizado o software AMTS – Cattle Professional v.4.5 da Universidade de Cornell. A composição dos alimentos encontra-se na Tabela 06, a composição da dieta encontra-se na Tabela 07, abaixo.

**Tabela 6 - Composição dos alimentos utilizados para a formulação das dietas para vacas holandesas mantidas em pastagem de azevém anual (*Lolium multiflorum* cv. Baqueano), suplementadas ou não com L-Lisina e DL-Metionina..**

Alimentos	MS	PB	FDN	FDA	Amido	EE	MM	Met	Lis
Milho moído	88,3	9,5	13,1	4,4	65,0	4,4	1,5	1,90	3,30
Casquinha de soja	91,2	12,9	65,9	47,5	1,7	3,1	5,0	1,09	6,30
Azevém 4n	14,9	28,1	48,6	22,4		4,2	7,3	1,64	4,85
Silagem de milho	34,8	8,2	39,5	20,5	34,9	4,4	3,4	1,59	2,80
<i>MetPEARL</i> <sup>TM</sup>	99,0	55,0				44		100	
<i>LysiPEARL</i> <sup>TM</sup>	99,0	40,0				50			100

Onde: MS: Matéria Seca em % da Matéria Natural; PB: Proteína Bruta em % da MS; FDN: Fibra em Detergente Neutro em % da MS; FDA: Fibra em Detergente Ácido em % da MS; EE: Extrato Etéreo em % da MS; MM: Matéria Mineral em % da MS; Met: Metionina em % da PB; Lis: Lisina em % da PB.

**Tabela 7 - Composição da dieta experimental (kg MS.dia<sup>-1</sup>) de vacas holandesas mantidas em pastagem de azevém anual (*Lolium multiflorum* cv. Baqueano), suplementadas ou não com L-Lisina e DL-Metionina.**

INGREDIENTE	CONTROLE	Lis/Met
Milho moído	5,0	5,0
Casquinha de soja	1,8	1,8
Mineral	0,3	0,3
Pastagem de Azevém*	12,5	12,5
Silagem de milho	4,0	4,0
<i>MetPEARL</i> <sup>TM</sup>		0,020
<i>LysiPEARL</i> <sup>TM</sup>		0,060
<b>CONSUMO PREDITO</b>	<b>23,35</b>	<b>23,43</b>

\*Consumo estimado

Para o presente estudo, e em função da qualidade estimada da pastagem, foi necessário utilizar a silagem de milho na dieta para evitar um aporte excessivo de proteína metabolizável, e sobre este ajuste de volumoso, é que foram definidos os ingredientes do concentrado.

Ainda para melhores ajustes, utilizou-se a casquinha de soja como ingrediente da dieta com o intuito de reduzir a participação do amido na dieta, visto que a casquinha de soja é um alimento com perfil diferente de carboidrato comparado ao milho por exemplo, com teores superiores de FDN e rico em pectina, o que nos garante um aporte energético importante mas diluindo os picos de fermentação da dieta no ambiente ruminal, desafio imposto por elevados níveis de CNF na dieta e a concentração destes em apenas dois tratamentos diários.

### **3.5. Manejo dos animais e da pastagem**

Os animais foram mantidos e manejados em um único grupo, identificados e diferenciando entre os tratamentos apenas pela adição dos aminoácidos no cocho, juntamente com o concentrado e a silagem de milho, o que caracteriza um sistema intensivo a pasto com suplementação (SIPS), proposto por Beskow (2016). O fornecimento da silagem de milho e concentrado era feito em cochos individualizados, após ambas as ordenhas, da manhã e da tarde, e os aminoácidos eram fornecidos em dose única diária, apenas pela manhã.

A formação da pastagem foi realizada em sistema de plantio direto onde a cultura antecessora era pastagem de milheto (*Pennisetum americanum*), dessecado 18 dias antes com 4 litros de glyphosate ( $480\text{g ia.l}^{-1}$ ). A semeadura realizada dia 04 de abril de 2015, com uma adubação na linha de 250kg de DAP (Diamônio Fosfato), e 200kg Cloreto de Potássio, totalizando 122kg de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e 120kg de  $\text{K}_2\text{O}$ .

A cultivar de azevém utilizada foi o cv. Baqueano, que é de material tetraplóide do tipo *westerwoldicum*, ou seja, azevém anual, que induz o florescimento por dias longos e não necessita de frio. Obtido pela Biscayart, na Argentina, apresenta grande produção vegetal e grande capacidade de conversão em leite (LIMA & BOSS, 2013).

O manejo dos animais na pastagem foi de forma rotacionada, dividindo a área em 45 piquetes de 3 mil metros quadrados cada, onde os animais recebiam três piquetes ao dia, sendo o primeiro após a ordenha e trato da manhã, outro ao meio dia e o terceiro após a ordenha e trato da tarde, buscando atender os horários preferenciais de pastejo (HODGSON, 1990). O tamanho dos piquetes era superdimensionado, a fim de que houvesse grande

capacidade de seleção pelas vacas, considerando que em média, eram ofertados de 900 a 1.000kg de MS por dia aos animais e o consumo predito era de 250kg de MS para o rebanho experimental. Para reduzir o resíduo de forragem nos piquetes, após o pastejo, era utilizado o repasse com animais não experimentais e/ou roçados.

A oferta de forragem seria corrigida quando a porcentagem de desaparecimento ultrapassasse 40%, limite para que não houvesse restrição de consumo em manejo rotativo, conforme descrito por Delagarde et al. (2006). Durante todo o período experimental, não se verificou níveis de consumo próximos ao limite, portanto desnecessário qualquer ajuste frente ao dimensionamento dos piquetes.

O ponto adotado de entrada dos animais nos piquetes foi quando a altura estivesse entre 15 e 25cm de altura, o que caracterizava o ponto correto de entrada dos animais segundo Ball e Lacefield (2011). Assim, o período de ocupação do piquete era fixo, porém o intervalo entre pastejos era variado, dependendo da taxa de crescimento do pasto e interceptação luminosa do dossel forrageiro.

### **3.6. Controle leiteiro e amostragem**

A produção de leite foi registrada nos dois últimos dias de cada um dos períodos experimentais. O equipamento utilizado foi um medidor automático que faz a medição por volume através de um copo coletor. As coletas das amostras para determinação da composição de leite foram feitas por um amostrador instalado no equipamento de ordenha, que coleta através de um gotejador, para que seja representativo de coleta durante toda a ordenha.

As amostras coletadas, contendo um volume de leite de aproximadamente 50 ml de cada animal, amostra esta composta por 30ml obtidos na ordenha da manhã e 20ml na ordenha da tarde, e que posteriormente eram acondicionadas em frasco contendo Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) para conservação da qualidade das amostras. Os frascos eram identificados com o número do animal e acondicionados em caixas isotérmicas com barras de gelo reciclável, com temperatura mantida entre 2° e 6°C, e enviadas ao Laboratório da Universidade de Passo Fundo (UPF) SARLE, para fins de análise da composição.

A composição de gordura, proteína, lactose, caseína, sólidos totais e nitrogênio ureico foram determinados por espectrofotometria com radiação infravermelha, utilizando equipamento Bentley® 2000 (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA). A CCS por

citometria de fluxo utilizando equipamento Somacount® 300 (BentleyInstruments, Chaska, MN, EUA), enquanto o nitrogênio uréico pelo método Infravermelho - PO ANA 009. Bentley Instruments® ChemSpec150.

A correção do leite para 4% de gordura foi calculada através da fórmula de Gaines (1928), apresentada na equação abaixo:

$$\text{Leite corrigido para 4\%G (kg.dia}^{-1}\text{)} = 0,4 * \text{PL} + 15 * \text{Gordura}$$

Onde:

PL= Produção de Leite em kg.dia<sup>-1</sup>

Gordura= Gordura total produzida em kg.dia<sup>-1</sup>

### 3.7. Determinação da composição química dos alimentos

As análises dos alimentos foram realizadas no início do período de adaptação ou pré-experimental, para a realização de um correto balanceamento da dieta e dos aminoácidos presentes nesta. Para as pastagens, foram feitas 10 coletas de 0,016m<sup>2</sup> cada, de pastejo simulado, considerando uma fração muito semelhante ao colhido pelos animais, e somadas as 10 amostras para compor a amostra composta.

As amostragens da silagem de milho foram feitas com um cano de PVC de 50mm com uma das extremidades “dentada”, para conseguir penetrar no painel do silo a uma profundidade de 30cm. A soma das 10 amostras distribuídas em todo o painel do silo, compondo a amostra composta. Já os ingredientes do concentrado foram recebidos pela indústria que realizou a mistura para que fossem analisados.

Todas as amostras foram analisadas pelo método Near Infrared Spectroscopy (NIRS), processadas no laboratório de bromatologia do 3RLab, em Lavras/MG, onde foram quantificados os valores da Digestibilidade da FDN no trato digestivo total (TTNDFD), taxa de passagem do FDN (kd) utilizando digestibilidade da FDN em 24, 30 e 48 hrs, matéria seca (MS), proteína bruta (PB), proteína solúvel em % da PB (PS), proteína indegradável em detergente ácido (PIDA), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), proteína indegradável em detergente neutro (PIDN), extrato etéreo (EE), cinzas, carboidratos não fibrosos (CNF), lignina, açúcares, amido, cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), enxofre (S), pH.

### 3.8. Coleta de sangue e urina

As coletas de sangue eram realizadas no último dia do período experimental, feitas por um médico veterinário, e coletando diretamente da veia caudal.

As amostras de urina eram obtidas por massagem suave da região vulvar (Ortolani, 2003).

Ambas as amostras foram enviadas ao Laboratório de Análises Clínicas – Multianálises onde as amostras sanguíneas foram avaliadas através do equipamento Sysmex XS-1000i, e as urinárias através do EOS Bravo Forte Plus.

### 3.9. Manejo nutricional

As dietas experimentais apresentaram os níveis de nutrientes apresentados na Tabela 09, abaixo:

**Tabela 8 - Níveis de nutrientes obtidos nas dietas experimentais (%MS).**

Nutrientes (% MS)	Controle	Lis/Met
Proteína bruta	19,45	19,53
Fibra em detergente neutro	40,36	40,23
Fibra em detergente ácido	19,91	19,84
Amido	21,67	21,6
Extrato etéreo	4,18	4,34
Matéria mineral	2,28	2,29
Proteína metabolizável (g)	2.487	2.507
Energia metabolizável (Mcal)	40,90	41,17
<i>Metionina (% da PM)</i>	2,23	2,48
<b><i>Metionina (% do requerimento)</i></b>	<b>92</b>	<b>102</b>
<i>Lisina (% da PM)</i>	6,64	7,05
<b><i>Lisina (% do requerimento)</i></b>	<b>96</b>	<b>102</b>
<b><i>LISINA : METIONINA</i></b>	<b>2,97:1</b>	<b>2,85:1</b>

Importante salientar que para a realização do balanceamento o item Proteína Bruta não foi considerado no balanceamento da dieta, somente a proteína metabolizável, visto que o desafio era atender a demanda de PM sem adicionar fontes proteicas no concentrado. Porém, quando comparado ao preconizado pelo NRC (2001), existe uma sobra de proteína bruta na dieta predita, o que será avaliado no decorrer da discussão, sobre a composição de proteína do leite e nitrogênio ureico do leite (NUL).

A quantidade de suplementação inclusa na dieta foi feita com base na % do requerimento, que no modelo utilizado é de 6,93% da PM para lisina e 2,34% da PM para metionina.

### 3.10. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi em crossover (2x2), onde tivemos dois tratamentos e dois períodos, onde os animais foram agrupados de forma homogênea de acordo com a produção de leite e ordem de parição.

Para a análise dos dados, foi utilizado o pacote estatístico SAS<sup>®</sup> versão 8.1 para a plataforma Windows (SAS INSTITUTE, 2001). Os dados foram analisados através de PROC GLM, seguindo um modelo misto onde existe um efeito fixo e um aleatório do animal, além de efeito aleatório residual. Análise de variância foi comparada pelo teste t, com 5% de significância. Os dados de contagem de células somáticas (CCS) foram transformados utilizando “logCCS” para que pudessem ser analisados e identificados *outliers* através do Teste de distância de Cook, para remover dados discrepantes de animais mastíticos por exemplo, que pudessem interferir no resultado final do experimento.

O modelo estatístico adotado foi para as variáveis experimentais foi o seguinte:

$$Y_{ijkl} = \mu + \delta_l + \beta_{i(l)} + \alpha_j + \gamma_k + \alpha\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Com as seguintes premissas:

1.  $Y_{ijkl}$  é o efeito do animal  $i$ , tratamento  $j$ , período  $k$  e da sequência  $l$  ( $i = 20, j = 2, k = 2$  e  $l = 2$ ).
2.  $\mu$  é a média geral.



3.  $\delta_l$  é o efeito fixo da sequência  $l$ ;  $\sum \delta_l = 0$ .
4.  $\beta_{i(l)}$  é o efeito aleatório do animal  $i$  dentro da sequência  $l$ ;  $\beta_{i(l)} \sim N(0, \sigma_\beta^2)$ .
5.  $\beta_{i(l)}$  são independentes.
6.  $\alpha_j$  é o efeito fixo devido ao tratamento  $j$ ;  $\sum \alpha_j = 0$ .
7.  $\gamma_k$  é o efeito fixo do período  $k$ ;  $\sum \gamma_k = 0$ .
8.  $\alpha\gamma_{jk}$  é o efeito fixo da interação do tratamento  $j$  com o período  $k$ ;  $\sum \alpha\gamma_{jk} = 0$ .
9.  $\varepsilon_{ijkl}$  é o erro aleatório (variação não explicada pelo modelo);  $\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ .
10. Os  $\varepsilon_{ijkl}$  são independentes.
11. Os componentes aleatórios  $\beta_{i(l)}$  and  $\varepsilon_{ijkl}$  são independentes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Produção e composição de leite

Os dados obtidos no experimento encontram-se apresentados na Tabela 10, abaixo, bem como as variáveis estatísticas. As discussões que seguem, retratam as tentativas de compreender os resultados puros, e as possíveis influências de podem ter ocorrido, tentando identificar as correlações e fatores que potencializam os mascaram as variáveis avaliadas.

**Tabela 8 - Resultados de produção e composição de leite de vacas holandesas mantidas em pastagem de azevém anual (*Lolium multiflorum* cv. Baqueano), suplementadas ou não com L-Lisina e DL-Metionina.**

	Tratamentos					
	Controle	Lis/Met	EP*	Pr>f	R <sup>2</sup>	CV
Produção de Leite (kg.dia <sup>-1</sup> )	36,19	35,97	2,16	0,7709	0,9494	5,99
Produção de Leite Corrigida (4%G)	33,85	32,62	2,34	0,1416	0,9345	7,03
Teor de Gordura (%)	3,58	3,39	0,26	0,0472	0,8676	7,57
Produção de Gordura (kg.dia <sup>-1</sup> )	1,29	1,21	0,11	0,0686	0,9118	8,91
Teor de Proteína Bruta (%)	3,17	3,2	0,05	0,1351	0,9688	1,65
Produção de Proteína Bruta (kg.dia <sup>-1</sup> )	1,14	1,1473	0,06	0,9032	0,9421	5,93
Teor de Caseína (%)	2,55	2,546	0,02	0,5858	0,9758	1,46
Nitrogênio Ureico do Leite (mg.dL <sup>-1</sup> )	12,4	12,15	0,23	0,4479	0,7922	7,61
Teor de Lactose (%)	4,48	4,61	0,06	<0,0001	0,9139	1,42
Produção de Lactose (kg.dia <sup>-1</sup> )	1,62	1,66	0,10	0,305	0,9537	6,08
Teor de Sólidos Totais (%)	12,56	12,26	0,33	0,0196	0,8179	2,68
CCS (CSx1000.ml <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	309	363	0,42	0,637	0,9332	9,36
Creatinina no Sangue (mg.dL <sup>-1</sup> )	0,89	0,74	0,07	<0,0001	0,812	9,68
Uréia no Sangue (mg.dL <sup>-1</sup> )	25,01	25,09	2,69	0,9295	0,7465	10,78
Creatinina na Urina (mg.dL <sup>-1</sup> )	42,46	38,04	7,84	0,122	0,7303	19,41
Uréia na Urina (mg.dL <sup>-1</sup> )	280,61	347,32	101,42	0,0748	0,5395	32,19

Notas:

<sup>1</sup> Os valores de CCS apresentados na tabela são originais, porém a análise estatística dos dados foi realizada utilizando *logCCS*.

Valores seguidos de \* apresentaram diferença significativa a teste t com 5% de probabilidade

#### 4.1.1. Produção de leite

Frente aos níveis produtivos obtidos no experimento, 36,19 e 35,97 kg.dia<sup>-1</sup> para os grupos controle e tratamento, respectivamente, é possível verificar que estes ficaram muito próximos do objetivo calculado no ajuste nutricional dos animais, evidenciando inclusive que é possível trabalhar com animais de alto desempenho sobre pastagens de azevém de alta qualidade, suplementando-as com silagem de milho e concentrado sem a inclusão de alimentos proteicos, como o farelo de soja. Corroborando com Silva et al.(2008), e posicionando este modelo de trabalho como uma possível alternativa econômica, visto que alimentos proteicos, quando oriundos de concentrado, normalmente apresentam custos elevados.

Analisando o comportamento da produção de leite no estudo, verificamos que esta não foi afetada pela adição de lisina e metionina, semelhante ao verificado por Sancanari et al. (2001), que trabalhando com vacas holandesas alimentadas com silagem de milho e concentrado, não encontrou diferença ao suplementar 8,4g de metionina, protegida ou não da degradação ruminal. O mesmo foi relatado por Frota et al. (2014), que na suplementação dos aminoácidos lisina (45g) e metionina (20g), associados ou não com óleo de soja, não encontrou alteração na produção de leite.

Os valores obtidos no presente estudo, foram levemente superiores aos obtidos por Frota et al. (2014), que obteve de 31,7 a 32,9kg leite.vaca<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> nos tratamentos quando suplementou óleo de soja e lisina+metionina, respectivamente.

A expectativa de encontrar incremento na produção de leite utilizando lisina e metionina protegidos da degradação ruminal, se faz por uma série de questões fundamentais, como maior aporte de aminoácidos prontamente absorvidos no intestino, com alta capacidade gliconeogênica e compensando níveis reduzidos de fontes de PNDR na dieta, além de ter a produção de leite como consequência da elevação da saúde dos animais.

Greco (2008), avaliou a inclusão de éster isopropílico do análogo de metionina (HMBi) para atingir a relação de 3:1 entre lisina e metionina, buscando identificar o reflexo

positivo da suplementação, mas também não encontrou incrementos em produção de leite entre os grupos controle e tratamento, sendo 16,20 vs. 16,49kg.dia<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo valores bem abaixo dos obtidos no presente estudo. O autor ainda cita que o HMBi não tem se mostrado efetivo em aumentar a produção de leite, demonstrando isso através de 6 trabalhos compilados, apresentados no presente estudo na Tabela 2, onde em apenas um trabalho houve resposta positiva para produção de leite. Neste compilado, as produções individuais variaram de 25 a 40kg leite.vaca<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, valores mais próximos dos apresentados na Tabela 10.

A ausência de incremento em produção utilizando metionina no pós parto, também foi relatada por Kudrna et al. (2009) utilizando 36 animais cruzados das raça Holandesa e Simental leiteiro, divididas em 2 grupos, onde três semanas antes do parto um grupo recebeu 18,2g de metionina protegida no ambiente ruminal antes do parto e outro grupo não. Após o parto, cada um dos grupos foi novamente dividido, formando quatro grupos: 1) Metionina em pré e pós parto, 2) Metionina somente no pré parto, 3) Metionina somente no pós parto e 4) Sem suplementação de metionina. Neste estudo, os animais que receberam a suplementação somente no pós parto não apresentaram respostas positivas e consistentes, porém o grupo 1, que recebeu a adição do suplemento no pré e pós parto apresentaram maior produção de leite e menor ingestão de matéria seca, o que leva o autor a concluir que a adição de 18,2g de metionina tem efeitos benéficos, porém pequenos e na maioria das vezes sem significância estatística no desempenho e na composição do leite.

Polan et al. (1991), utilizando a análise de produção de 259 vacas, durante todo período lactacional, demonstrou a importância do período produtivo das vacas à resposta a adição de aminoácidos. Esta variável (estágio da lactação) não foi isolada no presente estudo, pois a definição do requerimento de AAEs foi definida em função da produção e não dos dias em lactação dos animais. De qualquer forma, o delineamento experimental minimizou este efeito, sustentando os resultados obtidos, mas deixando aberta a possibilidade de futuras avaliações.

Para que seja possível uma maior compreensão dos resultados obtidos, é necessário conhecer melhor a dinâmica do produto comercial utilizado no estudo. Devem ser realizados os monitoramentos dos locais onde estes realmente chegam e são absorvidos. Isto se deve em função de que uma das possibilidades para que não tenha sido identificada resposta à inclusão dos aminoácidos, se deve a incerteza de que estes realmente resistiram ao ataque de microrganismos ruminais, fator fundamental para a absorção e síntese dos aminoácidos essenciais fornecidos.

Ainda frente à produção de leite, porém agora avaliando esta quando corrigida para 4% de gordura, verificamos que a suplementação do aditivo também não apresentou diferença significativa entre os animais tratados em relação ao controle, 32,62 contra 33,85 kg.dia<sup>-1</sup>, respectivamente. Esta resposta vem de encontro aos autores supracitados (GRECO, 2008; SANCANARI et al., 2001) que também não verificaram diferença significativa quando corrigiram o leite para o teor de gordura.

Sabendo que esta correção é feita matematicamente, e leva em consideração a combinação entre produção de leite e quantidade de gordura produzida, o teor de gordura do leite tem grande impacto neste quesito. Porém, mesmo verificando, na Tabela 10, que o teor de gordura foi significativamente menor no grupo tratamento, este efeito de depressão na gordura do leite não apresentou grande influência na produção corrigida para 4%. Este item será abordado e melhor discutido a seguir.

#### 4.1.2. Teor de gordura

Analisando o componente gordura do leite, verificamos que este foi significativamente superior nos animais do grupo controle, demonstrando que houve influência do tratamento sobre a composição desta variável no leite.

A maioria dos trabalhos apresentados na literatura, mesmo que inconsistentes, indicam incremento na produção ou no teor de gordura do leite (BESTER et al., 2006; ST PIERRE & SYLVESTER, 2005) ou nenhum efeito neste componente (STRZETELSK et al., 2006; GRECO, 2008; SOCHA et al., 2005).

Uma das explicações pode ser relacionada à tecnologia de proteção dos aditivos utilizados serem a base de óleo vegetal hidrogenado, que segundo Schwab (1995) tem sido limitantes para a proteção de aminoácidos no ambiente ruminal e muito influenciados pelo pH do rúmen (quando ácido, em especial).

Para entender melhor esta interação, Frota et al. (2014) realizaram um estudo com suplementação de lisina (110g) e metionina (50g) associados ou não a óleo de soja (250ml), observando uma redução de 0,62% no teor de gordura nas dietas com óleo de soja incluso a dieta, o que naquela situação foi facilmente explicado pela biohidrogenação dos ácidos graxos, que demonstra a ação do lipídeo disponível no rúmen e sua influência no ambiente ruminal, alterando a síntese e composição do leite.

Contudo, a dose de óleo vegetal hidrogenado inclusa no presente estudo não é elevada, alterando a dieta controle de 4,18 para 4,34% de extrato etéreo, ou algo em torno de 40g de óleo adicionado. Esta hipótese deve ser melhor estudada e compreendida, para que possa ser efetivamente considerada como caráter isolado ou em associação com outros fatores, mas que podem vir a elucidar a razão pela qual o grupo controle produziu 1,29 contra 1,21kg de gordura.vaca<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> dos animais tratados com lisina e metionina no presente estudo, o que não diferiu estatisticamente a 5% de significância, mas a 10%, por exemplo seria distinto e poderia indicar uma tendência a supressão da produção de gordura.

#### 4.1.3. Teor de proteína bruta e caseína

A proteína do leite é composta basicamente de aminoácidos absorvidos no intestino, que por sua vez, são compostos pela proteína microbiana formada no rúmen e pela proteína da dieta não degradada no rúmen, que chega ao intestino. O teor de proteína do leite é mais sensível à suplementação de aminoácidos do que a produção de leite, sendo um bom indicativo da eficiência da suplementação (NRC, 2001). No presente estudo, não houve diferença entre os teores e/ou produção total de proteína encontrada no leite de ambos os tratamentos.

Valores semelhantes foram apresentados por Greco (2008), onde o grupo controle apresentou 3,12% de proteína bruta e o grupo onde foi adicionado HMBi apresentou um teor de 3,13%, sem diferir estatisticamente.

Já Socha et al. (2005), apresentaram resposta positiva ao incremento de lisina e metionina em dietas com 18,5% de proteína bruta, muito semelhante aos 19,5% de PB da dieta do presente estudo. Na ocasião, os autores utilizaram 84 vacas da raça holandesas, divididas no pós parto em 6 grupos, sendo duas dietas basais de 18,5% e 16% e em cada dieta três tratamentos distintos: 1) dieta basal, sem fornecimento de aminoácidos; 2) dieta basal com suplementação de 10,5g.dia<sup>-1</sup> de metionina protegida no rúmen; 3) dieta basal com adição de 10,2g.dia<sup>-1</sup> de metionina e 16g.dia<sup>-1</sup> lisina, ambos protegidos no rúmen. Na dieta de 18,5% de PB, os teores de proteína do leite, neste caso proteína verdadeira, foram de 2,80, 3,01 e 2,94% para os tratamentos 1, 2 e 3 respectivamente. Já com a suplementação dos aminoácidos na dieta com 16% de proteína bruta, os autores supracitados não encontraram diferenças significativas.

Um incremento no teor de proteína do leite semelhante também foi verificado por Donkin et al. (1989), que utilizando oito vacas holandesas no terço médio da lactação, suplementadas com 15g de metionina e 40g de lisina sobre uma dieta base de 50% silagem de milho e 50% concentrado, obtiveram teores de 3,15 vs. 3,25% de proteína do leite nos grupos controle e tratamento, respectivamente. Neste mesmo estudo, não foi verificada diferença entre os tratamentos na ingestão de matéria seca, na produção de leite, no teor de gordura e na produção de leite corrigida para 4% de gordura.

Além do incremento significativo do teor de proteína do leite que não houve, era esperado que houvesse também diferenças nos teores de caseína, visto que esta representa 80% da proteína bruta do leite (LIVNEY, 2010). Porém, quando analisamos a fração de caseína no leite, também não encontramos diferenças significativas (2,55 vs. 2,55% para os grupos controle e com adição de Lis/Met, respectivamente).

Kolver et al. (1999) é enfático ao afirmar que para aumentar consistentemente e previsivelmente o teor de proteína no leite, especialmente o componente de caseína, é necessária uma compreensão do fornecimento pós-ruminal de aminoácidos e do metabolismo subsequente de aminoácidos pela vaca, ou seja, a estratégia de adicionar aminoácidos protegidos no ambiente ruminal deve ser considerada, mas é necessária a garantia de que cheguem efetivamente a ser absorvidos no intestino.

No estudo apresentado por Donking et al. (1989), os autores, além da diferença de proteína dos tratamentos, identificaram diferenças na composição da caseína, indicando que com a suplementação de lisina e metionina, houve um aumento nas quantidades de  $\alpha$ -caseína e  $\beta$ -caseína, enquanto a quantidade de  $\kappa$ -caseínas foi diminuída.

#### 4.1.4. Nitrogênio ureico do leite

Uma das possibilidades para a elevação do teor de proteína bruta do leite, quando esta ocorre, é que este apresente uma grande fração de nitrogênio ureico (NUL), visto que o resultado em % de PB não faz distinção entre as frações de proteína verdadeira e de nitrogênio ureico presentes no leite.

Para discutir sobre os resultados obtidos no presente estudo e tentar entender porque não se confirmaram as hipóteses, é necessário entender a dinâmica de degradação da proteína e a síntese hepática da ureia. Esta cinética inicia no ambiente ruminal, no momento em que ocorre a degradação da proteína verdadeira, do nitrogênio não proteico, do N reciclado para o

rúmen na forma de ureia e da proteína originada na degradação dos microrganismos mortos ainda no rúmen. Esta degradação gera amônia ( $\text{NH}_3$ ), a qual é utilizada com maior ou menor eficiência de acordo com o teor de energia no rúmen. A maior parte da amônia não utilizada para a síntese microbiana é absorvida através da parede ruminal por difusão e transportada para o fígado pela veia porta, já que não pode permanecer na corrente sanguínea por apresentar alta toxidez aos ruminantes. No fígado, por sua vez, a amônia é convertida em ureia (através do ciclo da ureia), um composto não tóxico e nesta reação, 2 moles de ATPs são utilizados, ou seja, existe demanda energética no processo. Por fim, parte desta ureia sintetizada é excretada, via urina em especial, mas também via leite, e parte retorna ao rúmen via saliva ou corrente sanguínea (SANTOS, 2005).

Portanto a concentração do nitrogênio ureico do leite é um indicativo confiável do balanço proteico, se em excesso ou deficiência (MEYER, 2006). Contudo, conforme citado por Santos (2006), este balanço é dependente do aporte de energia dietético, podendo a proteína estar sendo aportada em níveis corretos e “sobrar” por deficiência de carboidratos fermentáveis no rúmen, além da possibilidade óbvia nos casos de elevação dos níveis de nitrogênio ureico no leite serem decorrentes de elevados níveis de PDR na dieta.

Os valores encontrados no presente estudo são baixos, frente aos dados apresentados por Doska (2010), que após analisar os dados do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR), incluindo 96 rebanhos e 156.630 análises, encontrou o valor médio de  $14,18 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  para a raça holandesa. Ainda o autor, em outro estudo, dividiu os valores de NUL encontrados em função de três patamares de produtividade da vaca, que chamou de “alta produção” vacas produzindo acima de  $36 \text{ litros} \cdot \text{vaca}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ , “média produção” valores entre  $27$  e  $36 \text{ litros} \cdot \text{vaca}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  e “baixa produção” abaixo de  $27 \text{ litros} \cdot \text{vaca}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ , sendo os valores corrigidos para 3,5% de gordura encontrou valores de 15,71, 14,19 e  $12,83 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  para os grupos de alta, média e baixa produções respectivamente.

Hutjens & Barmore (1995), citados por Broderick (1995), sugeriram que variação de 12 a 17  $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  de NUL indica ótimo balanceamento de proteína degradada e energia fermentada no rúmen. Valores de 10 a  $16 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ , dependendo da produção de leite, foram sugeridos por Jonker et al. (1999), que recomendaram a utilização de NUL para avaliar a excreção de nitrogênio em vacas de leite. Já Machado & Cassoli (2007), sugerem que para teores de proteína bruta do leite entre 3,0 e 3,2%, os níveis de concentração de nitrogênio ureico devem ser mantidos entre 10 e  $14 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ . Ainda avaliando parâmetros, Butler et al. (1996), sugerem que valores de nitrogênio ureico do leite superiores a  $19 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  estão



associados a um decréscimo de 20 pontos percentuais na taxa de prenhes de vacas em lactação.

Estes parâmetros corroboram para a afirmação de um bom ajuste proteico energético das dietas experimentais, onde os valores encontrados 12,40 e 12,15mg.dL<sup>-1</sup> para os grupos controle e Lis/Met, respectivamente e não distintos estatisticamente, demonstram que houve um aporte de proteína dietética adequado, não deficiente tampouco em excesso, associado a uma quantidade ajustada de carboidratos. Estes resultados ficaram abaixo do que o modelo de predição indicou, que era de 14,4 e 14,7mg.dL<sup>-1</sup> para os grupos controle e Lis/Met, respectivamente.

Dentre as variáveis de composição do leite que podem afetar os níveis de nitrogênio ureico no leite, se destacam a produção de lactose e de proteína (kg), que explicam 62 e 56%, respectivamente, da variabilidade total de NUL (MEYER, 2006). Esta informação corrobora com os dados obtidos neste estudo, onde o grupo Lis/Met apresentou maiores teores, mas não maiores produções totais de proteína bruta e de lactose, não influenciando a concentração de NUL, que por sua vez não diferiu entre os tratamentos.

Estas ralações podem ser consideradas para estudos posteriores, visto que a preocupação ambiental e elevação da eficiência do uso do nitrogênio são cada vez mais prementes em sistemas de produção de leite, podendo a substituição de fração da proteína bruta da dieta por aminoácidos protegidos e assimilados no intestino, colaborar com a menor excreção do N pela vaca.

#### 4.1.5. Teor de lactose

Para entender os resultados obtidos no componente lactose, é importante que exista um entendimento claro da sua composição e síntese.

A Lactose é um composto específico da glândula mamária, sendo o principal carboidrato presente no leite bovino. É um dissacarídeo, composto de dois monossacarídeos: galactose e glicose, ligados por uma ponte glicosídica  $\beta$ -1,4 (HURLEY, 2010). A lactose, por ser um dos principais reguladores osmóticos do leite, não apresenta grandes variações quanto ao seu teor, visto que sua maior ou menor síntese na glândula mamária é compensada por maior ou menor aporte de água da corrente sanguínea para o interior da glândula (HURLEY, 2010; BERG, 2004). Talvez por esta razão, muitos estudos envolvendo a suplementação de aminoácidos não avaliam o impacto destes no teor de lactose.

Para entender os fatores que impactam na síntese da lactose é fundamental que sejam compreendidas as etapas que antecedem esta reação na glândula mamária. Como citado anteriormente, a lactose é resultante da ligação entre uma glicose e uma galactose, galactose esta que tem origem em uma molécula de glicose, que é convertida em UDP-Glicose e posteriormente em UDP-Galactose, ou seja, a galactose é originada a partir de outra glicose, sendo esta, portanto, a chave para todo o processo. (HURLEY, 2010).

Em ruminantes, a glicose hepática é formada a partir de um processo chamado de gliconeogênese, sendo o propionato seu principal precursor, já que outros compostos como o acetato, o butirato e outros ácidos graxos de cadeia longa não podem contribuir para uma síntese líquida de glicose. (BERGMAN et.al,1990). Este propionato tem origem na fermentação de carboidratos em nível ruminal, relacionando portanto o aporte energético da dieta com o potencial de produção de propionato, glicose e lactose, conseqüentemente.

Hurley (2010) no entanto, demonstra que um grupo de aminoácidos, chamados de gliconeogênicos, também apresentam um papel importante como precursores de glicose em ruminantes. Neste grupo, que inclui também a alanina, a cistina, a glicina, os ácido aspártico e glutâmico, a arginina, a histidina, a prolina e a valina, está inclusa também a metionina (NELSON & COX, 2005). Santos (2011) aponta que alguns estudos realizados com vacas em lactação sugerem que os aminoácidos que chegam ao fígado podem responder por até 17% da glicose produzida neste órgão.

Por esta razão, é possível e tendencioso que a suplementação com metionina da dieta de vacas em lactação possa interferir na síntese de lactose, incluindo potencialmente a lisina, que é um aminoácido gliconeogênico e cetogênico, ou seja, precursor tanto da síntese de glicose quanto de ácidos graxos (SANTOS, 2006).

No presente estudo, os teores de lactose encontrados foram distintos entre os grupos de forma altamente significativa, com superioridade para o grupo onde os aminoácidos foram suplementados quando comparado ao grupo controle sem aminoácidos (4,61 vs. 4,48 respectivamente), sugerindo que houve um aporte de glicose superior na glândula mamária no grupo que recebeu a suplementação de aminoácidos.

Resultados distintos foram encontrados por Greco (2008), que utilizando animais sobre pastejo de gramínea tropical, não encontrou diferença entre o grupo controle e o grupo que foi adicionado um análogo de metionina, onde obteve os valores de 4,30 e 4,32% de lactose, respectivamente, sendo estes valores expressivamente menores que do atual estudo.

Em contrapartida, no presente estudo, a quantidade de lactose produzida em  $\text{kg.vaca}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  entre os tratamentos não diferiu estatisticamente, conforme os dados expostos na Tabela 10, e associando a produções de leite iguais entre os tratamentos, podemos associar as diferenças encontradas nos teores de lactose muito mais pela influencia na depressão da gordura e/ou outros componentes do leite do que a maior produção de lactose.

#### 4.1.6. Teor de sólidos totais

Os teores absolutos de sólidos totais do leite também diferiram estatisticamente entre os grupos, tendo o grupo controle apresentados valores superiores, 12,56 contra 12,26% do grupo Lis/Met.

Relembrando, o grupo tratado com lisina e metionina apresentou uma diferença de 0,19% a menos de gordura e mais 0,03% e 0,13% de proteína e lactose respectivamente. Estas diferenças isoladas não explicam a diferença de 0,30% em sólidos totais. Contudo, sabendo que a lactose é responsável por cerca de 50% do potencial osmótico do leite (HURLEY, 2010), o fato de existir uma diferença significativa no teor de lactose e não significativa no volume de leite pode nos induzir a considerar a existência de componentes importantes que contribuíram para esta regulação do volume produzido entre os animais experimentais e um valor de sólidos totais superior ao grupo Lis/Met.

Fatores não avaliados na composição do leite podem ser importantes, visto que leite e sangue apresentam equilíbrio isosmótico, ou seja, apresentam pressões semelhantes, embora não estejam quimicamente em equilíbrio. Teores de sais, íons e proteínas, além de outros compostos que respondem fortemente pelo potencial osmótico e diferença elétrica, devem ser considerados (HURLEY, 2010).

#### 4.1.7. Contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas no leite apresentadas no presente estudo não diferiram estatisticamente. O grupo controle apresentou uma contagem média de 309mil  $\text{CS.ml}^{-1}$  e o grupo Lis/Met 363mil  $\text{CS.ml}^{-1}$ , o que segundo, Stiles & Rodenburg (1996), já acarretam perdas em produtividade na casa de 6%.

Com os resultados individuais de CCS, foram identificados três animais como *outliers* pelo teste de distância de Cook, e estes removidos na íntegra, de ambos os períodos experimentais, e das demais variáveis. Isto se deve a importância que a CCS tem em influenciar os demais componentes do leite, sendo chave no processo de avaliação dos resultados.

Esta influência se deve ao fato de que células somáticas são a soma de células descamadas dos tecidos secretores da glândula mamária e das células de defesa da vaca (leucócitos), sendo este segundo grupo o mais importante em termos quantitativos. Por serem células de defesa, são oriundos da corrente sanguínea e devido à presença de algum agente potencialmente patogênico, migram para o interior da glândula mamária. Sendo a mastite o processo inflamatório da glândula mamária por estes patógenos, a presença dos leucócitos no leite e consequente elevação da contagem de células somáticas é um bom indicativo do grau de inflamação (MACHADO et al., 1999).

Machado et al. (2000), analisando 4785 análises de leite feitas entre 1996 e 1998 de rebanhos leiteiros de São Paulo e Minas Gerais, verificaram que leites de tanque com contagem de células somáticas mais altas, apresentaram maior porcentagem de gordura, menor teor de proteína e lactose e teores semelhantes sólido totais, o que corroboram com os resultados do presente estudo, que embora não tenham apresentados diferenças significativas, numericamente o grupo controle se encaixou neste perfil, com exceção dos sólidos totais. As mudanças significativas encontradas pelos autores ocorreram a partir de 1.000.000 CS.ml<sup>-1</sup> para gordura e 500 mil CS.ml<sup>-1</sup> para proteína e lactose.

Um quadro de melhora na saúde da glândula mamária é esperado visto que a Metionina é um aminoácido essencial precursor da cisteína, um aminoácido não essencial. A cisteína por sua vez, é um componente ativo da enzima Glutathione Peroxidase, um dos mais importantes antioxidantes presente no organismo dos mamíferos, e desta forma, existe a expectativa que animais com adequado suprimento de metionina tenham um melhor status de saúde (GRECO, 2008).

A resposta da adição de aminoácidos em vacas em lactação, expressa em incremento na produção de leite e proteína do leite, são apenas “a ponta do iceberg”, visto que as respostas podem ir muito além, passando por elevação na saúde hepática, imunidade e reprodução (SCHWAB, 2012).

Poucos estudos tem buscado relacionar a adição de lisina e metionina com a contagem de células somáticas no leite. Para uma resposta sólida neste quesito, talvez sejam necessários

períodos experimentais mais longos, visto que a melhora no quadro de saúde dos animais apresentam efeitos cumulativos e lentos, em especial para que isto acarrete melhoras significativas na saúde da glândula mamária em especial.

#### 4.1.8. Teores e ureia e creatinina no sangue e urina

A creatinina encontrada no plasma é derivada, na sua totalidade, do catabolismo da creatina presente no tecido muscular, este, um metabólito precursor da creatinina que tem a função de armazenar energia nos músculos na forma de fosfocreatina (GONZÁLEZ & SCHEFFER, 2002). Assim, a degradação da creatina, elevando o teor de creatinina no sangue pode ser reflexo de uma demanda energética superior e por consequência da degradação de tecido muscular para atender a ela. Por outro lado, a creatinina é eliminada exclusivamente por via renal, assim sendo, altos níveis podem representar, quando em um indivíduo especificamente, uma deficiência renal.

Maturana Filho (2013) cita que aumentos nos teores de creatina quinase (enzima derivada do catabolismo da creatina presente no tecido muscular) provavelmente está ligado ao aumento na produção leiteira em vacas no pico de lactação e/ou em condições de claudicação dos animais (grandes desafios), e identificou que as alterações enzimáticas séricas da creatina ocorrem em fases de maior exigência energética dos animais, podendo sobrecarregar a atividade hepática até mesmo em momentos onde as vacas já regularam o consumo de matéria seca. O autor ainda cita que estes resultados estão em concordância com Traditi et al. (1982) e Souza (2005).

Reiterando que a excreção da creatinina só ocorre por via renal, os teores de creatinina no sangue são altamente correlacionados com os níveis de ureia e creatinina na urina. Assim, podemos analisar o conjunto dos dados obtidos com o presente estudo, onde o aporte dos aminoácidos lisina e metionina acarretou menor índice de creatinina no sangue (0,89 vs. 0,74mg.Dl<sup>-1</sup> nos grupos controle e Lis/Met, respectivamente), mas índices semelhantes de creatinina na urina (42,46 vs. 38,04mg.Dl<sup>-1</sup> para os grupos controle e tratamento, respectivamente). Esta diferença no teor de creatinina no sangue demonstra uma maior atividade degradativa da creatina para regeneração rápida de ATP no grupo controle, ou seja, o grupo com o correto balanceamento de aminoácidos teve menor mobilização e conversão de tecidos em energia para sustentar as altas produções.

Elevadas mobilizações corporais, incluindo tecidos musculares são bastante comuns em dietas com grande participação de pastagens temperadas e suplementações proteicas, onde o excesso de proteína gera uma elevação na concentração de amônia na corrente sanguínea, como descrito no item 4.2.4., e elevando muito a demanda energética para secretar este excesso.

Um indicador auxiliar aos teores de nitrogênios ureicos do leite é os teores de ureia no sangue e na urina. Ortolani (2002) define que a ureia é originária do catabolismo de aminoácidos, ácidos nucleicos e amônia endógena ou exógena, proveniente da dieta, ou seja, quanto maior o teor de proteína da dieta fornecida aos animais, em especial a proteína de alta degradação ruminal, maior será o teor de ureia plasmática.

Neste estudo, verificamos que a relação entre os teores de ureia, tanto no sangue quanto na urina, não foram distintos entre os tratamentos (25,01 vs. 25,09mg.DI<sup>-1</sup> de ureia no sangue e 347 para o grupo Lis/Met contra 280mg.DI<sup>-1</sup> de ureia na urina), ou seja, não existe diferença no fluxo de ureia sendo excretado pelos animais de ambos os grupos.

Esta constatação não é de difícil compreensão, visto que por conceito, a suplementação de aminoácidos eleva o teor de proteína metabolizável da dieta para os animais, mesmo que estes tenham mecanismos de proteção ruminal. O que parece ser positivo e indica que os animais que receberam os aminoácidos lisina e metionina apresentaram menores teores de mobilização de tecidos musculares nos grupos tratamentos, evidenciando que os aminoácidos fornecidos foram precursores de energia para o metabolismo, evitando ou minimizando uma degradação muscular para atender a produção.

## 5. CONCLUSÃO

A suplementação com os aminoácidos lisina e metionina não eleva a produção de leite, tampouco de leite corrigido para gordura.

A suplementação com os aminoácidos lisina e metionina alteram a composição do leite significativamente, apresentando maior teor de lactose e valores inferiores para os teores de sólidos totais e gordura. A produção em  $\text{kg}\cdot\text{dia}^{-1}$  foi semelhante para os componentes lactose, proteína bruta e gordura foram iguais.

A suplementação dos aminoácidos lisina e metionina não afeta a eficiência do uso nitrogênio, mas equilibra a demanda energética dos animais, reduzindo os teores de creatinina no sangue, evidenciando menores mobilizações de tecido muscular.

Estudos mais aprofundados são necessários para que sejam compreendidos mecanismos que regulam e interferem nas questões discutidas no presente estudo, além de buscar identificar em quais grupos animais e em qual situação as respostas são mais concretas e confiáveis.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; IRIKI, T., FUNABA, M. Lysine deficiency in postweaned calves fed corn and corn gluten meal diets. **Journal of Animal Science**. 75:1974-1972. 1997.

BALL, D.M.; LACEFIELD, G.D. Ryegrass For Forage. Circular 11-1, **Oregon Ryegrass Growers Seed Commission**, Salem, OR. 2011.

BARGO, F.,MULLER, L.D.; DELAHOY, J.E.;CASSIDY, T.W. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. **Journal of Dairy Science**. 85:1777–1792. 2002.

BARGO, F.; MULLER, L.D.; KOLVER, E.S.; DELAHOY, J.E. *Invited Review*: Production and Digestion of Supplemented Dairy Cows on Pasture. **Journal of Dairy Science**. 86:1–42. 2003.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 600 p. 2011.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1059, 2004.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.



BESKOW, W.B. **Sistema Intensivo a Pasto com Suplementação (SIPS): Origem, fundamentos e desenvolvimento.** Boletim Técnico Transpondo. Cruz Alta: Transpondo, dez. 2016. 5pp.

BESTER, Z.; ERASMUS, L.J.; COERTZE, R.J. Milk composition as a technique to evaluate the relative bio-availability of rumen protected methionine sources. **Journal of Dairy Science**, Albany, v.89,suppl. 1, p. 76-76, 2006.

BRASIL. **Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária.** Levantamento de Reconhecimento dos Solos do Rio Grande do Sul. Recife. 431p. (Boletim Técnico, 30). 1973.

BRODERICK, G.A. Use of milk urea as an indicator of nitrogen utilization in lactating dairy cow. **Research Summaries.** Washington: USDA, Agricultural Research Service; US Dairy Forage Research Center. 122p. 1995.

BUTLER, W.R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.9, p.2533 - 2539, 1998.

BUTLER, W. R.; CALAMAN, J. J.; BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 4, p. 858-865, 1996.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**., v.37, n.8, p. 911-917, 1959.

CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**. Albany, v.58, p. 1198-1218. 1975.

CHEN, Z. H., G. A. BRODERICK, N. D. LUCHINI, B. K. SLOAN, AND E. DEVILLARD. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 94:1978–1988. 2011.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glicerolipids and cholesterol steers. **Journal of Animal Science**. 23: 1072-1077. 1982.

CLARK, D.A., KANNEGANTI, V.R., CHERNEY, J.H.; CHERNEY, D.J.R. Grazing management systems for dairy cattle. **Grass for dairy cattle**., 311-334. 1998.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 11<sup>a</sup> ed. Porto Alegre:SBCS. 2016. 376p.

COZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A.L. CONTIERO, B.;MORO, L.; DALVIT, P. Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 8, p. 3895-3901, 2011.

DELAGARDE, R.; DELABY, L.; FAVERDIN, P. Le calcul de ration pour vaches laitières au pâturage. **Rencontre Recherche Ruminants**, v.13, 2006.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, 81(3), 597-608. 1998.

DILLON, P. Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. **Fresh herbage for dairy cattle** (ed. A Elgersma, J Dijkstra and S Tamminga), v. 18, p. 1-26, 2006.

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

DONKIN, S.S.; VARGA, G.A.; SWEENEY, T.F.;MULLER, L.D. **Rumen-Protected Methionine and Lysine: Effects on Animal Performance, Milk Protein Yield, and Physiological Measures**. Department of Dairy and Animal Science, The Pennsylvania State University, University Park 16802. 1989.

DOSKA M.C.; SILVA, D.F.F.; HORST, J.A. et al. Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.692-697, 2012.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solo**–Brasília: EMBRAPA Produção de Informação; Rio de Janeiro: EMBRAPA SOLOS, 1999. XXVI, 412 p.

FIORIN, J. E., BERTOLLO, G.M., WYZYKOWSKI, T. Adubação fosfatada e potássica para alta produtividade: Proposta de nova recomendação In: XVII Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, XV Mostra de Iniciação Científica, 2012, **Anais ... Cruz Alta – RS: UNICRUZ**, 2012.

FROTA, H.N.; REIS, R.B.; FARIA, B.N.; COELHO, S.G.; SATURNINO, H.M. Suplementação de lisina e metionina em associação ou não com o óleo de soja na dieta de

vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.4, p.1121-1128, 2014.

GARTHWAITE, B. D., C. G. SCHWAB, AND B. K. SLOAN. Amino acid nutrition of the early lactation cow. In: Proc. 1998 **Cornell Nutrition Conference.**, Oct. 20-22, Rochester, NY, p. 38-50. 1998.

GONZÁLES, F.H.D., SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais. **29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado, Brasil. 2002.

GRECO, Leandro Ferreira. **Suplementação de vacas HPB e vacas 1/2 HPB 1/2 Jersey mantidas em pastagem tropical com o éster isopropílico do análogo de metionina (HMBi)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. doi:10.11606/D.11.2008.tde-16092008-160421. Acesso em: 23/12/2016.

HINDLE, V.A.; KAN,C.A.; ROBERT, J.C.; VUUREN, A.M. van. Effect of the isopropylester of hydroxylated analogue of methionine (HMBi) on feed intake and performance of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Albany, v.89, suppl. 1, p.401-402, 2006.

HODGSON, J. **Grazing management: Science into Practice**. London: Longman Scientific & Technical, 203p. 1990.

HODGSON, J.; BROOKES, I.M. Nutrition of grazing animals. **Pasture and Crop Science**. J. White, and J. Hodgson. eds. Oxford University Press, Auckland, N.Z. p.117. 1999.

HURLEY, W. Lactation biology website, University of Illinois, Chapter 7: Mammary macro-structure, dairy cow anatomy. 2010. Disponível em <http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/>

JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to national research council recommendations. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1261-1273, 1999.

JUCHEM, S. de O.; OLIVEIRA, J. C. P.; FONTANELLI, R.S. Vantagens e desvantagens do elevado valor nutritivo de cereais de inverno na produção de ruminantes. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 32., 2012, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo CBPA, 2012. 1 CD-ROM.

JURJANZ, S.; ROBERT, J.C.; LAURENT, F. Effects of the isopropylester of the hydroxylated analogue of methionine (HMBi) on production performance of dairy cows in early lactation. **Journal of dairy Science**, Albany, v.89, suppl.1, p. 75-76, 2006.

KELLEYWAY, Roy; HARRINGTON, Tim. **Feeding concentrates: Supplements for dairy cows**. Landlinks Press, p.171, 2004.

KOLVER,E.S.; CARRUTHERS,V.R.; NEIL,P.G.; DEVETH M.J.; JANSEN, E.B.L.; PHIPPS, D.E. Amino acid supply to the small intestine of dairy cows fed pasture. **Dairying Research Corporation Ltd.**, Private Bag 3123, Hamilton, New Zealand.1999.

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F.; World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, Volume 15, Number 3, June 2006, pp. 259-263. 2006.

KUDRNA, V.; ILLEK, J.; MAROUNEK, M.; NGUYEN, N.A. Feeding ruminally protected methionine to pre-and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, n. 9, p. 395-402, 2009.

LEE, C., HRISTOV, A.N., CASSIDY, T.W., HEYLER, K.S., LAPIERRE, H., VARGA, G. A., PARYS, C. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. **Journal of Dairy Science**, 95(10), 6042-6056. 2012.

LIMA, L.O.C.; BOSS, R. **Competição de genótipos forrageiros de clima temperado**. CCGT TEC, Cruz Alta/RS. Boletim Técnico. Ano V, N°20. 9p. 2015.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, Israel, v. 15, p. 73–83, 2010.

LUGÃO, S.M.B.; RODRIGUES, L.R.A.; ABRAHÃO, J.J.S.; MALHEIROS, E.B.; MORAIS, A. Acúmulo de forragem e eficiência de utilização do nitrogênio em pastagens de Panicum maximum Jacq. adubadas com nitrogênio. **Acta Scientiarum**. v.25, p.371-379, 2003.

MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D. Diagnóstico da qualidade do leite na Região Sudeste. In: MESQUITA, A.J.. DURR, J.W.; COELHO, K.O. **Perspectivas e Avanços na Qualidade do Leite no Brasil**. Goiânia: Talento, v.1, p. 55-72. 2006.

MATURANA FILHO, M. **Efeitos das condições metabólicas de vacas leiteiras durante o período de transição e início de lactação sobre a saúde e fertilidade no inverno e no verão**. 2013. 152 f. 2013. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e

Zootecnia)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARKUS, C. R.; OLIVER, B.; DE HAAN, E. H. F. Whey Protein rich in alfa-lactoalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress- 14 vulnerable subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 1051-6, 2002.

MARTINS, C.E.; CÓSER, A.C.; DERESZ, F. **Formação e utilização de pastagens manejada em sistemas intensivos de produção de leite**. EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. 2004. 10p. (Circular Técnica Nº 79)

MEYER, P. M.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L. D.; COELHO, K. O.; RODRIGUES, P. H. M. Fatores não-nutricionais e concentração de nitrogênio uréico no leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35(3), 1114-1121. 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6<sup>th</sup> ed. Washington D.C.: **National Academy Press**, 1978, p. 390.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Sétima Edição: Revisada. Washington D.C.: **National Academy Press**, 2001, p. 360.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Amino acid oxidation and the production of urea. **Lehninger principles of biochemistry**, v. 3, p. 623-658, 2005.

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

O'CONNOR, J. D., C. J. SNIFFEN, D. G. FOX, AND W. CHALUPA. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. **Journal of Animal Sciences**. 71:1298-1311. 1993.

ONODERA, R. **Methionine and lysine metabolism in the rumen and the possible effects of their metabolites on the nutrition and physiology of ruminants**. Amino acids, v. 5, p. 217-232. 1993.

OSTRENSKY, A.; NEGRO, G.; SANTOS, A. M. D.; ANATER, A.; RIBEIRO, D. R.; GRECO, L. F.; PEREIRA, M. N.; and ALMEIDA, R. D. Effects of rumen-protected lysine and methionine on milk yield and milk composition in lactating Holstein cows fed two different levels of crude protein. **Journal of Animal Science**. 94:779-779. doi:10.2527/jam2016-1602. 2016.

ORTOLANI, E. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. In: Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais. **29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado, Brasil. 2002.

ORTOLANI, E.L. 2003. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. González, F.H.D.; Campos, R. (eds): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre. Anais. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p..91- 102, 2003.



PELLEGRINI, L.G.; MONTEIRO, A.L.G.; NEUMANN, M.; MORAES, A., PELLEGRINI, A.C.R.S.; LUSTOSA, S.B.C. Produção e qualidade de azevém-anual submetido a adubação nitrogenada sob pastejo por cordeiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(9), 1894-1904. 2010.

POLAN, C.E.; CUMMINS, K.A.; SNIFFEN, C.J.; MUSCATO, T.V.; VICINI, J.L.; CROOKER, B.A.; CLARK, J.H.; JOHNSON, D.G.; OTTERBY, D.E.; GUILLAUME, B.; MULLER, L.D.; VARGA, G.A.; MURRAY, R.A.; PEIRCE-SANDNER, S.B. Responses of dairy cows to supplemental rumen-protected forms of methionine and lysine. **Journal of Dairy Science**, Volume 74, Issue 9, Pages 2997-3013. 1991. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030291784865> Acesso em 12 de outubro de 2016.

RIBEIRO FILHO, H. M. N.; FISCHER SBRISSIA, A. Estratégias para o manejo dos animais e do pasto em sistemas de produção de leite. **Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay**, v. 48, n. 1, p. 91-96, 2012.

ROBERT, J.C.; SLOAN, B.; SABY, B.; MATHÉ, J.; DUMONT, G.; DURON, M.; DZYZCKO, E. Influence of dietary nitrogen content and inclusion of rumen-protect methionine and lysine on nitrogen utilization in the early lactation dairy cow. **Rhône-Poulenc Animal Nutrition**. France. AJAS. vol. 2 p.544-545. 1989.

ROBERT, J.C.; SLOAN, B.K.; BOURDEAU, S. The effects of supplementation of corn silage plus soybean meal diets with rumen protect methionine on the lactation performance of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Sciences**. P. 77:92. 1994.

ROCHA, G. P.; EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J. A.; ROSA, B. Adubação nitrogenada em gramíneas do gênero *Cynodon*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2002.

RULQUIN, H. AND R. VERITE. Amino acid nutrition of dairy cows: Productive effects and animal requirements. In **Recent Advances in Animal Nutrition**. Nottingham..p. 55-77. 1993.

RULQUIN, H; PISELEWSKI, P.M.; VERITE, R.; and GUINARD, J. Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient – response approach. **Livestock Production Science** 37: 69-90. 1993.

SANCANARI, J.B.D. Efeito da metionina protegida e não protegida da degradação ruminal sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.30, n.1, p.286-294, 2001. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151635982001000100040&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151635982001000100040&lng=en&nrm=iso). Acesso em 13 de novembro de 2016.

SANTOS, F. A. P., A. M. PEDROSO, J. C. MARTINEZ, AND M. A. PENATTI. Use of concentrate supplementation for dairy cows grazing tropical grasses. Fundacao de Estudos Agrarios “Luiz de Queiroz” (FEALQ), Piracicaba, **Symposium of Dairy Production** v. 5, p.289–346. 2005.

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

SANTOS, F.A.P.; GRECO, L.F. Digestão pós ruminal de proteínas e exigências de aminoácidos para ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES. Pirassununga. **Anais**. Pirassununga: USP, FZEA. p.121-159. 2007.

SANTOS, F. A. P.; PEDROSO, A. M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 265-292

STATISTICAL Analysis System - SAS. SAS-STAT. The SAS system for windows version 8.0. Nashville: SAS Institut, 1999. CD-ROM. 1999.

SCHLINDWEIN, J.A. **Calibração de métodos de determinação de fósforo e potássio do solo sob sistema plantio direto**. 2003. 169f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SCHWAB, C.G.; SATTER, L.D.; CLAY, A.B. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. **Journal of Dairy Science**. Albany, V. 59, p. 1254-1270, 1976.

SCHWAB, C.G.; BOZAK, C.K.; WHITEHOUSE, N.L.; OLSON, V.M. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. **Journal of Dairy Sciences**. 75:3503-3518. 1982.

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

SCHWAB, C. The principles of balancing diets for amino acids and their impact on N utilization efficiency. p.1-15. In: Proceedings of the 23rd **Ruminant Nutrition Symposium**. University of Florida, Gainesville, FL. 2012.

SCHWAB, C.G., BOUCHER, S.E.; SLOAN, B.K. Metabolizable protein and amino acid nutrition of the cow: Where are we in 2007? In: **Proc. of the 68th Annual Minnesota Nutrition Conference**, p. 121-138. 2007.

SCHWAB, C., N. WHITEHOUSE, D. LUCHINI, AND B. SLOAN. Reevaluation of the breakpoint estimates for the NRC (2001) required concentrations of lysine and methionine in metabolizable protein for maximal content and yield of milk protein. **Journal of Dairy Sciences**. 92 (Suppl. 1):103. 2009.

SCHWAB, C.G. Protected proteins and amino acids for ruminants. Chapter of **Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding**. Ed. por R. John Wallace e Andrew Chesson – Weinheim; NewYork; Basel; Cambridge; Tokyo; VCH, 1995.

SILVA, H.A. da; KOEHLER, H. S.. MORAES, A. de; GUIMRÃES, V.D.; HACK, E.; CARVALHO, P.C. de F. Análise da viabilidade econômica da produção de leite a pasto e com suplementos na região dos Campos Gerais - Paraná. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.445-450, mar-abr, 2008.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 235 p, 2002.

SLOAN, B. Benefits and opportunities to formulating dairy rations for individual amino acids. In: Proc. of the 2005 Colorado **Dairy Nutrition Conference**. 2005.

SOCHA, M.T.; PUTNAM, D.E.; GARTHWALTE, B.D.; WHITEHOUSE, N.L.; KLERSTEAD, N.A.; SCHWAB, C.G.; DUCCHARME, G.A.; ROBERT, J.C. Improving

intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 88, p. 1113-1126, 2005.

ST-PIERRE, N.R.;SYLVESTER, J.T. Effects of 2-hydroxi-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v.88, p.2487-2497, 2005.

STREZETELSKI, J.A.; KOWALCZYK, J.; HEIMBECK, W. The effect of various rumen protected methionine sources on milk yield, milk composition and nitrogen efficiency of cows in midlactation. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 89, suppl.1, p.76-76, 2006.

WHITEHOUSE, N. L.; SCHWAB, C. G.; TYLUTKI, T. P.; SLOAN, B. K. Optimal lysine and methionine concentrations in metabolizable protein for milk protein production as determined with the latest versions of dairy NRC 2001 and AMTS.Cattle. **Journal of Dairy Sciences**. 96. E-Suppl. 1. 2013.

YANG, J.Y.; SEO, J.; KIM, H.J.; SEO, S.; HA, J.K. Nutrient synchrony: Is it a suitable strategy to improve nitrogen utilization and animal performance? **Asian-Aust. Journal of Animal Science**, 23(7), 972-979. 2010.