

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**OS AMINOÁCIDOS LISINA E METIONINA NA NUTRIÇÃO E NA  
ALIMENTAÇÃO DA VACA LEITEIRA**

Susana Cristina Marques Pinho

Orientador

Prof.º Doutor António José Mira da Fonseca

Coorientador

Engenheiro Rui Mário Miranda Alves

Porto, 2016

## RESUMO

Os aminoácidos são constituintes das proteínas e os animais para as produzirem necessitam de ingerir fontes de aminoácidos, pois não conseguem sintetizar todos os aminoácidos que necessitam.

Os aminoácidos com o potencial de serem absorvidos pelos ruminantes provêm de três fontes: proteína microbiana, proteína não degradável no rúmen e proteína endógena. A proteína microbiana é, normalmente, a principal fonte proteica para os ruminantes, sendo uma proteína de elevada qualidade, pois é equilibrada na maioria dos aminoácidos essenciais, em relação à proteína do leite. Por isso, as estratégias de alimentação de vacas leiteiras passam por maximizar o fluxo desta proteína para o duodeno.

A lisina e a metionina são os aminoácidos essenciais limitantes para a produção de leite em dietas, contendo, principalmente, silagem de milho, luzerna, milho, soja e subprodutos de milho e soja. No caso dos ruminantes, os aminoácidos para serem eficazes como fontes de aminoácidos metabolizáveis devem ser protegidos para resistirem à desaminação pelos microrganismos do rúmen.

No mercado apenas existem produtos com lisina e metionina protegida. De uma forma geral, os produtos com metionina têm um maior grau, quer de proteção ruminal, quer de libertação intestinal. Segundo alguns autores, uma das vantagens em utilizar estes produtos é diminuir a concentração de proteína não degradável no rúmen da dieta e, assim, aumentar a eficiência de utilização do azoto e, possivelmente, diminuir custos de fórmula.

Na formulação de dietas para vacas leiteiras, e para ruminantes, é importante considerar, para além dos aminoácidos lisina e metionina, todos os aminoácidos essenciais, e sobretudo o aminoácido histidina, nomeadamente em dietas à base de silagem de erva. Outros aspetos a ter em consideração são, por exemplo, a sincronização das disponibilidades de azoto e de energia no rúmen, bem como fontes com diferentes taxas de degradação que permitam uma libertação gradual de energia e de azoto para os microrganismos do rúmen; e utilizar fontes proteicas com elevada digestibilidade intestinal.

O conhecimento das exigências do animal, por cada aminoácido, ainda é muito limitado, à exceção dos aminoácidos lisina e metionina, contudo, é fundamental determiná-las, pois os aminoácidos, e não as proteínas *per se*, são os nutrientes que os animais precisam.

## **AGRADECIMENTOS**

A realização do estágio curricular, e do curso de Medicina Veterinária, agora finalizados com a elaboração deste relatório de estágio, só foram possíveis graças às pessoas que estiveram presentes nesta caminhada, e a quem agradeço:

Prof. Doutor António Mira da Fonseca, meu orientador;

Dr. José Vieira, diretor técnico e comercial dos alimentos compostos para pecuária;

Dr. Manuel Sousa e Silva e Dr. António Isidoro, administradores do grupo Soja de Portugal;

Engenheiro Rui Alves, meu coorientador, técnico responsável pelo acompanhamento nutricional de ruminantes;

Engenheiro António Godinho, técnico responsável pelo acompanhamento nutricional de ruminantes;

Engenheira Sara Velasco, senhor José Carlos Ferreira e senhor Luís Gama, comerciais da zona Norte;

Engenheiro Lima, técnico avícola e senhor Vítor, técnico do laboratório da Sorgal;

Colaboradores do grupo Soja de Portugal;

Professores do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar;

Colegas e amigos;

Pais, irmã, avós e vizinhos.

## ÍNDICE GERAL

Resumo	ii
Agradecimentos	iii
Índice de tabelas	vi
Lista de abreviaturas	vii
1. Apresentação	1
2. Lisina e metionina na nutrição de vacas leiteiras	2
2.1. Introdução	2
2.2. Concentração ideal de aminoácidos na proteína metabolizável / proteína digestível no intestino	3
2.3. Composição em aminoácidos das fontes de proteína	5
2.4. Recomendações para formular dietas utilizando aminoácidos protegidos da ação ruminal	8
2.5. Maximização da produção de proteína microbiana	9
2.5.1. Disponibilidade de azoto no rúmen	10
2.5.2. Disponibilidade de hidratos de carbono no rúmen	11
2.5.3. Sincronização de azoto e de hidratos de carbono no rúmen	12
2.5.4. Importância da fibra	14
2.6. Proteína não degradável no rúmen	14
2.7. O aminoácido histidina	18
2.8. Lisina e metionina protegidos da ação ruminal	18
2.8.1. Produtos com metionina protegida da ação ruminal	20
2.8.2. Produtos com lisina protegida da ação ruminal	23
2.9. Dietas formuladas com lisina e metionina protegidas	25

2.9.1. Estudo: Lee C <i>et al.</i> (2012a) “Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet”	26
2.9.2. Estudo: Lee C <i>et al.</i> (2015) “Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows”	27
2.9.3. Estudo: Apelo SIA <i>et al.</i> (2014) “Effects of reduced dietary protein and supplemental rumen-protected essential amino acids on the nitrogen efficiency of dairy cows”	28
3. Considerações finais	29
4. Bibliografia	31

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Concentração ideal de AA na PDI (de acordo com Rulquin, 2001) e na PM (apresentado por Doepel <i>et al.</i> (2004) com base no modelo NRC).	4
Tabela 2: Composição em AA do leite, da proteína microbiana, do fluido abomasal de animais alimentados com infusões intragástricas isentas de azoto e dos principais alimentos usados na alimentação de vacas leiteiras.	7
Tabela 3: Efeitos da concentração do AA lisina na quantidade de PM e de RUP necessária para fornecer 180g de lisina.	9
Tabela 4: Fração azotada A, B e C, kd e PDR das principais fontes proteicas utilizadas na nutrição de vacas leiteiras.	13
Tabela 5: Percentagem de amido e a sua degradabilidade ruminal das principais fontes de amido utilizadas na nutrição de ruminantes.	14
Tabela 6: Concentrações mínimas recomendadas (%MS) de FDN da forragem, FDN da dieta e FDA da dieta e concentração máxima de CNF (%MS) para dietas de vacas leiteiras quando o milho é a principal fonte de amido.	14
Tabela 7: Composição em PNDR das principais matérias-primas proteicas utilizadas na alimentação de vacas leiteiras assim como a sua digestibilidade, a composição dos AA lisina e metionina e a quantidade de lisina e de metionina metabolizável presente num kg.	17
Tabela 8: Composição em PDIE (%), concentração de lisina e metionina na PDIE e concentração de lisina e metionina na MS do alimento.	17
Tabela 9: Comparação das gramas de metionina metabolizável fornecidas por kg de cada produto comercial.	21
Tabela 10: Meta-análise dos efeitos nas respostas produtivas dos produtos Mepron <sup>®</sup> e Smartamine <sup>®</sup> M (Patton, 2010).	22
Tabela 11: Comparação das gramas de lisina metabolizável fornecidas por kilograma de cada produto comercial.	25

Tabela 12: Comparação da concentração dos AA lisina e metionina em g/dia e em %PM das dietas CP e DR (Arriola *et al.*, 2014)

28

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido (s)
AAE	Aminoácido (s) essencial (ais)
AANE	Aminoácido (s) não essencial (ais)
Arg	Arginina
CCF	Corn Glúten Feed
CNE	Carboidratos não estruturais
CNF	Carboidratos não fibrosos
DDGS	Dried Distillers Grain with Solubles
DEL	Dias em lactação
FDA	Fibra do detergente ácido
FDN	Fibra do detergente neutro
FDNef	Fibra do detergente neutro efetiva
FEDNA	Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal
Fen	Fenilalanina
g	Gramas (s)
g/dia	Gramas (s) por dia
g N/ kg IMS	Gramas (s) de azoto por kilograma de ingestão de matéria seca
g/vaca/dia	Gramas (s) por vaca por dia
HC	Hidrato (s) de carbono (s)
His	Histidina
HMB	DL-2-Hidroxi-4-ácido metiltiobutanóico
HMBi	DL-isopropil -2-hidroxi-4-ácido metiltiobutanóico
Ile	Isoleucina
IMS	Ingestão de matéria seca
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
kg	Quilograma (s)
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
mg/mL	Miligramas (s) por mililitro



MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
N	Azoto
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
NNA	Azoto não derivado de amoníaco
NNA/kg	Azoto não derivado de amoníaco por kilograma
NNP	Azoto não proteico
NRC	National Research Council
PB	Proteína bruta
PDI	Proteína digestível no intestine
PDIE	Proteína digestível no intestino proveniente da energia
PDR	Proteína degradável no rumen
PM	Proteína metabolizável
Pmic	Proteína microbiana
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
Trp	Triptofano
Tre	Treonina
Val	Valina
vs	<i>Versus</i>

## 1. APRESENTAÇÃO

Ao longo do curso fomos sensibilizados para alguns dos impactos que a nutrição animal, e, sobretudo, a das vacas leiteiras, tem na saúde dos animais. Foi nesse sentido que acreditei ser importante para a minha formação a expansão de conhecimentos nesta área.

O estágio curricular foi desenvolvido na Sorgal - Sociedade de Óleos e Rações, SA, na área de alimentos compostos para pecuária. A Sojagado e a Pronutri são as marcas da área de negócio de alimentos para a avicultura e para a pecuária. Na empresa existem, ainda, as marcas Aquasoja, para a área de negócio de alimentos compostos para aquicultura e Pet's Best Nutrition, que concebe e produz alimentos completos secos para cães e gatos (marcas Sirdog e Sircat). A Sorgal pertence ao grupo Soja de Portugal, sendo a área de alimentos compostos para pecuária e para avicultura a mais antiga do grupo, que engloba, para além da Sorgal, a Avicasal e a Savinor, estando no mercado português desde 1943, abrangendo três grandes áreas de negócio: nutrição animal, carne de aves e recolha, tratamento e valorização de subprodutos de origem animal.

Ao longo das 16 semanas acompanhei o trabalho desenvolvido pelos técnicos responsáveis pelo acompanhamento nutricional de ruminantes, o engenheiro Rui Alves, meu coordenador, e o engenheiro António Godinho. Tive, ainda, a oportunidade de acompanhar o Senhor Vítor, técnico do laboratório da Sorgal, o engenheiro Lima, técnico avícola e a engenheira Sara Velasco, comercial das marcas Sojagado e Pronutri, assim, como assisti, parcialmente, a uma auditoria interna à unidade de produção de Pinheiro de Lafões.

Durante o estágio tive a oportunidade de assistir ao módulo formativo IV do “Programa Excelência Avícola” (Doenças Metabólicas), da empresa Alltech®, ministrado pelo Professor Doutor Fernando Rutz, assim como ao encontro com produtores do distrito de Beja, numa palestra sobre novilhos de engorda organizado pela Sojagado, em parceria com a Alltech®, em que esteve presente o Doutor Josep Roquet. Assisti, também, às VII Jornadas de Cunicultura da ASPOC e às VI Jornadas Técnicas de Avicultura da Avicasal.

Aproveitei os dias de trabalho de escritório para realizar pesquisa bibliográfica sobre o tema em estudo e para integrar, projetando, a teoria com a prática do dia-a-dia.

## 2. LISINA E METIONINA NA NUTRIÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

### 2.1. INTRODUÇÃO

Os aminoácidos (AA) são os constituintes das proteínas e apesar de mais de 200 terem sido isolados na natureza, apenas 20 são comumente encontrados como componentes das proteínas (McDonald *et al.*, 2010).

As plantas e muitos microrganismos são capazes de sintetizar as proteínas a partir de simples compostos azotados como os nitratos. Os animais não conseguem sintetizar o grupo amina e para produzirem as suas proteínas necessitam de ingerir fontes de AA. Determinados AA podem ser produzidos a partir de outros pelo processo de transaminação, mas o esqueleto de carbono de alguns não pode ser sintetizado pelo animal; estes são classificados como essenciais ou indispensáveis (McDonald *et al.*, 2010). Esses AA são a arginina (Arg), a histidina (His), a isoleucina (Ile), a leucina (Leu), a lisina (Lis), a metionina (Met), a fenilalanina (Fen), a treonina (Tre), o triptofano (Trp) e a valina (Val). Estudos indicam que a necessidade de AA não essenciais (AAE) das vacas leiteiras, para o crescimento e para a produção de proteína do leite, é assegurada antes das necessidades de aminoácidos essenciais (AAE; NRC, 2001).

Nas décadas de 80 e 90, do século XX, dois grupos de pesquisa destacaram-se nos estudos das necessidades de AA de vacas leiteiras: o grupo americano, liderado por C. G. Schwab, e o grupo francês, liderado por H. Rulquin (Santos *et al.*, 2011). Com base em estudos de dose-resposta, tendo a teor de proteína do leite como variável de produção mais sensível ao balanceamento correto de AA na dieta, estes grupos mostraram que a lisina e a metionina são os AAE limitantes para a produção de proteína do leite em dietas típicas Norte-Americanas, contendo, principalmente, silagem de milho, luzerna, milho, soja e subprodutos de milho e soja (Santos *at al.*, 2011).

Rulquin e Verité (1993), ao analisarem ensaios realizados, entre 1976 e 1991, em que os AA, lisina e metionina, foram fornecidos por infusão abomasal, observaram que as respostas eram maiores quando ambos eram facultados juntos e em dietas à base de milho, sendo as respostas mais evidentes quando adicionados a dietas com maior percentagem em proteína bruta (PB). Também, constataram que, no início da lactação, tanto a produção de leite como a de proteína aumentavam, enquanto que, no meio da lactação, apenas a produção de proteína aumentava (Rulquin, 2014).

Segundo o modelo NRC (2001), o facto da lisina e da metionina serem os AAE limitantes para a produção de proteína do leite parece expectável, pois a maioria das matérias-primas

utilizadas na alimentação dos ruminantes têm baixa concentração destes dois AA, no total dos AAE. A lisina é o primeiro AA limitante quando toda a proteína da dieta é derivada do milho (dietas à base de silagem de milho e alimento complementar à base de subprodutos de milho) (Cabrita *et al.*, 2011). Quando o alimento complementar é à base de soja, a metionina é, geralmente, o primeiro AA limitante (Cabrita *et al.*, 2011).

Os suplementos contendo lisina e metionina cristalinos, normalmente utilizados nas dietas de monogástricos, não são eficazes para ruminantes, uma vez que esses produtos são rapidamente desaminados pelos microrganismos do rúmen (NRC, 2001). Assim, tanto o AA lisina como o AA metionina, para serem eficazes como fontes de AA metabolizáveis devem ser protegidos, estando disponíveis, comercialmente, diferentes fontes, com diferentes graus de proteção. Estes AA são os únicos protegidos da ação ruminal, disponíveis comercialmente.

Os aminoácidos protegidos da ação ruminal podem ser utilizados como aditivos (“on top”) ou como “matérias-primas” na nutrição e na alimentação dos ruminantes. Na utilização “on top” deve-se considerar que o custo irá sempre aumentar, e portanto, é necessário uma melhoria no desempenho produtivo que compense o investimento (Ordway, 2012). Quando se utiliza os aminoácidos protegidos da ação ruminal como “matéria-prima” é possível reduzir a quantidade de proteína *bypass* e, possivelmente, a proteína bruta (PB) da dieta, e, assim, pode fornecer-se outros nutrientes como energia e fibra (Ordway, 2012), essenciais às vacas no início da lactação, pois estas encontram-se em balanço energético negativo (Rode & Kung, 1996). Outras vantagens da redução da quantidade de proteína na dieta são o aumento da eficiência de utilização do azoto (N) e a possível diminuição do custo da dieta (Patton, 2009).

Neste trabalho, começar-se-á por referir as necessidades em AA das vacas leiteiras, apresentando, seguidamente, algumas indicações para reformular as dietas com estes produtos. No seguimento destas indicações, serão abordadas as fontes de proteína que chegam ao intestino delgado, tal como a importância das fontes de amido na otimização do fornecimento de AA ao animal. Por fim, referir-se-ão alguns produtos disponíveis comercialmente e os resultados produtivos que alguns autores obtiveram nos estudos em que os utilizaram em dietas deficitárias em proteína.

## **2.2. CONCENTRAÇÃO IDEAL DE AMINOÁCIDOS NA PROTEÍNA METABOLIZÁVEL / PROTEÍNA DIGESTÍVEL NO INTESTINO**

Segundo o modelo NRC (2001), os AA, e não as proteínas *per se*, são os nutrientes que os animais precisam. Contudo, este modelo apenas define as necessidades para os AA lisina e

metionina, sugerindo que a concentração ótima destes AA na proteína metabolizável (PM) para as funções de manutenção e produção de proteína do leite é 7.2% e 2.4%, respectivamente. Schwab *et al.* (2009) reavaliou as exigências de lisina e metionina para o modelo NRC (2001), com base no método da proteína ideal, através do procedimento indireto de dose-resposta, e obteve como novas exigências os valores de 6,80% PM de lisina e 2,29% PM de metionina, valores que são inferiores aos propostos pela versão oficial de 2001 (Patton *et al.*, 2014). Doepel *et al.* (2004) sugerem, para o modelo NRC, as concentrações ótimas de todos os AAE utilizando o modelo linear segmentado e o modelo logístico (Tabela 1; Schwab, 2014).

O modelo INRA (2007) segue as recomendações de Rulquin (2001; Schröder *et al.*, 2014) que refere que as exigências de lisina e de metionina para vacas de alta produção são concentrações de 7.3% e 2.5% da proteína digestível no intestino (PDI), respectivamente (Schwab, 2014). Rulquin (2001), também, sugere as concentrações ótimas para os outros AAE (Tabela 1; Schwab, 2014).

Aminoácidos	Rulquin (2001)	Doepel <i>et al.</i> (2004)	
		Modelo linear segmentado	Modelo logístico
Arginina	3.1	4.8	4.6
Histidina	3.0	2.4	2.4
Isoleucina	4.5	5.3	5.3
Leucina	8.9	9.4	8.9
Lisina	7.3	7.2	7.2
Metionina	2.5	2.5	2.5
Fenilalanina	4.6	5.2	5.5
Treonina	4.0	5.1	5.0
Triptofano	1.7	5.1	5.0
Valina	5.3	6.1	6.5

Tabela 1: Concentração ideal de AA na PDI (de acordo com Rulquin, 2001) e na PM (adaptado de: Doepel *et al.*, 2004, com base no modelo NRC)

Os modelos nutricionais apresentam as exigências em % de PM (NRC) ou em % de PDI (INRA), contudo Patton *et al.* (2014) sugerem apresentar as necessidades de AA em grama por dia (g/d) e de forma fatorial. Estes autores observam que tanto a produção de proteína do leite como o teor proteico eram melhor relacionados com as gramas de AA, que passaram para o intestino delgado, por dia, comparativamente à percentagem de AA na PM (Patton *et al.*, 2013). Segundo Patton *et al.* (2014), para uma vaca Holstein, na terceira lactação, pesando 650 kg, com uma condição corporal de 2.75 (numa escala de 1 a 5) e com um ganho de peso médio diário de 136 g, produzindo 41 kg de leite, com teor butiroso de 3.60% e 3.10% de proteína verdadeira do leite,

aos 180 dias em lactação, as necessidades de lisina e metionina são, segundo o modelo NRC, 200 g e 67 g, respectivamente.

Contudo, é muito difícil conseguir estas concentrações com as matérias-primas convencionais ou pode ser inviável economicamente com doses altas de AA protegidos. Por isso, Schwab (2004) recomenda concentrações de 6,6% de lisina e 2,2% de metionina na PM.

### 2.3. COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DAS FONTES DE PROTEÍNA

Os aminoácidos que chegam ao duodeno com o potencial de serem absorvidos provêm de três fontes: proteína microbiana (Pmic), proteína não degradável no rúmen (PNDR) e proteína endógena.

A Pmic é, normalmente, a principal fonte de proteína para os ruminantes, podendo representar, aproximadamente, 45 a 55% da PM de vacas leiteiras de alta produção (Santos *et al.*, 2011). Esta é uma proteína de elevada qualidade, pois é equilibrada na maioria dos AAE, em relação à proteína do leite (Patton *et al.*, 2014), sendo a fonte primária de lisina para os ruminantes (Rode & Kung, 1996).

A PNDR é a fonte que contribui em segundo lugar (30 a 45%) para o fornecimento de AA a vacas leiteiras de alta produção (Patton *et al.*, 2014). A concentração de lisina na fração PNDR é, particularmente, baixa quando toda a proteína da dieta é derivada do milho (exemplo, dietas à base de silagem de milho e alimento complementar à base de subprodutos de milho; Cabrita *et al.*, 2011). Quando o alimento complementar é à base de bagaço de soja, a metionina é, geralmente, o primeiro AA limitante (Cabrita *et al.*, 2011).

O modelo NRC (2001) utiliza a composição de AA da PB dos alimentos para estimar a quantidade de determinado AA fornecida pela PNDR da dieta através da equação:

$$RUPAA = \sum_a (DMI_a \times PB_a \times RUP_a \times AA_a \times 0.01)$$

RUPAA: quantidade de determinado AA fornecida pela PNDR da dieta (g);

DMI<sub>a</sub>: quantidade de MS ingerida de um determinado alimento (kg);

PB<sub>a</sub>: quantidade de proteína bruta desse alimento (g/100 g matéria seca (MS));

RUP<sub>a</sub>: quantidade de PNDR desse alimento (g/100 g PB);

AA<sub>a</sub>: quantidade de determinado AA presente nesse alimento (g/100 g PB).

Alguns estudos mostram que existem pequenas diferenças entre a composição de AA da proteína dos alimentos e da PNDR, enquanto outros mostram que existem diferenças significativas (Patton *et al.*, 2014).

A maioria das matérias-primas dos alimentos complementares para ruminantes são subprodutos da indústria e, normalmente, as matérias-primas que lhes deram origem foram processadas pelo calor (Boucher, 2009). O AA lisina é, geralmente, de todos os aminoácidos, o mais suscetível a danos na estrutura molecular durante o processamento pelo calor e, se este for demasiado severo, há diminuição da digestibilidade deste AA no intestino delgado (Boucher, 2009). Isto leva a uma sobre predição da percentagem de lisina na PM pelos modelos, pois estes não têm em conta a digestibilidade intestinal de cada AA na PNDR (Boucher, 2009).

O modelo NRC (2001), por exemplo, considera que a digestibilidade de cada AA é igual à digestibilidade da fração PNDR de cada alimento. Contudo, a digestibilidade do AA lisina na PNDR poderá ser, substancialmente, menor que a digestibilidade da PNDR em alimentos como os grãos destilados com solúveis (DDGS) (Boucher, 2009). As refermentações que ocorrem em forragens mal conservadas também diminuem a digestibilidade do AA lisina e, por conseguinte, levam a uma sobre predição pelos modelos da quantidade de lisina metabolizável (Boucher, 2009).

A proteína endógena é a fonte proteica com menor contribuição para o fluxo de AA para o animal (Patton *et al.*, 2014). Esta proteína é constituída por mucoproteínas da saliva, por células epiteliais do trato respiratório, da boca, do esófago, do retículo-rúmen, do omaso e do abomaso (NRC, 2001). Todavia, aparentemente, apenas as células de descamação do epitélio do omaso e do abomaso e as secreções enzimáticas do abomaso podem alcançar o duodeno, já que as restantes frações proteicas endógenas são, supostamente, degradadas pelos microrganismos do rúmen (NRC, 2001). A equação utilizada pelo modelo NRC (2001) para o cálculo da passagem do N endógeno (em g/d) para o intestino delgado é  $1.9 \times \text{IMS}$  (ingestão de matéria seca; kg/d), contudo as estimativas variam significativamente, de 0.85 para baixas ingestões a 8.5 g N/kg IMS para elevadas ingestões (Patton *et al.*, 2014). Desta forma, a contribuição da proteína endógena pode ser entre 1 e 15% (Patton *et al.*, 2014).

Na Tabela 2 encontra-se a composição em AAE da proteína microbiana (em g/100 g de AA totais), do fluido abomasal (em g/100 g de AA totais) e dos principais alimentos utilizados na nutrição de vacas leiteiras (% da PB).

	<b>Arg</b>	<b>His</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>	<b>Lis</b>	<b>Met</b>	<b>Fen</b>	<b>Tre</b>	<b>Trp</b>	<b>Val</b>
<b>Leite (% PB)</b>	3.3	2.8	5.7	9.9	7.9	3.0	5.0	4.1	1.4	6.6
<b>P.microbiana (g/100g AA totais)</b>	4.5	2.94	5.37	8.06	7.59	2.37	5.38	5.75	---	5.22
<b>Fluido abomasal (g/100g AA totais)</b>	4.97	3.63	4.70	4.84	7.39	1.48	4.70	6.59	---	6.18
<b>Feno de leguminosas (40-46%FDN), 17.8%PB</b>	5.11	1.95	4.18	7.30	5.01	1.55	4.76	4.35	1.47	5.20
<b>Silagem de leguminosas (55-60% FDN), 16.8% PB</b>	3.06	1.66	3.57	6.12	3.28	1.21	4.37	3.34	1.07	4.89
<b>Silagem de gramíneas (55-60% FDN), 16.8% PB</b>	3.06	1.66	3.57	6.12	3.28	1.21	4.37	3.34	1.07	4.89
<b>Feno de gramíneas (55-60% FDN), 13.3% PB</b>	3.88	1.63	3.32	6.22	3.49	1.30	3.92	3.60	1.24	4.51
<b>Silagem de milho (32-38% MS), 8.8 % PB</b>	1.97	1.79	3.34	8.59	2.51	1.53	3.83	3.19	0.44	4.47
<b>Pastone, 9.2%PB</b>	3.85	2.54	3.38	11.60	2.64	2.11	4.56	3.68	0.98	4.90
<b>Milho grão, 9.2%PB</b>	3.85	2.54	3.38	11.60	2.64	2.11	4.56	3.68	0.98	4.90
<b>Cevada grão, 12.4%PB</b>	5.07	2.30	3.47	6.97	3.63	1.70	5.11	3.42	1.17	4.90
<b>Trigo grão, 14.2% PB</b>	4.69	2.43	3.32	6.64	2.81	1.60	4.59	2.90	1.19	4.24
<b>Farinha de colza, 37.8% PB</b>	7.01	2.80	3.83	6.77	5.62	2.54	4.06	4.42	1.46	4.73
<b>Bagaço de soja, 48% PB</b>	7.32	2.77	4.56	7.81	6.29	1.44	5.26	3.96	1.26	4.64
<b>Cascas de soja, 13.9%PB</b>	5.18	2.88	3.86	6.50	6.27	1.16	4.33	3.60	1.08	4.56
<b>Bagaço de algodão, 41%PB</b>	11.05	2.82	3.09	5.89	4.13	1.59	5.31	3.23	1.21	4.24
<b>Bagaço de girassol, 28.4%PB</b>	8.18	2.60	4.09	6.41	3.56	2.29	4.62	3.72	1.19	4.95
<b>Grãos de destilaria da cerveja desidratados, 29.2% PB</b>	5.77	2.00	3.85	7.85	4.08	1.85	4.60	3.58	0.98	4.75
<b>Grãos de destilaria da cerveja desidratados, 28.4% PB</b>	4.47	2.25	3.85	9.61	3.40	1.96	5.57	3.61	0.98	5.14
<b>DDS milho, 27.9% PB</b>	4.06	2.50	3.71	9.59	2.24	1.86	4.87	3.44	0.87	4.70
<b>Corn glúten meal, 65% PB</b>	3.20	2.13	4.11	16.79	1.69	2.37	6.35	3.38	0.53	4.64
<b>Corn glúten feed, 23.8% PB</b>	3.85	2.93	3.10	8.98	2.74	2.13	3.68	3.48	0.56	4.46

Tabela 2: Composição em AA do leite (Patton *et al*, 2014), da proteína microbiana (Melo, 2006), do fluido abomasal de animais alimentados com infusões intragástricas isentas de azoto (Melo, 2006) e dos principais alimentos usados na alimentação de vacas leiteiras (FDN: fibra do detergente neutro; NRC, 2001).



Todos os AAE podem ser limitantes, dependendo da composição da dieta e da contribuição da Pmic para o total da proteína que chega ao duodeno (Patton *et al.*, 2014). Por exemplo, Vanhatalo *et al.* (1999) mostraram que o aminoácido histidina é o primeiro AA limitante em vacas cuja dieta é à base de silagem de gramíneas (56% da MS da dieta) e alimento complementar à base de cereais (18% de cevada e 18% de aveia, % da MS da dieta). Estes autores verificaram que a infusão abomasal de 6.5 g/dia de histidina levou a um aumento significativo na produção de leite (23.6 vs 22.9 kg/dia) e na produção de proteína do leite (721 vs. 695 g/d), o que indica que este AA é o primeiro AA limitante para a produção de leite em vacas alimentadas com silagem de gramíneas e suplementadas com concentrados à base de cereais.

Segundo o NRC (2001), os fatores que contribuem para a histidina ser o primeiro AA limitante no estudo de Vanhatalo *et al.* (1999) são: a baixa concentração de PNDR da dieta, a baixa concentração do AA histidina na proteína microbiana quando comparado com os principais alimentos proteicos utilizados na alimentação de vacas leiteiras e a baixa concentração deste AA na cevada e na aveia comparativamente ao milho.

Os AA de cadeia ramificada (Ile, Leu, e Val) têm sido sugeridos como limitantes na produção de leite em vacas de alta produção, uma vez que são de uso obrigatório pelos tecidos intestinais como fonte de energia (Patton *et al.*, 2014). Apesar das especulações baseadas em estudos mTOR, a adição ou supressão do aminoácido Leu em dietas experimentais não resultou na alteração da produção de proteína do leite (Patton *et al.*, 2014). Os estudos com os restantes aminoácidos de cadeia ramificada também têm sido decepcionantes, não se observando geralmente efeitos sobre a produção de proteína do leite (Patton *et al.*, 2014).

#### **2.4. RECOMENDAÇÕES PARA A FORMULAÇÃO DE DIETAS UTILIZANDO AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS DA AÇÃO RUMINAL**

De acordo com a Doutora Angela Schöder, o Doutor Ivan Eisner, o Engenheiro Anthony Mercier, o Engenheiro Javier Mateus (KEMIN) e o professor Charles Schwab (professor emérito de Ciências Animais da Universidade de New Hampshire), a utilização dos AA protegidos da ação ruminal como “matérias-primas” na formulação de dietas permite, pelo menos, obter os mesmos resultados e com um menor fornecimento de PNDR, permitindo o aumento da eficiência de conversão do N da dieta em N do leite e, geralmente, uma diminuição do custo da fórmula. De seguida são apresentadas as recomendações destes nutricionistas para a formulação com aminoácidos protegidos da ação ruminal (Schröder *et al.*, 2014):

- Primeiro, deve escolher-se o modelo que se vai utilizar, isto porque as matérias-primas são avaliadas de forma diferente em cada modelo;
- Segundo, deve otimizar-se a função ruminal escolhendo matérias-primas com elevada qualidade e com o balanço certo entre os hidratos de carbono (HC) e a proteína degradável no rúmen (PDR) para maximizar a ingestão de alimento e a produção de Pmic;
- Terceiro, deve formular-se para as necessidades em PM (modelo NRC) ou PDI (modelo INRA) e para a concentração ótima de lisina e metionina na PM / PDI;
- Quarto, deve monitorizar-se os níveis de histidina na PM;
- Por fim, pode reduzir-se a suplementação de PNDR; reduções de 1.5 a 2 pontos percentuais de PNDR são comuns quando as dietas são formuladas tendo em consideração os aminoácidos lisina e metionina.

Na Tabela 3 são apresentados os efeitos da alteração da concentração do AA lisina na quantidade de PM e de PNDR necessária para fornecer 180 g de lisina (Schwab, 2014). A dieta foi formulada para vacas com uma produção de 40.9 kg de leite/dia e teor proteico de 3.2%; as necessidades em PM eram de 2857 g; a digestibilidade média da PNDR foi assumida como sendo de 80%; a IMS foi assumida como sendo de 25.5 kg/dia (Schwab, 2014).

Lis (%PM)	Necessidades PM (g/d)	PM microbiana (g/d)	PM endógena (g/d)	PM necessário a partir PNDR (g/d)	PNDR necessária (g/d)	PNDR necessária (%MS)
5.7	3157	1390	121	1646	2058	8.1
6.0	3000	1390	121	1489	1861	7.3
6.3	2857	1390	121	1346	1683	6.6
6.6	2727	1390	121	1216	1520	6.0
6.9	2609	1390	121	1098	1372	5.4

Tabela 3: Efeitos da concentração do AA lisina na quantidade de PM e PNDR necessária para fornecer 180g de lisina.

## 2.5. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA

A síntese de Pmic depende, sobretudo, da disponibilidade de HC e de N no rúmen (NRC, 2001). As bactérias são geralmente capazes de capturar a maioria do amoníaco (NH<sub>3</sub>) que é libertado no rúmen a partir da desaminação dos AA e da hidrólise do azoto não proteico (NNP) (NRC, 2001). Contudo, quando existe excesso de PDR ou falta de energia disponível, a taxa de

libertação de amoníaco excede a taxa de captura pelas bactérias ruminais, resultando na utilização ineficiente dos substratos fermentáveis e na redução da síntese de Pmic (NRC, 2001).

O modelo NRC (2001) assume que a produção de Pmic é 130 g/kg de nutrientes digestíveis totais (NDT) ingeridos e que a necessidade em PDR é 1.18 x Pmic produzida. Portanto, a produção de Pmic é calculada como 0.130 x NDT quando a ingestão de PDR excede 1.18 x Pmic produzida. Quando a ingestão de PDR é inferior a 1.18 x NDT – Pmic produzida prevista, a produção de Pmic é calculada como sendo 85% da PDR ingerida ( $1.00/1.18 = 0.85$ ).

### **2.5.1. DISPONIBILIDADE DE AZOTO NO RÚMEN**

Segundo o modelo NRC (2001), valores entre 10 e 11% de PDR na MS da dieta de vacas leiteiras são exigidos para maximizar a síntese microbiana, sendo que, a máxima produção de leite é obtida quando o valor de PDR corresponde a 12.2% da MS. As concentrações baixas de PDR podem afetar negativamente a ingestão de MS, a fermentação dos HC, a síntese microbiana e por fim, a produção e composição do leite (NRC, 2001). Por outro lado, o excesso de PDR, além de representar um desperdício de proteína, de dinheiro, e ser fonte de poluição ambiental, pode também ter efeito negativo no próprio crescimento microbiano (Santos *et al.*, 2011).

O modelo NRC (2001) assume que a PDR proveniente de fontes de NNP como a ureia são tão efetivas na formação de Pmic como a PDR proveniente de fontes de proteína verdadeira (Broderick & Reynal, 2009). Contudo, Brito *et al.* (2007) observaram que, para dietas com a mesma PB, constituídas por (%MS) 21% de silagem de luzerna e 35% de silagem milho, mas com diferente fonte proteica (12.1% de soja vs 14.1% de algodão vs 16.1% de colza vs 1.9% de ureia), a produção de proteína microbiana aumentou de 26.3 para uma média de 29.4 g de N não amoniacal (NNA) por kg de matéria orgânica (MO) verdadeiramente digestível no rúmen, quando o N da dieta era proveniente de fontes de proteína verdadeira. Estes autores também observaram que a produção de leite e dos constituintes do leite foi 20% a 35% superior quando as vacas foram suplementadas com fontes de proteína verdadeira. Broderick & Reynal (2009) observaram que ao aumentar a proporção de ureia na PDR, pela substituição gradual de bagaço de soja por ureia, com esta constituindo 0, 1.2, 2.4 e 3.7% da PDR, resultava numa diminuição linear do fluxo omasal de NNA microbiano e da eficiência de crescimento microbiano. Estes autores também verificaram uma diminuição da produção de leite e dos constituintes do leite quando a PDR proveniente da soja foi substituída por ureia. Segundo os autores, esta diminuição é justificada, em grande parte, pela diminuição da síntese microbiana, mostrando que a PDR proveniente de fontes de NNP não é tão eficaz como a PDR proveniente de fontes de proteína verdadeira.

Conquanto, a ureia é conhecida como um ótimo substituto de algumas fontes de PDR em dietas à base de silagem de milho. Boucher *et al.* (2007) observaram que numa dieta base com (%MS) 32.0% de silagem de milho, 26.0% de silagem de erva, 4.0% de feno de luzerna, 6.0% de cevada, 19.0% de milho, 6.6% de soja 48, 1.0% de farinha de sangue e 0.3% de farinha de penas, a adição “on top” de ureia aumentava a síntese de Pmic. A dieta sem ureia fornecia todas as necessidades energéticas e todos os nutrientes, exceto PDR e PM. Os autores testaram dietas com (%MS) 0.3, 0.6 e 0.9% de ureia, tendo a síntese de Pmic sido maximizada quando 0.6% de ureia foi adicionada à dieta.

### **2.5.2. DISPONIBILIDADE DE HIDRATOS DE CARBONO NO RÚMEN**

Os HC são a principal fonte de energia na dieta dos ruminantes e normalmente correspondem entre 50% a 70% do total da dieta. De uma forma geral, são classificados em não estruturais (CNE) e em estruturais. Os amidos, os açúcares, os ácidos orgânicos e outros HC de reserva, como os frutanos, constituem os CNE. As pectinas estão incluídas nos hidratos de carbono não fibrosos (CNF), mas não nos CNE (NRC, 2001).

A concentração ótima de CNE ou de CNF em dietas para vacas leiteiras não está bem definida (NRC, 2001). Para evitar acidoses e outros problemas metabólicos, a concentração máxima de CNE deve ser, aproximadamente, 30 a 40% da MS da dieta; as concentrações aceitáveis de CNF são, aproximadamente, 2% a 3% superiores às de CNE (NRC, 2001). Geralmente, é recomendado que a dieta de vacas de alta produção contenha entre 21% a 27% de amido (Sniffen *et al.*, 2009) e que a concentração de amido juntamente com a dos açúcares não ultrapasse os 30% (Boucher, 2012). Outra fonte de energia é a gordura e esta é adicionada às dietas para aumentar a densidade energética (NRC, 2001). Na maioria das situações, a gordura total da dieta não deve exceder os 6-7% da MS total, uma vez que elevadas concentrações podem afetar negativamente a fermentação ruminal e causar diminuição da IMS (NRC, 2001).

Na maioria das matérias-primas, os amidos constituem entre 50% a 100% dos CNE. O tipo de cereal influencia a taxa de fermentação, sendo a aveia o cereal em que o amido é mais degradável, seguindo-se o trigo, a cevada, o milho e o sorgo (NRC, 2001).

O fornecimento de amidos rapidamente fermentáveis permite uma maior síntese de proteína microbiana, como observado por Milgen (1995) que, ao substituir fontes de amido lentamente degradáveis (milho) por fontes de amido mais rapidamente degradáveis (cevada), o fluxo de Pmic para o duodeno aumentou, em média, 10% (NRC, 2001). Contudo, uma combinação

de amidos rápida e lentamente fermentáveis resultará numa maior saúde ruminal (Sniffen *et al.*, 2009).

Os açúcares são fontes de energia rapidamente fermentáveis no rúmen, e quando adicionados a dietas que têm uma concentração de HC degradáveis no rúmen inferior ao ótimo poderão beneficiar a dieta. Assim, dependendo da dieta, estas poderão ser suplementadas com fontes de açúcares entre 2.5 a 5% da MS total (Firkins, 2011). Exemplos de fontes de açúcares utilizadas nas dietas de vacas leiteiras são os melaços de cana (46% de açúcares) e a polpa de citrinos (20.3% de açúcares) (FEDNA, 2015).

### **2.5.3. SINCRONIZAÇÃO DE AZOTO E DE HIDRATOS DE CARBONO NO RÚMEN**

De acordo com o modelo NRC (2001), para além de balancear, numa base diária, os fornecimentos de PDR e de energia fermentável à população microbiana, é necessário ter em consideração a sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen. Contudo, apesar deste modelo reconhecer a importância da sincronização, este e outros modelos não consideram este aspeto (Melo, 2006).

Cabrita *et al.* (2006), num artigo de revisão, mostraram que os benefícios da sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen são contraditórios, quer na eficiência de síntese da proteína microbiana, quer na maximização da produção de leite. Esta sincronização pode ser obtida pela alteração dos ingredientes da dieta ou pela alteração da frequência de alimentação (Cabrita *et al.*, 2006).

Sinclair *et al.* (1995), num estudo realizado em ovelhas, observaram que, para a mesma fonte de HC, a eficiência de síntese de proteína microbiana foi 11 a 20% superior quando os animais foram alimentados com uma dieta sincronizada (cevada + farinha de colza), comparativamente a quando foram alimentados com uma dieta não sincronizada (cevada + ureia; NRC, 2001). Pelo contrário, Casper *et al.* (1999) não observaram quaisquer efeitos no fluxo de N bacteriano quando avaliaram 2 fontes de CNE (milho ou cevada) com 2 fontes de PNDR (farinha de soja ou farinha de soja extrudida): milho + farinha de soja *vs* milho + farinha de soja extrudida *vs* cevada + farinha de soja *vs* cevada + farinha de soja extrudida.

Relativamente à sincronização das disponibilidades de N e de energia no rúmen pela alteração da frequência de alimentação, diversos estudos revistos por Cabrita *et al.* (2006) mostraram que a digestibilidade total da dieta e a IMS não foram afetadas pelo aumento da frequência do fornecimento da dieta, em mais que uma vez ao dia. Contudo, Shabi *et al.* (1999) mostraram aumentos na digestibilidade pós-ruminal da MO, da PB e dos CNE quando aumentaram

a frequência de administração da dieta, mas não observaram quaisquer efeitos na síntese e na eficiência de síntese da proteína microbiana.

Os estudos também indicam que a sincronização das disponibilidades de energia e de N não são necessariamente suficientes, sendo também importante assegurar fontes de energia fermentável e de N degradável com diferentes taxas de fermentação / degradação que permitam uma libertação gradual de energia e de N para os microrganismos do rúmen (Swanepoel, 2009).

Nas Tabelas seguintes encontra-se sumariado as disponibilidades de N e de amido das principais matérias-primas utilizadas no alimento complementar de vacas leiteiras.

	<b>Fração A (% PB)</b>	<b>Fração B (% PB)</b>	<b>Fração C (% PB)</b>	<b>Kd fração B (%/ h)</b>	<b>PDR (% PB)</b>
<b>Bagaço soja 48, 53.8% PB</b>	15	84.4	0.6	7.5	57.4
<b>Grãos de destilaria da cerveja desidratados 29.2% PB</b>	18.3	64.6	17.1	4.7	43.4
<b>Grãos de destilaria da cerveja húmidos 28.4% PB</b>	48.3	42.5	9.2	4.6	64.6
<b>Farinha de colza 37.8% PB</b>	23.2	70.4	6.4	10.4	64.3
<b>DDGS milho 27.9% PB</b>	28.5	63.3	8.2	3.6	49.2
<b>Corn glúten meal 65% PB</b>	3.9	90.9	5.2	2.3	25.4
<b>Corn glúten feed 23.8%PB</b>	48.0	43.2	8.8	7.7	70.0
<b>Bagaço de girassol 28.4 %PB</b>	42.0	52.8	5.2	29.2	84.1
<b>Bagaço de Palmiste*</b>	12.0	70.0	4.0	---	---
<b>Ureia **</b>	100	---	---	---	---

Tabela 4: Fração azotada A, B e C, kd e PDR das principais fontes proteicas utilizadas na nutrição de vacas leiteiras. A fração A inclui o NNP, a proteína rapidamente solubilizada e a proteína em partículas pequenas que escapa pelos poros do saco de Nylon; a fração B representa a proteína verdadeira potencialmente degradável no rúmen; a fração C representa a proteína não degradável no rúmen. O valor PDR foi obtido a partir do valor de PNDR (valor tabelado):  $PDR + PNDR = 100$ . A equação NRC (2001) para obter o valor PDR das matérias-primas é:  $PDR = A + B [Kd / (Kd + Kp)]$ , em que Kd é a taxa de degradação e Kp é a taxa de passagem. [NRC (2001), exceto (\*) e (\*\*): (\*) FEDNA (2015), (\*\*) Brito *et al.* (2007)].

Fonte amido	Amido (%MS)	Solúvel (%amido)	Degradável (%amido)
Aveia	36.6	67	91
Trigo, 11.2%PB	59.0	59	92
Cevada, 11.3%PB	51.1	52	87
Milho espanhol	63.3	27	60
Sorgo branco	64.8	28	52
Subprodutos da panificação, 5% cinzas	46.0	82	95

Tabela 5: Percentagem de amido e a sua degradabilidade ruminal das principais fontes de amido utilizadas na nutrição de ruminantes (FEDNA).

#### 2.5.4. IMPORTÂNCIA DA FIBRA

A otimização da produção de Pmic só é conseguida se existir uma boa saúde ruminal (Santos *et al.*, 2011). Para tal é importante fornecer forragens de elevada qualidade e respeitar os limites máximos de CNF totais em relação aos teores de FDN e de FDN fisicamente efetiva (Santos *et al.*, 2011).

O modelo NRC (2001) recomenda que o valor mínimo da FDN da dieta seja 25% da MS para vacas leiteiras cuja principal forragem seja a luzerna ou a silagem de milho e a principal fonte de amido seja o milho com a condição de que, no mínimo, 19% da MS da FDN seja proveniente da forragem.

A tabela 5 foi adaptada do modelo NRC (2001) e apresenta as recomendações para os limites máximos de CNF da dieta em relação às concentrações mínimas de fibra do detergente neutro (FDN) da forragem, FDN da dieta e fibra do detergente ácido (FDA) da dieta.

FDN mín forragem	FDN mín dieta	CNF máx dieta	FDA mín dieta
19	25	44	17
18	27	42	18
17	29	40	19
16	31	38	20
15	33	36	21

Tabela 6: Concentrações mínimas recomendadas (%MS) de FDN da forragem, FDN da dieta e FDA da dieta e concentração máxima de CNF (%MS) para dietas de vacas leiteiras quando o milho é a principal fonte de amido.

## 2.6. PROTEÍNA NÃO DEGRADÁVEL NO RÚMEN

Chuck Schwab (2012) considera um desafio identificar a concentração ótima de PNDR da dieta. Segundo este autor, os modelos nutricionais podem ser usados como guia, mas não o devem

ser para obter a resposta final, isto porque existem vários fatores que afetam as necessidades em PNDR como, por exemplo, a percentagem de Pmic, a digestibilidade da PNDR, a digestibilidade da lisina na PNDR e a concentração dos AA lisina e metionina na PM. Para este autor, é necessário uma menor concentração de PNDR quando as dietas são balanceadas para os aminoácidos lisina e metionina na PM.

O modelo NRC (2001) calcula a concentração de PNDR de um alimento através da seguinte equação:

$$\text{PNDR} = B [k_p / (k_d + k_p)] + C$$

B: proteína verdadeira potencialmente degradável no rúmen;

C: proteína que não é degradável no rúmen;

$k_p$ : taxa de passagem;

$k_d$ : taxa de degradação.

Ou seja, através da análise do valor de PNDR de uma dieta, nada se pode inferir sobre a sua digestibilidade no intestino.

Noftsker & St-Pierre (2003) mostraram que, para dietas com a mesma percentagem de PNDR na MS, as vacas alimentadas com dietas que continham fontes de PNDR com maior digestibilidade intestinal (superior a 89%) produziram mais leite e mais sólidos do leite que as vacas alimentadas com dietas que continham fontes de PNDR com menor digestibilidade intestinal (igual a 55%).

A soja é a principal fonte proteica utilizada na alimentação de ruminantes (Cabrita *et al.*, 2011), e é a matéria-prima que fornece mais lisina metabolizável por kg de matéria-prima (Tabela 7), contudo alguns estudos, como, por exemplo, os que são descritos de seguida, têm mostrado que em dietas com a mesma concentração de PB, em que a soja é parcial ou até totalmente substituída por outras fontes proteicas mais baratas, a produção de leite e de proteína do leite mantém-se ou até aumenta, apesar da concentração total de lisina na dieta ser inferior.

Broderick *et al.* (2015) verificaram que, ao substituir totalmente a soja por colza em dietas isoproteicas à base de silagem de milho, silagem de luzerna e milho, a produção de leite e de proteína do leite aumentava (contudo, sem alteração do teor proteico). A colza comparativamente à soja tem menor PB, menor PNDR, a PNDR tem menor digestibilidade, e fornece menos lisina e metionina metabolizável por kg de matéria-prima (Tabela 7); por isso, foi adicionada em maior percentagem que a soja, tendo os autores diminuído a percentagem de milho.

Paz *et al.* (2013) verificaram maior produção de leite e de proteína do leite (com aumento do teor proteico), em dietas isoproteicas (16.7% PB), à base de silagem de milho, silagem de



luzerna, feno, semente de algodão e soja, em que a soja foi parcialmente substituída por DDGS. A dieta controle era constituída por (%MS) 5.8% de soja 44, 0.64% de farinha de sangue, 0% de DDGS, 18.4% de milho. Os autores testaram duas dietas: uma com 10% de DDGS (5.8% de soja 44, 0% de farinha de sangue, 11.9% de milho) e outra com 20% de DDGS (1.6% de soja 44, 0% de farinha de sangue, 8.2% de milho), tendo observado melhores respostas produtivas nas dietas com DDGS. O uso de DDGS tem sido normalmente limitado a 20% da MS da dieta, uma vez que a sua concentração em lisina é baixa e este é um AA limitante para a produção de leite (Cabrita *et al.*, 2011). Adicionalmente, é uma matéria-prima que tem uma concentração de PDR inadequada, o que causa diminuição da síntese microbiana (Cabrita *et al.*, 2011).

Na Tabela 7 é apresentada a concentração de PNDR das principais matérias-primas proteicas utilizados na alimentação de vacas leiteiras, assim como a sua digestibilidade, a composição dos AA lisina e metionina e a quantidade de lisina e de metionina metabolizável presente num kg de MS. A quantidade de AA metabolizável num kg de MS da matéria-prima foi obtida a partir da equação:

$$PB \text{ (g/1000g MS)} \times \text{PNDR (\%PB)} \times \text{Digestibilidade PNDR (\%)} \times \text{AA (\%PB)} \times 0.001$$

Esta equação é a adaptação da equação do modelo NRC (2001):

$$dRUPAA = (DMI_a \times PB_a \times RUP_a \times \text{digestRUP}_a \times AA_a \times 0.001)$$

dRUPAA: quantidade de AA digestível fornecida pela PNDR da dieta (g);

DMI<sub>a</sub>: quantidade de MS ingerida de um determinado alimento (Kg);

PB<sub>a</sub>: quantidade de proteína bruta desse alimento (g/100g MS);

RUP<sub>a</sub>: quantidade de PNDR desse alimento (g/100g PB);

DigestRUP<sub>a</sub>: digestibilidade da PNDR desse alimento (g/100g PNDR);

AA<sub>a</sub>: quantidade de determinado AA desse alimento (g/100g PB).

	<b>PB</b> (%MS)	<b>RUP</b> (%PB)	<b>Digest.</b> <b>RUP (%)</b>	<b>Lis</b> (%PB)	<b>Met</b> (%PB)	<b>Lis metab.</b> (g/kg MS)	<b>Met metab.</b> (g/kg MS)
<b>Subprodutos da indústria cervejeira desidratados</b>	29.2	56.6	80	4.08	1.70	5.39	2.25
<b>Subprodutos da indústria cervejeira húmidos</b>	28.4	35.4	85	3.40	1.93	2.91	1.65
<b>Colza</b>	37.8	35.7	75	5.62	1.87	5.69	1.89
<b>DDS milho</b>	29.7	50.8	80	2.24	1.82	2.70	2.20
<b>Corn glúten feed</b>	23.8	30.0	85	2.74	1.61	1.66	0.98
<b>Corn glúten meal</b>	65.0	74.6	92	1.69	2.37	7.54	10.57
<b>Bagaço de algodão 41</b>	44.9	47.9	92	4.13	1.59	8.17	3.15
<b>Bagaço de soja 48</b>	53.8	42.6	93	6.29	1.44	13.41	3.07
<b>Soja tostada</b>	43.0	39.4	85	5.98	1.40	8.61	2.02
<b>Bagaço de girassol</b>	28.4	15.9	90	3.56	2.29	1.45	0.93

Tabela 7: Composição em PNDR das principais matérias-primas proteicas utilizados na alimentação de vacas leiteiras assim como a sua digestibilidade, a composição dos AA lisina e metionina e a quantidade de lisina e de metionina metabolizável presente num kg.

No sítio da Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) a concentração de lisina e de metionina dos alimentos é apresentada em % PDIE, contudo, para uma comparação adequada do fornecimento destes aminoácidos por determinada matéria-prima, é necessário ter em consideração a PDIE do alimento (Tabela 8).

	<b>PDIE</b> (%MS)	<b>Lis</b> (%PDIE)	<b>Met</b> (%PDIE)	<b>Lis</b> (%MS)	<b>Met</b> (%MS)
<b>Subprodutos da indústria cervejeira</b>	16.9	5.2	1.6	0.88	0.27
<b>Bagaço de colza</b>	13.8	6.8	1.9	0.94	0.26
<b>DDS de milho, qualidade média</b>	14.6	5.1	1.8	0.74	0.26
<b>Corn glúten feed, 19% PB</b>	10.0	6.3	1.9	0.63	0.19
<b>Corn glúten meal, 60% PB</b>	45.3	3.5	2.1	1.59	0.95
<b>Farinha de algodão, 38% PB</b>	19.2	5.5	1.6	1.06	0.31
<b>Farinha de soja, 48.5% PB</b>	23.1	6.9	1.6	1.59	0.37
<b>Soja tostada</b>	18.4	6.8	1.5	1.25	0.28
<b>Bagaço de girassol, 32% PB</b>	11.1	5.8	2.0	0.64	0.22
<b>Bagaço de palmiste</b>	12.6	5.4	1.8	0.68	0.23

Tabela 8: Composição em PDIE (%), concentração de lisina e metionina na PDIE e concentração de lisina e metionina na MS do alimento.

## **2.7. O AMINOÁCIDO HISTIDINA**

A redução da concentração de PNDR da dieta é uma das vantagens referidas quando os AA protegidos da ação ruminal são utilizados.

Contudo, Lee *et al.* (2012) observaram que a concentração plasmática do AA histidina diminuía significativamente quando as vacas eram alimentadas com uma dieta deficitária em PNDR, à base de silagem de milho, milho e soja, comparativamente a quando eram alimentadas com uma dieta adequada em PNDR (0.35 vs 0.57 mg/100 mL, P = 0.001). O alimento concentrado da dieta adequada em PNDR era constituído por (%MS) 14.4% de milho, 8.4% de soja tostada e 5.3% de bagaço de soja, enquanto que, o alimento concentrado da dieta deficitária em PNDR era composto por 18.1% de milho, 7.5% de soja tostada e 1.7% de bagaço de soja. Estes autores também verificaram uma diminuição da produção de proteína do leite quando as vacas foram alimentadas com a dieta deficitária em PNDR, que não foi revertida com a suplementação com lisina e metionina.

Lee *et al.* (2012a) mostraram que ao suplementar uma dieta deficitária em PNDR com lisina, metionina e histidina, era obtida a mesma produção de leite e maior produção de proteína do leite (e também maior teor proteico) comparativamente a quando era fornecida a dieta adequada em PM. Por conseguinte, os autores concluíram que a histidina é um AA limitante para a produção de leite e dos seus constituintes em dietas deficitárias em PNDR.

O modelo NRC e o modelo INRA não apresentam as recomendações para a concentração de histidina ótima para a produção de proteína do leite. Contudo, Rulquin (2001) sugere que a concentração de histidina na PDI seja de 3.0%; enquanto que, Doepel *et al.* (2004) sugerem que seja de 2.4% da PM (Schwab, 2014). Estudos da Universidade da Pensilvânia mostraram que a concentração de histidina, na PM, deve ser de 2.2%; porém, Lapierre *et al.* (2014) sugerem que seja de 2.3% da PM (Patton, 2014).

## **2.8. LISINA E METIONINA PROTEGIDOS DA AÇÃO RUMINAL**

Como já referido, os suplementos contendo lisina e metionina cristalinos, normalmente utilizados em rações de monogástricos, não são eficazes para bovinos, uma vez que esses produtos são rapidamente desaminados no rúmen pelos microrganismos.

As tecnologias de proteção utilizadas pela indústria para proteger o AA metionina são: polímeros sensíveis ao pH, matrizes de lípidos, revestimento com etil-celulose e análogos de metionina de baixa degradação ruminal (Chen *et al.*, 2011). Dadas as características físicas e

químicas da lisina tem sido difícil proteger este AA com estas tecnologias e formas mais complexas de proteção têm sido desenvolvidas para o proteger (Barton, 2010).

A proteção com polímeros sensíveis ao pH ácido resulta num produto com elevados coeficientes de proteção ruminal e de libertação intestinal dos AA (NRC, 2001). Este sistema de proteção é independente da função enzimática e depende das diferenças de pH entre o rúmen e o abomaso (NRC, 2001). Esta tecnologia é considerada a mais efetiva, pois o produto resultante apresenta uma biodisponibilidade elevada e relativamente constante (entre 70 a 80%; Melo, 2006). Dependendo do pH crítico do polímero, os produtos com esta tecnologia podem ter utilidade limitada em situações em que o pH ruminal é baixo e poderão ter eficácia reduzida quando misturados durante muito tempo com a silagem na dieta completa (TMR; Rode & Kung 1996).

A tecnologia de proteção com matriz lipídica depende das enzimas intestinais para ser destruída (NRC, 2001). Esta tecnologia permite um grau razoável, quer de proteção à degradação no rúmen, quer de libertação intestinal (NRC, 2001).

A proteção com revestimento de etil-celulose minimiza a digestão enzimática e a libertação dos AA depende da ação física e da abrasão (Swanepoel, 2009). O excesso de mistura no alimento complementar ou no TMR pode causar a degradação do revestimento de proteção (Swanepoel, 2009).

O hidroxianálogo de metionina DL-2-Hidroxi-4-ácido metiltiobutanóico (HMB) é uma alternativa à proteção por encapsulamento (NRC, 2001). O HMB, para além de fornecer metionina metabolizável, parece estimular o metabolismo microbiano no rúmen (Chen *et al.*, 2011). A esterificação do HMB com isopropanol (HMBi) resulta numa molécula mais resistente à degradação microbiana. Esta molécula também tem o potencial de estimular a atividade dos microrganismos ruminais (Chen *et al.*, 2011)

Quando se pretende escolher o melhor produto, é necessário considerar todas as características que determinam a sua eficácia, pois a utilização de apenas uma das características (por exemplo, a % *bypass*) pode ser enganadora (Christofferson & Herrick, 2014). Deve considerar-se a percentagem do AA existente no produto, a percentagem do AA existente no produto que não é degradada no rúmen e a percentagem do AA não degradado no rúmen disponível para absorção intestinal, ou seja, para uso do animal (Christofferson & Herrick 2014). Quando num produto é indicada a percentagem de AA metabolizável, refere-se a percentagem do AA existente no produto que está disponível para absorção intestinal, ou seja, para ser usada pelo animal (Christofferson & Herrick, 2014). Quando é indicada a biodisponibilidade do produto, refere-se a quantidade de produto não degradado no rúmen e disponível para absorção intestinal

(% *bypass* x % digestível); para se conhecer a percentagem de AA metabolizável é necessário multiplicar esse valor pela percentagem de AA presente no produto (Christofferson & Herrick, 2014).

### **2.8.1. PRODUTOS COM METIONINA PROTEGIDA DA AÇÃO RUMINAL**

Os produtos Smartamine<sup>®</sup> M (ADISSEO<sup>®</sup>), Mepron<sup>®</sup> (EVONIK<sup>®</sup>), Novimet<sup>®</sup> (INNOVAD<sup>®</sup>), Alimet<sup>®</sup> (NOVUS<sup>®</sup>), MHA<sup>®</sup> (NOVUS<sup>®</sup>), MetaSmart<sup>®</sup> (ADISSEO<sup>®</sup>) e MetaSmart<sup>®</sup> Dry (ADISSEO<sup>®</sup>) são exemplos de fontes de metionina protegida disponíveis comercialmente em Portugal.

Os produtos Smartamine<sup>®</sup>, Mepron<sup>®</sup>, Novimet<sup>®</sup>, MHA<sup>®</sup> e MetaSmart<sup>®</sup> Dry são comercializados no estado sólido (microgranulado), não sendo aconselhado pelos fabricantes utilizar em granulados. Alimet<sup>®</sup> e MetaSmart<sup>®</sup> são produtos no estado líquido e estão preparados para as altas temperaturas da granuladora.

O produto Smartamine<sup>®</sup> M contém, no mínimo, 70% de DL-metionina revestida com um polímero sensível ao pH. Segundo o fabricante, a sua proteção *in vitro* é de no mínimo 90%, sendo libertado, *in vitro*, o mínimo de 90%. O fabricante recomenda usar de acordo com os conselhos do nutricionista, de modo a satisfazer as necessidades do animal.

O produto Mepron<sup>®</sup> contém, no mínimo, 85% de DL-metionina revestida com etilcelulose, sendo 15 a 20 % da metionina degradada no rúmen e cerca de 90% da metionina restante é absorvida no intestino. Segundo o fabricante, a inclusão típica é de 10 a 20 g/vaca/dia, dependendo do rendimento e da composição da dieta.

O produto Novimet<sup>®</sup> contém DL-Metionina encapsulada numa matriz de gordura de origem vegetal. Segundo o fabricante, 1 kg de Novimet<sup>®</sup> contém 500 gramas de DL-metionina, das quais 385 gramas são rúmen *bypass* e 345 gramas são DL-metionina biodisponível para absorção no intestino; o fabricante recomenda fornecer 20 a 80 g/animal/dia.

Os produtos Alimet<sup>®</sup> e MHA<sup>®</sup> têm como componente ativo o DL-2-Hidroxi-4-ácido metiltiobutanóico (HMB). Esta molécula é um ácido orgânico e, por isso, é mais resistente à degradação microbiana no rúmen, atravessando-o rapidamente na fase líquida. Segundo o fabricante, aproximadamente 40% de HMB passa para o intestino juntamente com a fase líquida da digesta e é 100% absorvido pelo animal; contudo, a percentagem de metionina *bypass* depende da fase líquida e varia, segundo o fabricante, entre 20 a 60%. O produto Alimet<sup>®</sup> é uma fonte de metionina líquida com 88% de metionina ativa e, segundo o fabricante, deve ser adicionado segundo a recomendação do nutricionista. MHA<sup>®</sup> é uma fonte de metionina no estado sólido (sal cálcico de ácido 2-hidroxi-4-(metiltio) butanóico) com o mínimo de 84% de metionina ativa.

O produto MetaSmart<sup>®</sup> tem como componente ativo o DL-isopropil -2-hidroxi-4-ácido metiltiobutanóico (HMBi). O grupo isopropil protege o produto da degradação no rúmen, enquanto facilita a sua absorção pela parede ruminal. Está disponível em duas formas: líquida (MetaSmart<sup>®</sup>) e pó (MetaSmart<sup>®</sup> Dry). O valor equivalente de metionina no HMBi é 78%, sendo 50% do HMBi absorvido pela parede do rúmen e os outros 50% decompõe-se no rúmen em HMB e isopropanol. O produto MetaSmart<sup>®</sup> contém, no mínimo, 95% de HMBi, 370 g/kg de metionina metabolizável e 370 g/kg de HMB disponível no rúmen, enquanto que, o produto MetaSmart<sup>®</sup> Dry contém, no mínimo, 57% de HMBi, 222 g/kg de metionina metabolizável e 222 g/kg de HMB disponível no rúmen.

Na Tabela 9 é apresentada a quantidade de metionina metabolizável que cada produto fornece e conclui-se que os produtos Smartamine<sup>®</sup> M, Mepron<sup>®</sup>, MetaSmart<sup>®</sup> (forma líquida e sólida) e Novimet<sup>®</sup> são os mais eficientes para fornecer metionina metabolizável. De acordo com alguns estudos, os produtos cujo componente ativo é o HMB, de que são exemplo o Alimet<sup>®</sup> e o MHA<sup>®</sup>, são altamente degradados no rúmen, sendo a percentagem *bypass* inferior a 5% (Santos *et al.*, 2011). O resultado mais frequentemente obtido, quando as dietas são suplementadas com o HMB, é o aumento do teor butiroso (Chen *et al.*, 2011).

<b>Produto</b>	<b>Metionina metabolizável (g met/Kg de produto)</b>
Smartamine <sup>®</sup>	567
Mepron <sup>®</sup>	612 – 650
Novimet <sup>®</sup>	345
MetaSmart <sup>®</sup>	370
MetaSmart <sup>®</sup> Dry	222
Alimet <sup>®</sup>	176 – 528
MHA <sup>®</sup>	168 – 504

Tabela 9: Comparação das gramas de metionina metabolizável fornecidas por kilograma de cada produto comercial.

Chen *et al.* (2011) compararam a resposta produtiva de vacas leiteiras que ingeriram dietas suplementadas com MetaSmart<sup>®</sup> e com Smartamine<sup>®</sup> M e verificaram que a produção de leite e o teor butiroso são semelhantes entre a dieta controlo e as dietas suplementadas com 8 gramas de metionina metabolizável; contudo, observaram maior teor proteico nas dietas experimentais em relação à dieta controlo. O aumento da produção de proteína do leite foi semelhante entre a dieta suplementada com MetaSmart<sup>®</sup> e a suplementada com Smartamine<sup>®</sup> M.

Contudo, Čermakova *et al.* (2012) observaram diferenças entre o produto MetaSmart<sup>®</sup> e o produto Smartamine<sup>®</sup> M. As dietas experimentais foram ajustadas para fornecerem, pelo menos,

2% de metionina na PDIE. Estes autores verificaram que as vacas quando ingeriram dietas suplementadas com MetaSmart<sup>®</sup>, apesar de apresentarem menor IMS, tiveram maior produção de leite do que quando alimentadas com dietas suplementadas com Smartamine<sup>®</sup> M ou com a dieta controlo. A Smartamine<sup>®</sup> M também aumentou a produção de leite em relação à dieta controlo, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo. O teor proteico foi semelhante quando as vacas ingeriram dietas suplementadas com MetaSmart<sup>®</sup> ou com Smartamine<sup>®</sup> M, tendo sido superior ao da dieta controlo. Segundo Schröder *et al.* (2014), o produto MetaSmart<sup>®</sup> é o que apresenta melhor relação preço-benefício.

Patton (2010), através da análise de 36 estudos, comparou o efeito dos dois principais produtos com metionina protegida da ação ruminal, Mepron<sup>®</sup> e Smartamine<sup>®</sup> M, na IMS, na produção de leite, na produção de proteína verdadeira do leite e na quantidade de gordura do leite. Os efeitos nas variáveis estudadas são apresentados na tabela seguinte.

Resposta	Média ajustada do efeito do produto	
	Mepron <sup>®</sup>	Smartamine <sup>®</sup> M
IMS (kg)	-0.10	0.04
Leite (kg)	0.35	-0.22
Proteína verdadeira do leite (%)	0.06	0.08
Produção de proteína do leite (kg)	0.037	0.016
Gordura do leite (%)	-0.01	-0.02
Produção de gordura do leite (Kg)	0.024	-0.002

Tabela 10: Meta-análise dos efeitos nas respostas produtivas dos produtos Mepron<sup>®</sup> e Smartamine<sup>®</sup> M (Patton, 2010).

Patton (2010) sugeriu que a diminuição na IMS causada pelo Mepron<sup>®</sup> possa ser devida a fatores organoléticos. Em relação à produção de leite, apenas para o Mepron<sup>®</sup> foi observado um aumento na produção. Apesar de nos estudos revistos por este autor, as vacas com Smartamine<sup>®</sup> M terem tido menor produção de leite, a produção de proteína verdadeira foi maior nas dietas com Mepron<sup>®</sup>, sendo o dobro da de vacas com Smartamine<sup>®</sup> M. Embora existam diferenças na forma de proteção dos produtos, o autor afirma que é difícil esta pequena quantidade de material (aproximadamente, 0.015% da MS ingerida) ser a causa das diferenças observadas. Este autor sugere que estas sejam causadas pela forma de libertação do produto ou pela porção do intestino em que ocorre a libertação.

Schröder *et al.* (2014), num estudo de campo com o produto Smartamine<sup>®</sup> M, realizado numa exploração com 75 vacas leiteiras, em que cada vaca tinha uma produção média de 11,714 kg/lactação, teor butíroso de 3.89% e teor proteico de 3.30%, observaram que, ao adicionar 15

g desse produto à dieta inicial, a produção de leite aumentou 1.9 kg/vaca nas vacas até 100 dias em lactação (DEL), enquanto o teor proteico teve apenas uma pequena alteração. A produção de leite nas vacas com 101 a 200 DEL aumentou 0.5 kg/vaca e o teor proteico 0.16 unidades percentuais. Neste estudo, não foram observados efeitos nas vacas na terceira fase da lactação. A produção de proteína do leite aumentou 63 g/vaca/dia nas vacas até 100 DEL e 73 g/vaca/dia nas vacas entre 101 a 200 DEL. Também foi observado um efeito positivo no teor butiroso nas vacas no início e no fim da lactação. Os autores concluíram que a adição de 15 g de Smartamine<sup>®</sup> M “on top” aumentava a performance produtiva no início e no meio da lactação, verificando que o efeito máximo ocorreu 3 meses após o início do ensaio.

Estudos de campo com o produto Novimet<sup>®</sup>, apresentados pela INNOVAD<sup>®</sup>, mostraram que a adição de 50 g/vaca/dia aumenta o teor de proteína do leite em 0.1 a 0.15 unidades percentuais.

Os estudos e as revisões de estudos apresentados anteriormente mostram que a adição dos produtos comerciais com metionina protegida da ação ruminal resulta em maior produção de leite e/ou maior produção de proteína do leite e/ou gordura do leite.

### **2.8.2. PRODUTOS COM LISINA PROTEGIDA DA AÇÃO RUMINAL**

A lisina é um aminoácido muito lábil e tem sido difícil para a indústria conseguir um processo de proteção eficaz, sendo que só apenas recentemente produtos com lisina protegida foram disponibilizados comercialmente (Barton, 2010).

De acordo com Chuck Schwab, na apresentação “Getting Comfortable with Amino Acid Balancing” (2014), os produtos com lisina protegida disponíveis comercialmente são AjiPro<sup>®</sup>L (Ajinomoto<sup>®</sup>), Bovi-Lysine<sup>®</sup> (QualiTech<sup>®</sup>), LysiPEARL<sup>®</sup> (KEMIN<sup>®</sup>), Megamine<sup>®</sup>L (Arm & Hammer Animal Nutrition<sup>®</sup>), MetaboLys<sup>®</sup> (H.J. Baker<sup>®</sup>) e USA<sup>®</sup> Lysine (PURINA<sup>®</sup>).

Um dos primeiros produtos com lisina protegida colocado no mercado foi o Aminoshure<sup>®</sup> L (BALCHEM<sup>®</sup>) (Anónimo, 2008), contudo a BALCHEM<sup>®</sup>, em 2012, decidiu suspender a sua venda, uma vez que a biodisponibilidade do produto era inferior à inicialmente observada (Anónimo, 2012), como mostrado por Paz *et al.* (2013), que, ao adicionarem este produto a uma dieta com 20% de DDGS (%MS), verificaram menor produção de leite e menor teor proteico na dieta suplementada com o AminoShure<sup>®</sup> L.

Os produtos com lisina protegida estão apenas disponíveis no estado sólido, não sendo aconselhado pelos fabricantes utilizar em granulados, exceto o produto Megamine<sup>®</sup>L que pode ser *peletizado*.



O produto Bovi-lysine® contém, no mínimo, 47% de L-lisina protegida por um sistema duplo: os AA estão envolvidos numa matrix lipídica inerte e esta mistura é recoberta com etil-celulose. Segundo o fabricante, 52.7% da lisina protegida é *bypass* e 27.0% do produto ingerido é absorvido pela corrente sanguínea, ou seja, por cada 100 g do produto ingerido, 12.7 g de lisina são absorvidas pela corrente sanguínea.

O produto AjiPro®L contém, no mínimo, 38% de HCl L-lisina. Segundo o fabricante, 80% do produto atravessa o rúmen e a digestibilidade no intestino delgado é superior a 60%. De acordo com o fabricante, devem ser adicionadas 25 a 200 g/vaca/dia (dependendo da composição da dieta). Nocek *et al.* (2013) observaram que ao suplementar a dieta de vacas no período de transição (21 dias antes e 21 dias após o parto) com AjiPro®L (100 g/dia pré-parto e 150 g/dia pós-parto), a produção de leite e a produção de gordura do leite aumentavam, não havendo alterações na produção de proteína do leite, nem no teor butiroso. Nelson E Lobos *et al.* (2013) verificaram que a produção de leite e de proteína verdadeira do leite aumentou quando foram adicionadas 125 g/d de AjiPro® L a uma dieta cujo alimento concentrado era à base de subprodutos de milho.

O produto LysiPEARL® contém, no mínimo, 47.5% de HCl L-lisina encapsulada numa matrix lipídica de origem vegetal, sendo este produto produzido a partir da tecnologia “spray freezing”; 54% do produto é rúmen *bypass* e a digestibilidade é de 91%. Segundo o fabricante, devem ser adicionadas 20 a 100 g/vaca/dia, dependendo da dieta, e este produto deve ser misturado cuidadosamente no alimento complementar. Vargas-Rodriguez *et al.* (2014) observaram que a adição de 48.8 g/vaca/dia de LysiPEARL® aumentou a produção de leite, contudo a produção de gordura do leite e a produção de proteína do leite mantiveram-se, resultando num teor butiroso e num teor proteico inferiores ao da dieta controlo.

O produto Megamine® L contém 20% de HCl L-lisina; este produto é 58% rúmen *bypass* e 46 a 50% é absorvido no rúmen. Mullins *et al.* (2013) observaram que ao adicionar Megamine® L a uma dieta com 26.6% de Corn Glúten Feed (%MS) não existia alteração na produção de leite, a produção de gordura do leite aumentava ligeiramente e a produção de proteína diminuía ligeiramente.

O produto Metabolys® contém, no mínimo, 30% de L-lisina. Segundo o fabricante, o produto é aproximadamente 89% rúmen *bypass* e aproximadamente 80% da lisina *bypass* é absorvido no intestino. Bernard *et al.* (2014) verificaram que a adição de 164 g de Metabolys® a uma dieta com (%MS) 7.98% de semente de algodão e 3.81% de soja 48 aumentou a produção de leite, o teor butiroso e o teor proteico.

O produto USA<sup>®</sup> Lysine contém L-lisina e segundo o fabricante fornece 44% de lisina metabolizável.

Os estudos apresentados anteriormente mostram que a adição destes produtos comerciais com lisina protegida da ação ruminal resulta, de uma forma geral, em maiores respostas produtivas.

Comparando os produtos com lisina protegida com os produtos com metionina protegida, os primeiros fornecem menor percentagem de AA metabolizável. O produto USA<sup>®</sup> Lysine parece ser o que fornece mais lisina metabolizável.

<b>Produto</b>	<b>Lisina metabolizável (g lis/kg de produto)</b>
Bovi-lysine <sup>®</sup>	128
AjiPro <sup>®</sup> L	182
LysiPEARL <sup>®</sup>	233
Megamine <sup>®</sup> L	92 – 100
Metabolys <sup>®</sup>	214
USA <sup>®</sup> Lysine	440

Tabela 11: Comparação das gramas de lisina metabolizável fornecidas por kg de cada produto comercial.

## **2.9. DIETAS FORMULADAS COM LISINA E METIONINA PROTEGIDAS**

Bennet *et al.* (2011) consideram possível poupar entre 5 a 10 cêntimos/vaca/dia na alimentação de vacas leiteiras, mantendo a desempenho produtivo, quando as dietas fornecem as necessidades diárias em lisina e metionina, através da redução da concentração proteica da dieta e utilizando AA protegidos da ação ruminal. Contudo, as tentativas em formular dietas para uma menor concentração em PB, mas com concentração adequada de lisina e metionina, não tiveram sucesso nas dietas usadas na Europa, pois estas contêm menor percentagem de PB que as dietas americanas (Rulquin, 2014). Pesquisas indicam que a concentração de PB das dietas de vacas no início da lactação pode ser diminuída para valores entre 16.5% e 17.5%, quando estas são balanceadas para os aminoácidos lisina e metionina, sem comprometer a produção de leite e dos seus constituintes (Sloan, 2006).

A redução de uma unidade percentual de PB no alimento complementar poderá significar uma diminuição no custo de fórmula de cerca de 5 euros por tonelada (A.J.M. Fonseca, 2015, comunicação pessoal). Por exemplo, se forem adicionadas 10 g de Smartamine<sup>®</sup> M por vaca - dia (preço médio de venda: 11,70 euros/Kg; Teresa Costa – INDUKERN, comunicação pessoal) e 15 g de USA<sup>®</sup> Lysine por vaca - dia (preço: \$3.37/pound, ou seja, cerca de 7 euros/kg; Anónimo,

2014), o custo da fórmula aumentará cerca de 2.20 euros/tonelada se se considerar que cada animal ingere 10 kg de alimento concentrado por dia. Contudo, apesar de um alimento complementar formulado com uma redução de 1 unidade percentual de PB e suplementado com 10 g de Smartamine<sup>®</sup> M e 15 g de USA<sup>®</sup> Lysine (por vaca - dia) permitir uma redução de custo, não é possível prever se os resultados produtivos serão os mesmos, porque é necessário saber a percentagem de lisina e de metionina na PM/PDI, a concentração de PDR da dieta, a digestibilidade da fração PNDR das matérias-primas, entre outros.

Os modelos nutricionais atuais não ajustam as necessidades de PM, e conseqüentemente as de PNDR, para mudanças nas concentrações de AA na PM (Schwab, 2012). Segundo Chuck Schwab (2012), os nutricionistas não devem ficar surpreendidos que seja necessário fornecer pouca PNDR quando se considera as necessidades dos AA lisina e metionina na PM. Segundo este autor, as experiências de campo indicam que as vacas são mais responsivas a mudanças no conteúdo de PNDR das dietas, quando esta tem um balanço adequado em AA comparativamente a quando não têm um balanço tão adequado. Este autor considera que é possível reduzir entre 1.5 a 2 unidades percentuais de PNDR nas dietas formuladas com os aminoácidos lisina e metionina protegidos da ação ruminal.

Para verificar se é possível manter a produção de leite e dos constituintes do leite em dietas com menor concentração proteica, mas que forneçam as necessidades em lisina e metionina, foram selecionados artigos que comparam o efeito da adição simultânea dos AA lisina e metionina, sob a forma de produtos comerciais, a dietas deficitárias em PM e com menor concentração em PNDR com a resposta produtiva obtida em dietas adequadas em PM. Foram selecionados 3 estudos com estas características: Lee *et al.* (2012a), Apelo *et al.* (2014) e Lee *et al.* (2015). Ao longo do texto serão usadas as abreviaturas: CP (controlo positivo, que corresponde à dieta adequada em PM), CN (controlo negativo, que corresponde à dieta deficitária em PM) e DR (dieta reformulada, que corresponde à dieta deficitária em PM, mas adequada nos AA lisina e metionina). Todos os estudos consideram que existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados, para  $P < 0.05$ .

### **2.9.1. ESTUDO: Lee C *et al.* (2012a) “Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet”**

Lee *et al.* (2012a) observaram que ao reduzir em 13% a PM da dieta inicial e em 1.5 unidades percentuais a PNDR, a produção de leite diminuía (38.8 vs 35.2 kg/dia,  $P < 0.01$ ), bem

como a produção de proteína verdadeira do leite (1.13 vs 1.01 kg/dia,  $P < 0.01$ ). Relativamente à produção de gordura do leite, os resultados foram semelhantes.

Quando os autores adicionaram lisina e metionina protegida à dieta CN, a diminuição na produção de leite foi parcialmente revertida (36.9 kg/dia), tendo a produção de proteína do leite sido totalmente revertida (1.10 kg/dia). Estes autores sugeriram que o aumento da produção de leite deveu-se ao aumento da IMS (0.7 kg/dia), o que indica um potencial efeito fisiológico dos AA sobre a IMS. Segundo estes autores, a diminuição da IMS nas vacas alimentadas com a dieta CN deveu-se à diminuição do fornecimento de PDR, sendo que estas dietas apresentavam uma concentração de 9.1% (%MS).

Segundo o modelo NRC (2001), valores entre 10 a 11% de PDR na MS total da dieta de vacas leiteiras são exigidos para maximizar a síntese microbiana, o que não se verifica nas dietas CN e DR. Estes valores poderiam ter sido alcançados com a adição de ureia, uma vez que estas dietas não têm este suplemento de NNP.

### **2.9.2. ESTUDO: Lee C *et al.* (2015) “Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows”**

Lee *et al.*, num estudo realizado em 2015, não observaram qualquer efeito na IMS quando as vacas foram alimentadas com uma dieta deficitária em PM, em PDR e em PNDR. A percentagem de PDR na dieta DR era de 9.1% da MS total da dieta, tal como no estudo de 2012a.

Os autores também não observaram diferenças estaticamente significativas na produção de leite, na produção de proteína, nem na produção de gordura entre as dietas CP, CN e DR. Segundo os autores, a ausência de diferenças estatisticamente significativas pode ser justificada por não ter havido diminuição na IMS.

Se se comparar, entre este estudo e o de 2012a, a concentração do AA histidina no plasma sanguíneo, AA considerado limitante em dietas deficitárias em PNDR, observa-se que no estudo de 2015, a concentração deste AA no plasma sanguíneo aumentou entre a dieta CP e a dieta CN (37.6 vs 40.7  $\mu\text{M}$ ), o que não aconteceu no estudo de 2012a (48.4 vs 25.9  $\mu\text{mol/L}$ ).

Neste estudo, a adição de lisina e de metionina protegidos da ação ruminal à dieta CN não levou a alterações significativas na produção de leite nem dos constituintes do leite, o que pode ser explicado pela não existência de um aumento significativo na concentração plasmática de lisina entre a dieta CN e a dieta DR (52.2 vs 58.7  $\mu\text{M}$ ;  $P = 0.20$ ). O produto utilizado nesta experiência foi a Smartamine<sup>®</sup> M; atualmente, este produto não está disponível no mercado.

### 2.9.3. ESTUDO: Apelo SIA *et al.* (2014) “Effects of reduced dietary protein and supplemental rumen-protected essential amino acids on the nitrogen efficiency of dairy cows”

Apelo *et al.* (2014) observaram que ao reduzir em 15% a PM da dieta inicial e em 1.9 unidades percentuais a PNDR não existia diferenças estaticamente significativas na produção de leite e de gordura entre as dietas CP, CN e DR, apesar de haver diminuição na dieta CN e DR. Contudo, a produção de proteína verdadeira do leite foi estatisticamente diferente entre a dieta CP e a dieta CN (1.103 vs 1.012 kg/d). Esta diferença foi parcialmente revertida quando os animais ingeriram a dieta DR (1.031 kg/dia); a produção de leite e a produção de proteína verdadeira do leite também foram parcialmente recuperadas com a adição de lisina e metionina.

Apesar da dieta DR não ser deficitária em lisina e metionina na PM (de acordo com as recomendações de Schwab, 2004), se se comparar o fornecimento destes AA ao animal (em g/dia) verifica-se que a dieta CP fornece mais lisina que a dieta DR (Tabela 12), o que mostra que é melhor apresentar as necessidades em aminoácidos em g/dia, como sugerido por Patton *et al.* (2014).

	Dieta CP		Dieta DR		Schwab 2004
	g/d	%PM	g/d	%PM	%PM
<b>Lisina</b>	188	6.15	164	6.64	6.6
<b>Metionina</b>	55	1.80	53	2.15	2.2

Tabela 12: Comparação da concentração dos AA lisina e metionina em g/dia e em %PM das dietas CP e DR (Arriola *et al.*, 2014)

A concentração plasmática de lisina, quando os animais ingeriram a dieta CP, foi de 88.7  $\mu\text{M}$ , sendo de 85.1  $\mu\text{M}$  quando ingeriram a dieta DR; a concentração plasmática de lisina na dieta CN foi de 78.9  $\mu\text{M}$ . Desta forma, talvez a produção de proteína verdadeira do leite na dieta DR fosse semelhante à da dieta CP, se esta tivesse fornecido a mesma quantidade de lisina metabolizável em gramas por dia.

Em relação à composição química da dieta DR e da dieta CP, a primeira apresentava maior concentração de PDR (%MS da dieta), mais nutrientes digestíveis totais e mais amido, ou seja, mais N e mais energia para maximizar a produção de proteína microbiana. A concentração de CNF e de amido, quer na dieta CP, quer na dieta DR, foi superior às recomendações do modelo NRC (2001). Contudo, segundo os autores, os animais não exibiram sinais de acidose ruminal. Porém, não há evidências de que a atividade microbiana não estivesse deprimida resultado de uma acidose ruminal subclínica.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lisina e a metionina são os AAE considerados limitantes para vacas leiteiras em dietas à base de silagem de milho, luzerna, milho, soja e subprodutos de milho e soja. Comercialmente existem vários produtos com diferentes percentagens de lisina/metionina metabolizável.

Através da análise de alguns estudos observou-se que, de uma forma geral, a adição “on top” desses produtos resulta em maiores respostas produtivas, ou seja, fornecem lisina ou metionina que é absorvida no intestino, chegando à glândula mamária. Contudo, o aumento da produção de leite e/ou da produção de proteína e/ou da produção de gordura pode não ser suficiente para compensar o custo adicional da utilização destes produtos.

A utilização dos AA protegidos como “matéria-prima” pode permitir diminuir o custo da dieta, pois é possível, segundo vários autores, reduzir a quantidade de proteína *bypass* sem afetar o desempenho produtivo. Contudo, em novembro de 2015, não se encontrou na base de dados Pubmed, estudos que comprovassem isso. Portanto, considera-se que seria interessante realizar estudos em que os produtos com lisina e metionina protegida fossem utilizados como “matérias-primas”; e que fossem conduzidos, preferencialmente, em explorações leiteiras e durante um longo período de tempo para ser possível avaliar a resposta produtiva em condições reais e ao longo de toda a lactação.

Smartamine<sup>®</sup> M, MetaSmart<sup>®</sup> e Mepron<sup>®</sup> são os produtos com metionina protegida mais estudados e, por isso, aqueles de que se dispõe mais informação sobre os seus efeitos na produção de vacas leiteiras. Segundo o estudo de Čermakova *et al* (2012), o produto MetaSmart<sup>®</sup> permite obter maior produção de leite do que o produto Smartamine<sup>®</sup> M. De acordo com a revisão feita por Patton (2010), a utilização do produto Mepron<sup>®</sup> leva a maior produção de leite, de proteína do leite e de gordura do leite comparativamente ao produto Smartamine<sup>®</sup> M. Segundo Schröder *et al.*, o produto MetaSmart<sup>®</sup> é o que apresenta melhor relação preço-benefício.

Relativamente aos produtos com lisina protegida, os estudos apresentados neste trabalho mostram que a adição destes produtos resulta, de uma forma geral, em maiores respostas produtivas. Porém, no estudo de Mullins *et al.* (2013) com o produto Megamine<sup>®</sup> L, não foram observadas alterações na produção de leite, tendo a produção de proteína diminuído ligeiramente. Em novembro de 2015, não se encontrou estudos com os produtos Bovi-lysine<sup>®</sup> e USA<sup>®</sup> Lysine.

Na formulação de dietas com menor concentração proteica, suplementadas com os AA lisina e metionina, considera-se importante, com base nos estudos analisados ao longo do trabalho, ter em consideração os seguintes aspetos:

- Calcular as necessidades dos AA lisina e metionina, em g/d, para a PM ou PDI considerada adequada para o nível produtivo dos animais;
- Calcular as necessidades dos outros AA essenciais, em g/d, para a PM ou PDI considerada adequada para o nível produtivo dos animais, utilizando as sugestões de, por exemplo, Rulquin (2001; modelo INRA) ou Doepel *et al.* (2004; modelo NRC);
- Adicionar a quantidade necessária dos produtos com lisina e metionina protegida para fornecer o fluxo destes aminoácidos (g/dia) previsto para uma dieta com PM ou PDI consideradas adequadas;
- Manter o fluxo intestinal dos outros AAE (em g/d) previsto pelo modelo utilizado quando a proteína da dieta é a considerada adequada;
- Fornecer valores de PDR entre 10 a 11% da MS da dieta;
- A ureia não exceder os 0.6% da MS total da dieta;
- Respeitar o limite máximo de CNF e os limites mínimos de FDNef, FDN e FDA;
- A gordura não exceder os 6 – 7% da MS da dieta;
- Considerar a sincronização das disponibilidades de N e de energia. Por exemplo, adicionar trigo ou cevada (fontes de energia mais rapidamente degradável que o milho) quando é adicionada ureia à dieta. O trigo e a cevada têm ainda a vantagem de terem maior percentagem de PB (%MS) que o milho, 14.2, 12.4 e 9.4% PB respetivamente;
- Assegurar fontes de energia fermentável e de N degradável com diferentes taxas de fermentação / degradação;
- Utilizar fontes proteicas com elevada digestibilidade intestinal;
- Considerar uma margem de segurança elevada para a concentração de lisina em alimentos processados pelo calor e em forragens mal conservadas.

Contudo, têm-se a noção que existem, pelo menos, 3 arraçoamentos: o que é feito no computador, o que é feito pelo produtor e o que é “feito” pelo animal. E, que muitas outras variáveis existem na desafiante área da nutrição dos ruminantes, onde é necessário alimentar dois sistemas ao mesmo tempo – um microbiano e um animal. Esta tarefa torna-se ainda mais complicada quando se pensa na nutrição com aminoácidos, pois, para além de se colocar a questão de qual a concentração ideal de cada AA na PM/PDI, existem outras dificuldades, como o facto do conhecimento da composição em AA da proteína do alimento original poder não fornecer informação sobre a quantidade de cada AA que alcança o intestino.

## BIBLIOGRAFIA

Anónimo (s/d) “Controlling Protein and Feed Costs for Dairy Cattle” **Penn State College of Agricultural Sciences**, disponível em <http://extension.psu.edu/prepare/emergencyready/drought/dairylivestock/controlling>, acessado em 2 de novembro de 2015

Anónimo (2008) “Balchem Introduces Rumen-Protected Lysine” **Farm Futures**, disponível em <http://farmfutures.com/story-balchem-introduces-rumenprotected-lysine-8-19673>, acessado em 10 de novembro de 2015

Anónimo (2012) “Balchem suspends sales of AminoShure-L, 52% Lysine” **All About Feed**, disponível em <http://www.allaboutfeed.net/Home/General/2012/5/Balchem-suspends-sales-of-AminoShure-L-52-Lysine-AAF013277W/>, acessado em 10 de novembro de 2015

Anónimo (2014) “What Do You Know About Your Lysine Source?” **AG WEB**, disponível em [http://www.agweb.com/article/what\\_do\\_you\\_know\\_about\\_your\\_lysine\\_source\\_naa\\_news\\_release/](http://www.agweb.com/article/what_do_you_know_about_your_lysine_source_naa_news_release/), acessado em 10 de novembro de 2015

Apelo SIA *et al.* (2014) “Effects of reduced dietary protein and supplemental rumen-protected essential amino acids on the nitrogen efficiency of dairy cows” **Journal of Dairy Science** **97**, 5688-5699

Barton B (2010) “Amino acid balancing lowers crude protein in dairy rations” **Feedstuffs**, disponível em <http://feedstuffs.com/story-amino-acid-balancing-lowers-crude-protein-in-dairy-rations-54-87706>, acessado em 2 de novembro 2015

Bennet R *et al.* (2011) “A feed industry view & the role of specific supplements” **REDNEX**, disponível em [http://www.rednex-fp7.eu/Docs/Nitra\\_2011/Theatre/Bennett.pdf](http://www.rednex-fp7.eu/Docs/Nitra_2011/Theatre/Bennett.pdf), acessado em 27 de novembro de 2014

Bernard JK *et al.* (2014) “Response of cows to rumen protected lysine after peak lactation” **The Professional Animal Scientist** **30**, 407–412

Boucher SE *et al.* (2007) “Effect of Incremental Urea Supplementation of a Conventional Corn Silage-Based Diet on Ruminal Ammonia Concentration and Synthesis of Microbial Protein” **Journal Dairy Science** **90**, 5619–5633



Boucher SE (2009) “Challenges of predicting metabolizable lysine content of ingredients” **Proceedings of the Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers**, 16-27

Boucher S (2012) “Feeding Lower Crude Protein Dairy Rations” **HUBBARD**, disponível em <http://www.hubbardfeeds.com/tipsandtools/dairy/dairy-tech-line-archive/feeding-lower-crude-protein-dairy-ra-ons>, acessado em 2 de novembro de 2015

Brito AF *et al.* (2007) “Effects of Different Protein Supplements on Omasal Nutrient Flow and Microbial Protein Synthesis in Lactating Dairy Cows” **Journal of Dairy Science** **90**, 1828-1841

Broderick GA & Reynal SM (2009) “Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows” **Journal of Dairy Science** **92**, 2822-2834

Broderick GA *et al.* (2015) “Replacing dietary soybean meal with canola meal improves production and efficiency of lactating dairy cows” **Journal of Dairy Science** **98**, 5672-5687

Cabrita ARJ *et al.* (2006) “Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows – a review” **Animal Research** **55**, 1-24

Cabrita ARJ *et al.* (2011) “Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets” **Journal of Dairy Science** **94**, 4647–4656

Casper DP *et al.* (1999) “Synchronization of Carbohydrate and Protein Sources on Fermentation and Passage Rates in Dairy Cows” **Journal of Dairy Science** **82**, 1779–1790

Čermáková J *et al.* (2012) “Effects of a rumen-protected form of methionine and a methionine analogue on the lactation performance of dairy” **Czech Journal Animal Science**, 410–419

Chalupa W & Sniffen C (2007) “Balancing rations on the basis of amino acids” **Progressive Dairyman**, disponível em <http://www.progressivedairy.com/topics/feed-nutrition/1207-pd-balancing-rations-on-the-basis-of-amino-acids>, acessado em 2 de novembro de 2015

Chen ZH *et al.* (2011) “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

Christofferson M & Herrick K (2014) “Where does your lysine end up and what does it cost?” **Dairy Global**, disponível em <http://www.allaboutfeed.net/Dairy-Global-XMS/General/2013/10/Where-does-your-lysine-end-up-and-what-does-it-cost-1361617W/>, acessado em 10 de novembro de 2015

FEDNA - Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal - <http://www.fundacionfedna.org/> acessado em 17 de novembro de 2015

Firkins JL (2011) “Liquid Feeds and Sugars in Diets for Dairy Cattle”, disponível em <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2011/7firkins.pdf>, acessado em 2 de dezembro de 2015

Herrick K (2014) “Consider alternative ingredients to balance amino acids” **Progressive Dairyman**, disponível em <http://www.progressivedairy.com/topics/feed-nutrition/consider-alternative-ingredients-to-balance-amino-acids>, acessado em 6 de novembro de 2015

Hristov AN (2015) “Low Protein Diets for Dairy Cows” **Extension.org**, disponível em <http://articles.extension.org/pages/71761/low-protein-diets-for-dairy-cows>, acessado em 6 de novembro de 2015

Huhtanen P *et al.* (2002) “Effects of Abomasal Infusions of Histidine, Glucose, and Leucine on Milk Production and Plasma Metabolites of Dairy Cows Fed Grass Silage Diets” **Journal of Dairy Science** 85, 204–216

Lee C *et al.* (2012) “Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows” **Journal of Dairy Science** 95, 5253-5268

Lee C *et al.* (2012a) “Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet” **Journal of Dairy Science** 95, 6042-6056

Lee C *et al.* (2015) “Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows” **Journal of Dairy Science** 98, 1885–1902

McDonald P *et al.* (2010) “Animal Nutrition” **Pearson**, 7<sup>a</sup> ed, 53 - 58

Melo D (2006) “Efeitos do teor em proteína da dieta e da composição em aminoácidos da proteína metabolizável na produtividade de vacas leiteiras alimentadas à base de silagem de milho” Dissertação de Mestrado em Produção Animal, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa

Mullins CR *et al.* (2013) “*Short communication*: Supplementing lysine and methionine in a lactation diet containing a high concentration of wet corn gluten feed did not alter milk protein yield” **Journal of Dairy Science** **96**, 5300-5305

National Research Council (2001) “Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition” **National Academy of Sciences**, 28-85, 283-310

Nelson E Lobos *et al.* (2013) “Effect of Rumen-Protected Lysine Supplementation of Corn-Protein Based Diets Fed to Lactating Dairy Cows” (Abstract), disponível em <https://asas.confex.com/asas/jam2014/webprogram/Paper4347.html>, acessado em 12 de novembro de 2015

Nocek JE *et al.* (2013) “Effects of a Rumen Protected Lysine (AjiPro-L) supplementation on peripartum disease, reproduction and lactational performance of dairy cows” (Abstract), disponível em [https://www.researchgate.net/publication/268087657\\_Effects\\_of\\_a\\_Rumen\\_Protected\\_Lysine\\_%28AjiProL%29\\_supplementation\\_on\\_peripartum\\_disease\\_reproduction\\_and\\_lactational\\_performance\\_of\\_dairy\\_cows](https://www.researchgate.net/publication/268087657_Effects_of_a_Rumen_Protected_Lysine_%28AjiProL%29_supplementation_on_peripartum_disease_reproduction_and_lactational_performance_of_dairy_cows), acessado em 12 de novembro de 2015

Noftsker S & St-Pierre NR (2003) “Supplementation of Methionine and Selection of Highly Digestible Rumen Undegradable Protein to Improve Nitrogen Efficiency for Milk Production” **Journal Dairy Science** **86**, 958–969

Ondarza MB (2004) “Amino acids” **De Laval**, disponível em <http://www.milkproduction.com/Library/Scientific-articles/Nutrition/Amino-acids/>, acessado em 16 de novembro de 2015

Ordway R (2010) “Feeding Lysine: A Nutritionist and Dairy Producer’s Perspective” **High Plains Dairy Conference**, 109-116

Ordway R (2012) “Rumen-protected amino acids: Additive or ingredient?” **Progressive Dairyman**, disponível em <http://www.progressivedairy.com/topics/feed-nutrition/rumen-protected-amino-acids-additive-or-ingredient>, acessado em 2 de novembro de 2015

Patton RA (2009) “The Strategic Use of Ruminally Protected Amino Acids in Dairy Nutrition”, disponível em <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2009/Patton.pdf> , acessado em 2 de novembro de 2015

Patton RA (2010) “Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis” **Journal of Dairy Science** 93, 2105–2118

Patton RA, Lapierre H, Parys C. (2013) “Relationships between circulating plasma amino acid concentrations and milk protein production in lactating dairy cows” (abstract) **Journal of Dairy Science** 96

Patton RA (2014) “Feeding Low Protein Diets to Dairy Cows” **Penn State College of Agricultural Sciences**, disponível em <http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/nutrition-and-feeding/diet-formulation-and-evaluation/feeding-low-protein-diets-to-dairy-cows>, acessado em 20 de novembro de 2015

Patton RA *et al.* (2014) “Protein Feeding and Balancing for Amino Acids in Lactating Dairy Cattle” **Elsevier Inc.**

Paz HA *et al.* (2013) “Evaluation of rumen-protected lysine supplementation to lactating dairy cows consuming increasing amounts of distillers dried grains with solubles” **Journal of Dairy Science** 96, 7210-7222

Rode LM & Kung L (1996) “Rumen-Protected Amino Acids Improve Milk Production and Milk Protein Yield”, disponível em <http://www.wcds.ca/proc/1996/wcd96289.htm>, acessado em 2 de novembro de 2015

Rulquin H (2014) “The concept of amino acids in dairy nutrition” **Kemin Industries Inc.** 2014, 13-26

Santos AP *et al.* (2011) “Aplicação do conceito de proteína ideal para bovinos leiteiros” **III Simpósio Nacional de Bovinocultura de Leite**

Schwab CG *et al.* (2004) “Amino acid balancing in the context of MP and RUP requirements” **Florida Ruminant Nutrition Symposium**

Schwab C (2012) “The principles of balancing diets for amino acids and their impact on N utilization efficiency”, disponível em <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2012/1SchwabRNS2012.pdf>, acessado em 9 de novembro

Schwab C (2014) “Getting Comfortable with Amino Acid Balancing”, disponível em <http://extension.psu.edu/animals/dairy/courses/dairy-cattle-nutrition-workshop/previous-workshops/2014/breakouts-and-special-sessions/getting-comfortable-with-amino-acid-balancing/view>, acessado em 2 de novembro de 2015

Schröder A *et al.* (2014) “Strategic amino acid formulation in today’s dairy cows” **Kemin Industries Inc. 2014**, 143-168

Sinclair KD *et al.* (2014) “Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility” **Animal 8:2**, 262–274

Sloan B (2006) “Concepts advance for amino acids balancing” **Feedstuffs** Vol. 78, No. 18,

Sniffen CH *et al.* (2009) “Interpreting and implementing starch digestibility information in the field” **Proceedings of the Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers**, 148-158

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

Vanhatalo A *et al.* (1999) “Response of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine” **Journal of Dairy Science 82**, 2674–2685

Varga GA (2010) “Why Use Metabolizable Protein for Ration Balancing?” **Extension.org**, disponível em <http://articles.extension.org/pages/26135/why-use-metabolizable-protein-for-ration-balancing>, acessado em 16 de novembro de 2015

Vargas-Rodriguez CF *et al.* (2014) “Effects of supplemental chromium propionate and rumen-protected amino acids on productivity, diet digestibility, and energy balance of peak-lactation dairy cattle” **Journal of Dairy Science 97**, 3815-3821