



LETÍCIA RODRIGUES FARIA

**DESEMPENHO LEITEIRO E QUALIDADE OOCITÁRIA DE
VACAS ALIMENTADAS COM FARELO DE CANOLA EM
SUBSTITUIÇÃO AO FARELO DE SOJA**

LAVRAS-MG

2025

LETÍCIA RODRIGUES FARIA

**DESEMPENHO LEITEIRO E QUALIDADE OOCITÁRIA DE VACAS
ALIMENTADAS COM FARELO DE CANOLA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO
DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves
Orientadora

LAVRAS-MG

2025

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Faria, Letícia Rodrigues.

Desempenho leiteiro e qualidade oocitária de vacas alimentadas
com farelo de canola em substituição ao farelo de soja / Letícia
Rodrigues Faria. - 2024.
122 p.

Orientador(a): Nadja Gomes Alves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.
Bibliografia.

1. coprodutos. 2. proteína dietética. 3. nitrogênio. I. Alves, Nadja
Gomes. II. Título.

LETÍCIA RODRIGUES FARIA

**DESEMPENHO LEITEIRO E QUALIDADE OOCITÁRIA DE VACAS
ALIMENTADAS COM FARELO DE CANOLA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO
DE SOJA**

**LACTATIONAL PERFORMANCE AND OOCYTE QUALITY OF COWS FED
CANOLA MEAL IN REPLACEMENT TO SOYBEAN MEAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 03 de Dezembro de 2024.

Dra. Nadja Gomes Alves, DZO UFLA.
Dr. Marcos Neves Pereira, DZO UFLA.
Dr. Erick Darlisson Batista, DZO UFLA.
Dr. Miller Pereira Palhão, DMV UFLA.
Dr. Bruno Campos de Carvalho, EMBRAPA Gado de Leite.

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves
Orientadora

LAVRAS-MG

2025

Aos meus avós (*in memoriam*) Maria Semeliana e José Antônio por serem meu
afago acolhedor, por todo amor e cuidado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por tudo que Ele me proporciona. À Nossa Senhora Aparecida por me amparar e aumentar a minha fé.

Aos meu pais Itamar e Gilcélia, pelo apoio, ensinamentos e ajuda em todos momentos sem cessar. A minha irmã Lavínia e meus sobrinhos Eduarda e Leonardo, por me tornarem uma pessoa melhor.

À minha querida avó Maria Semeliana (*in memoriam*), pelo amor, conversas e tempo que passamos juntas, sendo a pessoa a quem me recordo e me espelho todos os dias. Ao meu avô, José Antônio (*in memoriam*) pelo ombro acolhedor.

A toda a minha família por me propocionarem momentos únicos e por serem meu ponto de apoio. Aos meus amigos que ao longo da jornada da vida tornam tudo mais fácil e alegre.

Ao Wesley, por seu meu parceiro de vida. A sua presença, incentivo e ajuda foram essenciais na conclusão dessa etapa. O seu amor e companheirismo fazem meus dias mais felizes.

À minha orientadora Nadja Gomes Alves, pela confiança no meu trabalho. Obrigada pela orientação ao longo desses 10 anos, me acompanhando com dedicação e sabedoria e guiando-me em cada etapa deste percurso. Suas contribuições foram fundamentais para o meu crescimento profissional.

Aos professores Marcos Neves Pereira e Erick Darlisson Batista por todo suporte na realização do experimento. Sou imensamente grata pelo conhecimento compartilhado e apoio constante.

Ao professor Renato Ribeiro de Lima pela ajuda com a análise estatística. Ao professor Miller Pereira Palhão pela ajuda nas sessões de aspiração folicular.

Ao pesquisador Bruno Campos de Carvalho e ao professor Álan Maia Borges por terem aceito de bom grado a participação na banca de defesa.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pela disponibilidade da infraestrutura necessária para a condução da pesquisa. Aos colaboradores do Centro Experimental Risoleta Neves em São João Del-Rei, em especial à Débora Ribeiro Gomide e ao Antônio Fernando Bastos Nunes, por todo acolhimento, apoio e ajuda na realização da pesquisa.

Àqueles que, de forma altruísta, dedicaram seu tempo e esforço para que essa pesquisa pudesse acontecer: os funcionários Antônio (Tonho), Nem, Adelson, Gilson e Sr. Milton e os discentes de Zootecnia da Universidade Federal de São João Del-Rei: Vinícius, Bruna, Catharina, Danielly, Arthur, Vitória, Nicolas, Jonas, Bruno, Paulo, Rafaela, Alcina, Janaína, Dhominy, Hariany, Thalita, Evelyn, Ana Carla, Pedro, Júlio, Alice, Jéssica, Luana, Mirlane, Tatiana, Maria, Isabela e Hugo. Como foi bom conviver com vocês durante essa etapa.

A todos os ex e atuais integrantes do Núcleo de Estudos em Nutrição e Reprodução Animal por todos esses anos de convivência e aprendizado. As discentes de Iniciação Científica dos cursos de Zootecnia (Júlia, Ana Clara, Ingrid e Gabriela) e Medicina Veterinária (Valda) da Universidade Federal de Lavras, pela ajuda na condução das análises laboratoriais. À Clara, Abihail e Lorena pela ajuda com as análises dos oócitos e das enzimas. Aos técnicos Antônio e Stefânia do Laboratório de Pesquisa Animal do DZO, pela ajuda na condução das análises laboratoriais.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia por serem fundamentais em minha trajetória acadêmica, onde tive a honra de realizar minha graduação, mestrado e doutorado. Agradeço pelo suporte, pela qualidade de ensino, pela infraestrutura de excelência e pelo ambiente que proporcionaram, contribuindo de maneira decisiva para o meu crescimento pessoal e profissional.

À University of Guelph e ao Department of Animal Biosciences pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche em suas dependências e por me possibilitar conhecer um mundo novo na pesquisa. Ao professor Trevor James DeVries pelo acolhimento, orientação e oportunidades concedidas. Aos integrantes do CowCrew lab: Catalina, Anna, Jess, Kris, Lily, Sarah, Michele, Lydia e Gord pelo carinho e acolhimento no grupo. Ao Gleydson por fazer a estadia em Guelph ser a melhor possível.

Às empresas NUTRITEC, Clínica do Leite, Biocon, Bioclin e Ecoflex Ionas pela parceria e apoio material para a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ad Maiorem Dei Gloriam!

“Há para cada alma um ideal divino: é sua a história possível escrita pela bondade de Deus. Há para cada um de nós um programa de vida: elevar a cada instante a realidade da nossa existência às alturas sublimes deste grande ideal”.
(Pe. Leonel Franca)

RESUMO GERAL

A substituição de farelo de soja por farelo de canola na dieta pode gerar maior suprimento de proteína não degradada no rúmen e maior fluxo de aminoácidos metabolizáveis para vacas leiteiras, aumentando a produção de leite e seus componentes, e a eficiência do uso de nitrogênio. Ademais, pode melhorar a qualidade oocitária por reduzir os teores de nitrogênio no plasma (NUP) e fluido folicular, e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes no fluido folicular. O objetivo da tese foi avaliar o desempenho leiteiro e a qualidade oocitária de vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. Trinta vacas Holandês-Gir (168 ± 66 dias em lactação) foram bloqueadas pelo grau de sangue (3/4, 5/8 e 7/8), paridade (1 e ≥ 2 partos) e produção de leite em delineamento em blocos casualizados, e alocadas a um dos tratamentos: (1) dieta com farelo de soja (FS; $n = 15$) e (2) dieta com farelo de canola (FC; $n = 15$) por oito semanas. A aspiração folicular foi realizada em 19 vacas (FS: $n = 8$ e FC: $n = 11$) com intervalo de 15 dias. A produção de leite (13,1 kg/d) e o consumo de matéria seca (16,2 kg/d) não diferiram ($P \geq 0,21$) entre os tratamentos. A digestibilidade da matéria orgânica e da fibra em detergente neutro, e o teor de gordura no leite foram menores ($P \leq 0,03$) e de sólidos totais tendeu ($P = 0,06$) a ser menor no grupo FC do que no FS. O teor de nitrogênio ureico no leite (NUL) foi menor no grupo FC do que no FS (13,1 vs. 16,3; $P < 0,01$). O peso corporal foi maior (561 vs. 544 kg; $P = 0,01$) e o escore de condição corporal tendeu a ser maior (3,1 vs. 3,0; $P = 0,10$) no grupo FC do que no FS. A frequência de refeições, o tempo de ruminação na posição deitada e a proporção de consumo pela manhã foram maiores no grupo FC do que no FS ($P = 0,01$). Os teores de glicose, NUP e de nitrogênio no fluido folicular, a partição do nitrogênio ingerido entre leite, urina e fezes, a produção de proteína microbiana, a qualidade oocitária e a atividade de enzimas antioxidantes no fluido folicular não diferiram ($P \geq 0,12$) entre os tratamentos. A utilização de farelo de canola não afetou o desempenho leiteiro, o metabolismo de nitrogênio e a qualidade oocitária, mas reduziu o teor de gordura e de NUL, e aumentou o peso corporal das vacas.

Palavras-chave: coprodutos; proteína dietética; nitrogênio; gordura do leite; enzimas antioxidantes.

GENERAL ABSTRACT

Replacing soybean meal with canola meal in dairy cow diets may enhance the supply of rumen undegradable protein and increase the flow of metabolizable amino acids, potentially improving milk production and its components while increasing nitrogen utilization efficiency. Additionally, the use of canola meal in diets may improve oocyte quality by reducing blood and follicular fluid nitrogen concentrations and increasing the activity of antioxidant enzymes in the follicular fluid. The main objective of the thesis was to evaluate the lactational performance and oocyte quality of dairy cows fed canola meal as a replacement for soybean meal. Thirty Holstein-Gir crossbred dairy cows (168 ± 66 days in lactation) were blocked by genetic composition (3/4, 5/8, and 7/8), parity (1 and ≥ 2 calvings), and milk yield in a randomized block design. Cows were assigned to treatments: (1) soybean meal diet (SBM; $n = 15$) and (2) canola meal diet (CM; $n = 15$) for eight weeks. Follicular aspiration was performed biweekly on 19 cows (SBM: $n = 8$; CM: $n = 11$). Milk yield (13.1 kg/d) and dry matter intake (16.2 kg/d) did not differ between treatments ($P \geq 0.21$). The digestibility of organic matter and neutral detergent fiber, and the milk fat content were lower ($P \leq 0.03$), and total solids content tended ($P = 0.06$) to be lower in cows fed CM compared to SBM. Milk urea nitrogen was lower ($P < 0.01$) in cows fed CM compared to SBM (13.1 vs. 16.3 mg/dL). Body weight was greater (561 vs. 544 kg; $P = 0.01$) and BCS tended to be greater (3.1 vs. 3.0; $P = 0.10$) in cows fed CM compared to SBM. Meal frequency, rumination time while lying down and the proportion of daily intake in the morning were greater ($P = 0.01$) for cows fed CM than SBM. Plasma and follicular fluid metabolites, nitrogen partition, microbial protein yield, oocyte quality, and follicular fluid activity of antioxidant enzymes did not differ between treatments ($P \geq 0.12$). Canola meal did not affect lactational performance, nitrogen metabolism, and oocyte quality but decreased milk fat content and milk urea nitrogen and increased the body weight of the cows.

Keywords: coproducts; dietary protein; nitrogen; milk fat; antioxidant enzymes.

INDICADORES DE IMPACTO

Nos sistemas de produção de leite, busca-se cada vez mais a utilização de dietas que melhorem a produção, reprodução e saúde dos animais, com o mínimo impacto ambiental possível. Nesse contexto, os estudos acerca da utilização de fontes proteicas que possam otimizar o uso do nitrogênio sem comprometer o desempenho produtivo e a reprodução geram impactos consideráveis nas áreas econômica, social, tecnológica e cultural. No âmbito econômico, pode contribuir para a utilização de uma fonte proteica menos onerosa na dieta, que oferece resultados semelhantes ou até superiores aos da fonte proteica convencional. Dessa forma, pode impactar socialmente por propiciar melhoria da produção de leite, especialmente por pequenos produtores, contribuindo para o crescimento deste setor, que é representativo na geração de empregos e de renda no país. No âmbito de conhecimento científico e tecnológico os resultados deste estudo contribuem para a melhor compreensão acerca dos mecanismos relacionados à otimização do uso de nitrogênio por vacas leiteiras e seu impacto na produção e na reprodução destes animais. Além disso, a menor excreção de nitrogênio no leite implica na possibilidade de produção de leite com menor excreção de nitrogênio para o meio ambiente. Diante da necessidade de atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente em termos de impacto ambiental, este é outro impacto positivo da pesquisa. Sob o aspecto cultural, a pesquisa pode contribuir para um conceito mais sustentável de pecuária leiteira, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental, o que ajuda a melhorar a percepção da produção leiteira pela sociedade.

IMPACT INDICATORS

In dairy production systems, there is an increasing focus on the use of diets that improve production, reproduction, and health, with minimal environmental impact. In this context, studies on the use of protein sources that can optimize nitrogen utilization without compromising productive performance and reproduction have significant impacts on the economic, social, technological, and cultural areas. From an economic standpoint, it may contribute to the use of a more affordable protein source in the diet, which offers results like or even better than those of conventional protein source. Socially, it can impact the improvement of milk production, especially by small-scale farmers, contributing to the growth of this sector, which plays a significant role in employment and income generation in the country. In terms of scientific and technological knowledge, the results of this study contribute to a better understanding of the mechanisms related to optimizing nitrogen use by dairy cows and its impact on their production and reproduction. Furthermore, the lower nitrogen excretion in milk suggests the potential for producing milk with less nitrogen waste for the environment. Given the increasing demand for environmentally conscious products, this is another positive outcome of the research. From a cultural perspective, the research can contribute to a more sustainable concept of dairy farming, both economically and environmentally, which enhances society's perception of dairy production.

Lactational performance and oocyte quality of dairy cows fed canola meal in replacement of soybean meal

Elaborated by **Letícia R. Faria** and advised by **Dra. Nadja G. Alves**

In dairy production systems, there is an increasing emphasis on diets that improve production, reproduction, and animal health, while minimizing environmental impact. Soybean meal is the most used protein source in the diets of dairy cows. This protein source has high ruminal degradability and does not provide an ideal supply of amino acids for dairy cows due to its low methionine content. Excess nitrogen can be detrimental to animal reproductive performance and the environment. Replacing soybean meal with canola meal, which has lower ruminal degradability and higher methionine content, may improve dairy cow nutrition and oocyte quality. The objectives of this study were to evaluate lactational performance, feeding behavior and rumination, utilization and partition of dietary nitrogen, and oocyte quality in crossbred dairy cows (Holstein-Gir) fed canola meal as a replacement to soybean meal. In general, the results of this study indicated that canola meal supports similar dry matter and nutrient intake, as well as milk yield, compared to soybean meal. Canola meal in the diets reduced nitrogen excretion in milk and had no effect on blood or follicular fluid metabolites. Oocyte quality was not affected by replacing soybean meal with canola meal. Cows fed canola meal had lower milk fat content and higher body weight, which associated with decreased nitrogen excretion, suggests that nitrogen utilization was optimized in low-yielding crossbred dairy cows.

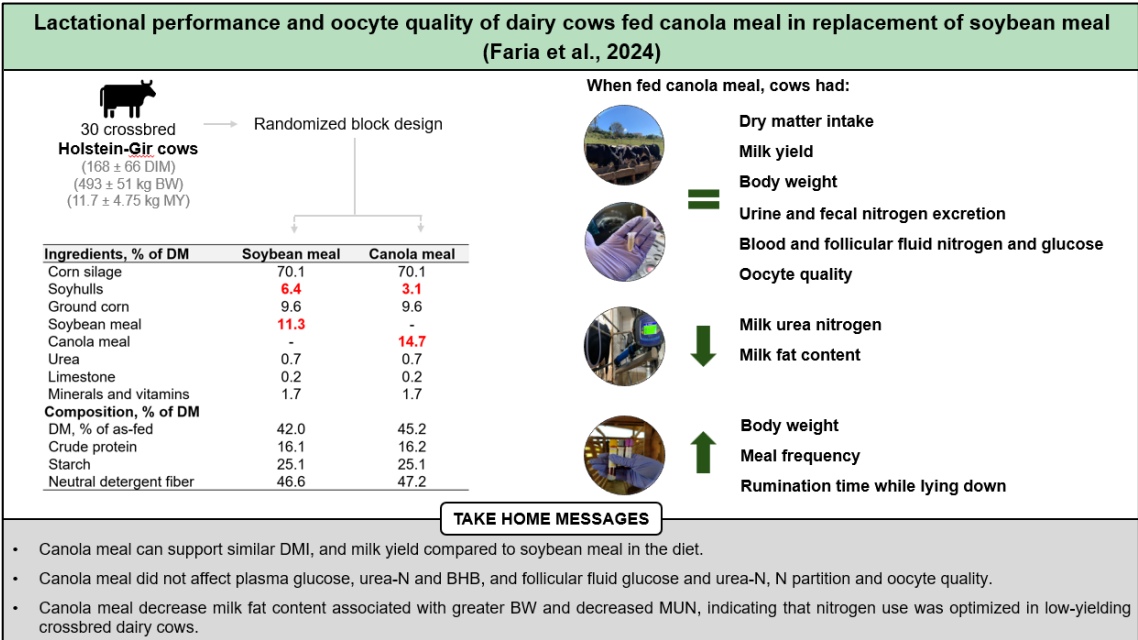


Figure 1. Effects of feeding canola meal as a replacement of soybean meal on lactational performance and oocyte quality of dairy cows.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Effects of feeding canola meal as a replacement of soybean meal on lactational performance and oocyte quality of dairy cows.	11
Figure 2. NDF digestibility on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black). ^{a,b} Means followed by different lowercase letters differ within week. ^{A,B} Means followed by different uppercase letters differ between weeks (treatment × week, $P < 0.01$). Error bars: standard error of the mean (SEM).	117
Figure 3. A) Milk lactose content (%), B) milk urea nitrogen (mg/dL), and C) linear SCC (1 to 9) on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black). ^{a,b} Means followed by different lowercase letters differ within week. ^{A,B} Means followed by different uppercase letters differ between weeks (treatment × week, $P \leq 0.10$). COV: covariate. Error bars: standard error of the mean (SEM).	119
Figure 4. A) Rumination time (min/d) and B) proportion of daily intake at night (%) on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black). ^{a,b} Means followed by different lowercase letters differ within week. ^{A,B} Means followed by different uppercase letters differ between weeks (treatment × week, $P \leq 0.02$). Error bars: standard error of the mean (SEM).	120
Figure 5. Correlation of milk urea-N (MUN) and follicular fluid urea-N (follicular fluid UN) (mg/dL) on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black) at the day of OPU sessions.	121
Figure 6. Urinary pH on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black). ^{a,b} Means followed by different lowercase letters differ within week. ^{A,B} Means followed by different uppercase letters differ between weeks (treatment × week, $P < 0.01$). Error bars: standard error of the mean (SEM).	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compilação dos resultados de desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja.....	36
Table 2. Composition of dietary ingredients	105
Table 3. Composition of diets containing soybean meal (SBM) or canola meal (CM) as the main protein source	106
Table 4. Predicted MP and NEL requirement and balance, and production variables by NASEM (2021) for treatments ¹	107
Table 5. Duodenal AA flows, net AA utilization and predicted metabolizable AA efficiencies by NASEM (2021) for treatments ¹	108
Table 6. Intake and total-tract apparent digestibility of nutrients on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM) ¹	109
Table 7. Lactation performance of dairy cows on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM) ¹	110
Table 8. Meal, chewing and rumination behavior and proportion of intake during the day of dairy cows on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM)	112
Table 9. Concentration of metabolites in plasma on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM) in wk 3, 5, and 7 of the experiment	113
Table 10. Concentration of metabolites in plasma and follicular fluid on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM) at the day of OPU sessions	114
Table 11. Nitrogen partition and ruminal microbial yield on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM) ¹	115
Table 12. Oocyte quality and activity of antioxidant enzymes on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM)	116

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. NUTRIÇÃO PROTEICA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS.....	17
2.2. FARELO DE CANOLA	21
2.2.1. PANORAMA HISTÓRICO	21
2.3. A UTILIZAÇÃO DO FARELO DE CANOLA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO DE SOJA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS.....	26
2.3.1. CONSUMO DE MATÉRIA SECA E PRODUÇÃO DE LEITE.....	29
2.3.2. MECANISMOS ASSOCIADOS ÀS RESPOSTAS PRODUTIVAS	37
2.3.3. EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DO NITROGÊNIO	39
2.4. NUTRIÇÃO PROTEICA NA REPRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS.....	42
2.5. A UTILIZAÇÃO DO FARELO DE CANOLA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO DE SOJA NA REPRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS.....	47
2.5.1. QUALIDADE OOCITÁRIA	48
2.5.2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	52
2.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	54
REFERÊNCIAS.....	56
SECOND PART - MANUSCRIPT	66
ABSTRACT	68
INTRODUCTION.....	69
MATERIALS AND METHODS	71
RESULTS	82
DISCUSSION.....	87
CONCLUSIONS.....	95
REFERENCES	96

1. INTRODUÇÃO GERAL

A nutrição proteica de vacas leiteiras tem focado no balanceamento de dietas com perfil adequado de aminoácidos com o objetivo de reduzir o teor de proteína bruta na dieta, maximizar a produção de leite e de proteína do leite, melhorar a eficiência de uso do nitrogênio, reduzir os custos alimentares e minimizar o impacto ambiental (Schwab; Broderick, 2017). Ademais, esse conceito se alinha a abordagem de favorecer a reprodução de vacas leiteiras por limitar problemas causados pelo alto teor de nitrogênio ureico no plasma (NASEM, 2021) e pela ação dos aminoácidos no sistema reprodutivo (Grobner, 2011; Read *et al.*, 2021).

A principal fonte proteica utilizada na dieta de vacas leiteiras é o farelo de soja (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011; Canola Council of Canada, 2019). Essa fonte proteica é considerada de alta degradabilidade ruminal (NASEM, 2021) e não atende o ideal suprimento de aminoácidos para vacas leiteiras, visto que contém baixo teor de metionina (Schwab, 2010). Nesse sentido, a utilização de fontes proteicas com maior teor de proteína não degradada no rúmen (PNDR) e perfil de aminoácidos que atenda às exigências nutricionais pode ser uma estratégia para suprir os aminoácidos metabolizáveis para o animal.

Dentre as fontes proteicas vegetais utilizadas na alimentação de vacas leiteiras, o farelo de canola tem se destacado como fonte promissora. Isso se deve ao aumento na disponibilidade desse alimento, aos relatos de melhor desempenho produtivo e à melhor eficiência de utilização do nitrogênio quando utilizado em substituição a outras fontes proteicas vegetais (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013). Esses resultados são atribuídos ao perfil de aminoácidos do farelo de canola, que é a fonte proteica vegetal com perfil de aminoácidos mais semelhante ao perfil de aminoácidos do leite (Evans; Wood, 2023).

A utilização do farelo de canola como fonte proteica na dieta pode aumentar o teor de aminoácidos essenciais e reduzir o nitrogênio ureico no plasma de vacas leiteiras, em comparação ao uso do farelo de soja (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013). Os aminoácidos são componentes do fluido encontrado no trato reprodutivo da fêmea e podem beneficiar o desenvolvimento oocitário (Sinclair *et al.*, 2008; Read *et al.*, 2021), embrionário (Grobner, 2011; Leese, McKeegan e Sturme, 2021) e estabelecimento da prenhez (Grobner, 2011). Por outro lado, o desenvolvimento folicular e oocitário podem ser prejudicados por altas concentrações de ureia e amônia

na circulação sanguínea, já que estes compostos são considerados tóxicos para ambas as estruturas (Butler, 1998; Sinclair *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2009; Raboisson *et al.*, 2017) e, pelo gasto energético para detoxificação da amônia à ureia no fígado (Butler, 1998; Leroy *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2021). Portanto, ao promover aumento dos teores de aminoácidos e redução do nitrogênio ureico no plasma, a utilização do farelo de canola em substituição ao farelo de soja pode contribuir para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras.

O objetivo desse trabalho é avaliar o desempenho produtivo, comportamento alimentar, utilização e partição do nitrogênio, e a qualidade oocitária de vacas leiteiras mestiças (Holandês-Gir) alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. A nossa hipótese geral é que a utilização do farelo de canola na dieta melhore o desempenho produtivo, a eficiência de utilização do nitrogênio, e a qualidade oocitária em vacas leiteiras mestiças (Holandês-Gir).

O primeiro capítulo da tese aborda a revisão da literatura sobre o tema em estudo. Este tópico se inicia com uma abordagem introdutória à nutrição proteica de vacas leiteiras, destacando a importância do balanceamento de dietas com um perfil adequado de aminoácidos, com ênfase na utilização do farelo de canola, seguida por um panorama histórico da cultura. Em seguida, os principais trabalhos sobre a utilização do farelo de canola em substituição ao farelo de soja na dieta de vacas leiteiras são descritos, abordando aspectos como o consumo de matéria seca, a produção de leite e de sólidos do leite, e a eficiência na utilização do nitrogênio. Por fim, o capítulo aborda a relação entre nutrição proteica e reprodução em vacas leiteiras, com ênfase na qualidade oocitária e nas enzimas antioxidantes. No segundo capítulo, os resultados e discussões oriundos da pesquisa são abordados no formato de artigo científico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NUTRIÇÃO PROTEICA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS

A proteína é um dos principais componentes da dieta que influenciam a produção de leite de vacas leiteiras. A proteína dietética se refere a proteína bruta, medida pelo teor de nitrogênio dos alimentos multiplicado pelo fator de 6,25, visto que a maioria das proteínas contém 16% de nitrogênio (Schwab; Broderick, 2017). A proteína dietética fornece proteína na forma degradada no rúmen (PDR) para a síntese de proteína microbiana, e proteína na forma não degradada no rúmen (PNDR) para o suprimento de aminoácidos no intestino delgado (NASEM, 2021). A proteína microbiana e a PNDR após a digestão intestinal fornecem o *pool* de aminoácidos disponíveis para serem utilizados pelos tecidos para as funções fisiológicas, denominada proteína metabolizável. Os aminoácidos são os nutrientes que serão absorvidos e utilizados para a manutenção, crescimento, reprodução e lactação de vacas leiteiras (NASEM, 2021). Os aminoácidos são utilizados para a síntese proteica e também para outras funções, atuando como substrato energético, na síntese de moléculas antioxidantes (Leese; McKeegan; Sturmey, 2021) e de enzimas, citocinas e hormônios, além de contribuir para a multiplicação celular e as funções metabólicas (Grobner, 2011; Coleman *et al.*, 2020).

Até meados do século XX, acreditava-se que a qualidade da proteína dietética não tinha importância na dieta, pois o suprimento de proteína de origem microbiana era suficiente para atender às exigências de aminoácidos essenciais de vacas leiteiras (Broderick, 2018). No final da década de 60 e início da década de 70, começaram a ocorrer evidências que vacas leiteiras poderiam ter deficiência de aminoácidos específicos em dietas que antes eram consideradas com teor adequado de proteína bruta (Broderick; Kowalczyk; Satter, 1970). Essa constatação foi feita devido ao aumento da produção de leite dos animais e vários estudos foram conduzidos nessa época com vacas de produção média diária de 25 a 35 kg de leite, com o objetivo de avaliar os efeitos da infusão abomasal de aminoácidos na produção de proteína do leite (Schwab; Broderick, 2017). Broderick, Kowalczyk e Satter (1970) infundiram caseína via fístula abomasal em três vacas leiteiras com média de 31 kg de leite por dia e observaram que mesmo com teor adequado de proteína bruta na dieta, as vacas responderam positivamente à infusão de caseína, com aumento de 0,11 kg por dia na

produção de proteína do leite e, embora sem efeito significativo; 1,6 kg por dia na produção de leite. Com base nessa resposta observada também em estudos posteriores (Cohick *et al.*, 1986; Guinard, Rulquin e Vérité, 1994), nutricionistas reconheceram que, principalmente em animais mais produtivos, a síntese de proteína microbiana não é suficiente para atender aos requerimentos de aminoácidos do animal e que esses animais necessitam de aminoácidos essenciais fornecidos pela fração PNDR da proteína dietética para a produção de leite (Broderick, 2018).

Na busca pela identificação de quais eram os aminoácidos essenciais requeridos para a produção de leite, Schwab, Satter e Clay (1976) determinaram que os aminoácidos lisina e metionina são os aminoácidos mais limitantes para vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho. Os aminoácidos limitantes são aqueles que são ofertados em menor quantidade do que o requerimento para determinada função (Schwab; Ordway; Whitehouse, 2003). De acordo com os autores, a lisina e a metionina foram definidos como os principais aminoácidos limitantes para a produção de leite, devido à baixa concentração desses aminoácidos nos alimentos comumente utilizados nas dietas de vacas leiteiras em comparação a concentração na proteína microbiana e no leite. Esse conceito foi incorporado na atualização do *National Research Council* (NRC) para gado de leite em 2001, no qual foram identificadas as concentrações ideais de lisina e metionina na proteína metabolizável a partir de curvas de dose-resposta, em que a concentração desses aminoácidos na proteína metabolizável foi relacionada à resposta em proteína do leite (NRC, 2001). Nessa plotagem foram identificadas as concentrações ótimas de 7,2% de lisina e 2,4% de metionina na proteína metabolizável para maximizar o teor de proteína no leite. Essas concentrações ótimas geraram a recomendação da relação 3:1 de lisina e metionina na proteína metabolizável. Na versão do NRC de 2001, os requerimentos dietéticos foram expressos como PDR e PNDR, e os requerimentos metabólicos como proteína metabolizável.

Apesar de utilizar a proteína metabolizável para os requerimentos metabólicos, o próprio comitê destacou que a utilização dessa entidade nutricional é questionável, pois as dietas que forneciam quantidades suficientes de proteína metabolizável eram deficientes em um ou mais aminoácidos essenciais (NRC, 2001). Além disso, a glândula mamária responde às adições de aminoácidos individuais de forma independente e aditiva para a síntese de caseína (Arriola Apelo; Knapp; Hanigan, 2014), demonstrando a importância do perfil de aminoácidos da proteína

metabolizável. De acordo com a última versão do NRC, agora *National Academies of Sciences, Engineering and Medicine* (NASEM), publicada em 2021, o balanceamento de dietas com base na proteína metabolizável é útil, mas o ideal é ajustar individualmente os aminoácidos essenciais oriundos da proteína metabolizável, assumindo adequado suprimento de PDR para fermentação e síntese microbiana, para melhorar o desempenho e reduzir o teor de proteína bruta na dieta (NASEM, 2021).

Ou seja, além das constatações feitas na década de 60 e 70 da necessidade de suprimento de aminoácidos essenciais fornecidos pela fração PNDR da proteína dietética, os estudos posteriores evidenciaram a importância do perfil desses aminoácidos na fonte proteica para atingir adequado suprimento de forma individual na proteína metabolizável. No NASEM (2021), o comitê adotou a fórmula para cálculo da produção de proteína do leite que considera cada aminoácido de forma separada, e propõe uma eficiência alvo para cada aminoácido na proteína metabolizável.

Nos últimos anos, o conceito de otimizar o suprimento e o perfil de aminoácidos das dietas para atender a produção de leite é considerado um “*hot topic*” na nutrição proteica de vacas leiteiras (Broderick, 2018). O balanceamento de dietas com perfil adequado de aminoácidos pode reduzir o teor de proteína bruta na dieta (Schwab; Broderick, 2017), maximizar a produção de leite e de proteína do leite, melhorar a eficiência de uso do nitrogênio, reduzir os custos alimentares e causar menor impacto ambiental (Schwab, 2010). Quando os aminoácidos essenciais são absorvidos no perfil adequado para o animal, a eficiência de utilização para a síntese proteica é maximizada. Como resultado, o catabolismo de aminoácidos e a excreção urinária é reduzida. Ao contrário, quando o perfil de aminoácidos absorvidos não é adequado para o animal, o fornecimento da proteína metabolizável em si não é suficiente para atender a síntese proteica (Schwab; Ordway; Whitehouse, 2003).

Nesse sentido, a fonte proteica utilizada na dieta pode impactar no suprimento de aminoácidos essenciais fornecidos pela fração PNDR. A principal fonte proteica utilizada na dieta de vacas leiteiras é o farelo de soja (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011; Canola Council of Canada, 2019), sendo considerada uma fonte proteica de alta degradação ruminal. O farelo de soja possui um bom perfil de aminoácidos, porém a concentração do aminoácido metionina é baixa na sua composição. Nas dietas nas quais o farelo de soja é utilizado como principal fonte de PNDR, o principal aminoácido limitante é a metionina, pois a concentração desse aminoácido nessas dietas é menor

do que as concentrações na proteína microbiana e na proteína do leite (Schwab, 2010).

Diante disso, o fornecimento de fontes proteicas com maior teor de PNDR e que atendam o suprimento de aminoácidos essenciais fornecidos por essa fração, pode reduzir a produção de nitrogênio amoniacal no rúmen, sem limitar a disponibilidade de nitrogênio para o crescimento microbiano, e aumentar a eficiência de utilização de nitrogênio em ruminantes (Calsamiglia *et al.*, 2010). Essas fontes proteicas também podem propiciar aumento do suprimento de aminoácidos essenciais para o intestino (Schwab; Ordway; Whitehouse, 2003; Maxin; Ouellet; Lapierre, 2013; Paula; Broderick; Faciola, 2020; Souza *et al.*, 2020). Dentre as fontes proteicas mais utilizadas na dieta de vacas leiteiras, o farelo de canola tem se mostrado promissor, visto que resulta em aumento no consumo de matéria seca, na produção de leite e de componentes do leite, e na eficiência de utilização do nitrogênio quando utilizado em substituição a outras fontes proteicas (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013). Esse resultado é explicado pelo perfil de aminoácidos do farelo de canola, que é a fonte proteica vegetal com perfil de aminoácidos mais semelhante ao perfil de aminoácidos do leite (Evans; Wood, 2023). Portanto, visando atender de forma adequada o suprimento e o perfil de aminoácidos essenciais fornecidos pela fração PNDR da proteína dietética, o farelo de canola pode ser uma fonte proteica efetiva para melhorar a produção de leite, de componentes do leite e a eficiência de uso do nitrogênio, com menor impacto ambiental.

2.2. FARELO DE CANOLA

2.2.1. PANORAMA HISTÓRICO

As plantas da ordem *Capparales* da família *Brassicaceae* incluem espécies vegetais importantes que são utilizadas na nutrição humana e animal. Dentre essas espécies, a colza é a principal cultura oleaginosa produzida no mundo (USDA, 2024). O cultivo da colza se iniciou em 2000 a.C na Índia e em 35 a.C essa cultura foi introduzida na China e no Japão (Canola Council of Canada, 2016). No século 13, o cultivo de colza foi intensificado na Europa para a produção de óleo para a iluminação, e no final do século 17 o óleo começou a ser utilizado para outros propósitos como a fabricação de sabão e a lubrificação, e o resíduo resultante da extração do óleo utilizado na alimentação de bovinos (Mawson *et al.*, 1993). No século 19, o cultivo da colza reduziu na Europa devido ao surgimento do óleo mineral (Khachatourians; Sumner; Phillips, 2001). No século 20, a produção de colza foi impulsionada devido à expansão econômica que gerou maior necessidade de utilização de óleo, principalmente entre os anos de 1950 a 1970 na Europa (Mawson *et al.*, 1993). Além disso, a demanda por óleo nesse século aumentou devido a Segunda Guerra Mundial, o que estimulou a produção em muitos países, a qual se manteve estável mesmo após o final da guerra (Khachatourians; Sumner; Phillips, 2001). Nessa mesma época, a produção dessa cultura foi iniciada no Canadá, devido ao bloqueio de fontes europeias e asiáticas de abastecimento de colza para os países aliados (Khachatourians; Sumner; Phillips, 2001; Przybylski; Mag, 2002). A produção de colza no Canadá foi de extrema importância para o fornecimento de óleo aos países aliados durante a Segunda Guerra Mundial (Przybylski; Mag, 2002). No final do século 20 e início do século 21, o desenvolvimento de pesquisas nas áreas de genética, cultivo e processamento da colza foi impulsionado pela busca de produtos saudáveis para a alimentação humana.

O principal propósito da produção de colza é a extração do óleo, já que essa cultura tem cerca de 40 a 45% de óleo na sua composição nutricional, sendo duas vezes maior que o teor de óleo na soja (Mawson *et al.*, 1993). A utilização do óleo de colza na alimentação humana é limitada devido à presença de ácido erúico na sua composição, que em alta concentração é prejudicial à saúde (Przybylski; Mag, 2002). Em 1960, a Comunidade Econômica Europeia enfatizou que apenas variedades de colza com teor abaixo de 5% de ácido erúico poderiam ser cultivadas, determinando

que a utilização do óleo de colza tradicional fosse considerada prejudicial para a saúde humana (Gupta; Pratap, 2007). Desde então, foram realizadas pesquisas para identificar variedades de colza com baixo teor de ácido erúico, e o cultivo apenas dessas variedades se tornou obrigatório para o consumo humano (Gupta; Pratap, 2007).

O coproduto gerado após a extração do óleo é o farelo de colza. O farelo de colza tem cerca de 35 a 40% de PB (Mawson *et al.*, 1993) com bom perfil de aminoácidos, porém, a presença de glicosinolatos na sua composição pode limitar a utilização dessa fonte proteica na alimentação animal (Canola Council of Canada, 2019). Os glicosinolatos são compostos glicosídicos que têm enxofre na composição e estão presentes em vegetais da ordem *Capparales*, incluindo os da família *Brassicaceae*, tais como o repolho, a couve de bruxelas, a mostarda e a colza (Mawson *et al.*, 1993). As plantas que contêm os glicosinolatos também contêm a enzima mirosinase, que realiza a hidrólise dos glicosinolatos em compostos secundários contendo enxofre e isotiocianatos (Przybylski; Mag, 2002). A presença do enxofre na composição dos glicosinolatos e dos compostos gerados após a hidrólise, contribuem para a baixa palatabilidade do farelo de colza (Tripathi; Mishra, 2007). Além disso, os compostos secundários podem gerar efeitos adversos nos animais como a redução na produção de hormônios da tireoide, o aumento da glândula tireoide, a redução do consumo de alimentos, do crescimento e do desempenho reprodutivo (Tripathi; Mishra, 2007).

Portanto, com o objetivo de obter um alimento que além do baixo teor de ácido erúico na porção do óleo, também possua baixo teor de glicosinolatos na porção do farelo, foi desenvolvida uma cultivar oriunda da colza, denominada canola. A cultivar foi desenvolvida no Canadá por meio de técnicas de melhoramento genético por pesquisadores da University of Manitoba e do National Research Council of Canada (Przybylski; Mag, 2002). A produção da cultivar se iniciou com a identificação de uma linhagem de colza polonesa (*Bronowski*) com baixo teor de glicosinolato pelo professor Jan Krzymanski no Canadá (Przybylski; Mag, 2002). Após essa descoberta, os genes ligados a característica de baixo teor de glicosinolato foram incorporados em cultivares do tipo *Brassica napus L.* e *Brassica rapa L.* com baixo teor de ácido erúico (Gupta; Pratap, 2007). Em 1974, o professor Dr. Baldur Stefansson da University of Manitoba desenvolveu a primeira variedade “*double-low*” com baixos teores de ácido erúico no óleo e de glicosinolatos no farelo (Canola Council of Canada, 2016). O

desenvolvimento dessa variedade proporcionou pesquisas posteriores na área de melhoramento genético, conduzindo à evolução de uma cultura oleaginosa que atendeu aos requisitos de qualidade para o consumo humano e animal.

O registro do nome canola ocorreu em 1978 pelo Western Canadian Oilseed Crushers, e em 1980 foi transferida para o Canola Council of Canada (Przybylski; Mag, 2002). No ano de 1986 o óleo e o farelo de canola foram adicionados à lista dos alimentos que são geralmente reconhecidos como seguros (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) nos Estados Unidos (Przybylski; Mag, 2002). O nome canola foi utilizado para diferenciar essa nova cultivar da colza tradicional que é rica ácido erúico na porção do óleo e glicosinolatos na porção do farelo (Sanchez; Claypool, 1983; Canola Council of Canada, 2019). O farelo de colza tradicional pode ter valores acima de 120 $\mu\text{mol/g}$ de glicosinolatos (Canola Council of Canada, 2019). Já o farelo obtido das cultivares de canola que são utilizadas para a alimentação animal tem teores abaixo de 30 $\mu\text{mol/g}$ de glicosinolatos (Canola Council of Canada, 2019). O teor de glicosinolatos no farelo de canola tem reduzido com o passar dos anos devido a continuidade nos processos de melhoramento genético da canola. Para fins de comparação, amostras obtidas em sete plantas de processamento no Canadá no ano de 1985 tinham na média 21,06 $\mu\text{mol/g}$ de glicosinolatos (Bell; Keith, 1991). Nos anos de 2011 a 2014, a média do teor de glicosinolatos era de 4,60 $\mu\text{mol/g}$ em amostras obtidas em 11 plantas de processamento, também no Canadá (Adewole *et al.*, 2016).

A canola oriunda da espécie *Brassica napus* L. é comumente conhecida como canola argentina, e a canola oriunda da espécie *Brassica rapa* L. como canola polonesa (Khachatourians; Sumner; Phillips, 2001). A denominação argentina se originou devido a compra, feita por produtores do Canadá em 1943, de sementes de empresas dos Estados Unidos, as quais foram originalmente adquiridas da Argentina (Canola Council of Canada, 2016). A denominação polonesa surgiu devido a origem das sementes plantadas por um produtor do Canadá, que obteve essas sementes originárias da Polônia (Canola Council of Canada, 2016). Ambas as espécies possuem variedades com adaptação para cultivo no inverno e na primavera (Angelotti-Mendonça *et al.*, 2016). A forma que é plantada no inverno é denominada canola de inverno (*winter canola*) e a que é plantada na primavera, canola de primavera (*spring canola*). Além da época de plantio, essas duas variedades se distinguem pela exigência de exposição a baixas temperaturas (exigência de vernalização) para completar seu ciclo de desenvolvimento e florescer (Raymer, 2002). A canola de

inverno exige período de vernalização de no mínimo oito semanas com temperaturas inferiores a 7°C, para que haja florescimento (Angelotti-Mendonça *et al.*, 2016). Já a canola de primavera não exige período de vernalização, mas de fotoperíodo longo durante o desenvolvimento (Angelotti-Mendonça *et al.*, 2016). A cultura é típica de regiões temperadas com latitudes entre 35° e 55° (Tomm *et al.*, 2011). Os principais produtores mundiais de canola são o Canadá, a União Europeia, a China e a Índia (USDA, 2024).

No Brasil, o cultivo da canola se iniciou na década de 1970 na cidade de Ijuí pela Cooperativa Tritícola de Ijuí (COTRIJUÍ), no estado do Rio Grande do Sul, devido a parceria feita pela cooperativa com a University of Gottingen, da Alemanha (Martin; Nogueira Junior, 1993). Na década de 1980, o Centro Nacional de Pesquisa do Trigo (CNPT/EMBRAPA) e o Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR/PR) desenvolveram pesquisas de adaptação de genótipos oriundos da Europa e do Canadá, visando obter uma nova cultura para a época de inverno e para a utilização como adubo verde na recuperação de solos (De Mori; Tomm; Ferreira, 2014). Com a expansão da demanda de mercado por produtos saudáveis na década de 1990, as pesquisas para o cultivo da canola no Brasil focaram na produção de óleo para o consumo humano. A expansão do cultivo e pesquisas nessa época foram liderados por dois diretores da Cooperativa de Cafeicultores de Maringá (COCAMAR), que visitaram o Canola Council of Canadá, no Canadá, impulsionando a importação de sementes do híbrido Hyola 401 (De Mori; Tomm; Ferreira, 2014).

A partir da década de 1990, o cultivo da canola se intensificou no Brasil, com aumento expressivo de 205% na produção no ano de 2000 em comparação ao ano de 1990 (FAO, 2024). No ano de 2023, o Brasil produziu 146,5 mil toneladas de canola, valor 65,7% maior do que a produção do ano de 2022, que foi de 96,2 mil toneladas (CONAB, 2024). A principal espécie utilizada no cultivo de canola no Brasil é a *Brassica napus L.*, das variedades de primavera (Tomm *et al.*, 2011). A região Sul é a principal produtora de canola do Brasil (Tomm *et al.*, 2011). Esse fato se deve à busca por implementação da cultura na região desde a década de 1970, acompanhado do desenvolvimento de pesquisas e do clima da região, que é adequado para a cultura. Apesar de a cultura ser típica de regiões de clima temperado, pesquisas no Brasil com intuito de desenvolver o cultivo da canola para regiões tropicais, têm sido desenvolvidas com êxito (Tomm *et al.*, 2009). Atualmente, existem 25 cultivares de canola e duas linhagens registradas no Brasil, com várias regiões de

adaptação nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina (MAPA, 2024).

O cultivo da canola no Brasil tem crescido devido a várias vantagens econômicas e ambientais dessa cultura. A canola pode ser utilizada na rotação de culturas durante o período de inverno, seguida pela implementação das culturas de verão como a soja e o milho (Tomm *et al.*, 2009). Essa alternativa permite o cultivo de uma segunda safra no mesmo ano, durante os meses de temperaturas mais baixas, otimizando o uso dos meios de produção, e permanente cobertura do solo com retenção de nutrientes, que beneficiam a próxima cultura implementada (Tomm *et al.*, 2009). O cultivo, em maioria, se baseia no sistema de plantio direto, o que reduz o uso de combustíveis e mão-de-obra, e propicia menor exposição do solo, maior retenção de água e redução da perda de nutrientes do solo (De Mori *et al.*, 2019). Outra vantagem é a descompactação natural das áreas onde a canola é cultivada. A canola possui caule ereto com raiz pivotante e grande número de raízes secundárias fasciculadas, o que auxilia na descompactação do solo e na formação de poros, que aumentam a aeração e infiltração da água no terreno, beneficiando a cultura implementada posteriormente, principalmente em momentos de estresse hídrico (Tomm *et al.*, 2009). Portanto, mediante a demanda por sistemas de produção que sejam sustentáveis economicamente e ambientalmente, a implementação da cultura da canola na rotação de culturas como a soja e o milho pode ser uma estratégia viável para o Brasil para a produção de óleo para o consumo humano, e como fonte de proteína vegetal para a nutrição animal, contribuindo para a produção com baixa emissão de carbono e com a ciclagem de nutrientes no sistema de produção.

2.3. A UTILIZAÇÃO DO FARELO DE CANOLA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO DE SOJA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS

Os coprodutos de oleaginosas, como o farelo de soja e o farelo de canola, são fontes proteicas utilizadas na dieta de vacas leiteiras (Kalscheur; Moore, 2017; Broderick, 2018). O farelo de soja é a fonte proteica mais utilizada na dieta de vacas leiteiras (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011; Canola Council of Canada, 2019). A dependência exclusiva dessa fonte pode ser um agravante devido a flutuação de preços, disponibilidade e, em alguns países, a dependência da exportação desse alimento (Paula *et al.*, 2019). Nesse contexto, o farelo de canola tem se destacado como fonte proteica na alimentação de vacas leiteiras. Em locais como no oeste do Canadá e em algumas regiões dos Estados Unidos, o farelo de canola desempenha um papel crucial como a principal fonte de proteína nas dietas das vacas leiteiras, devido à disponibilidade desse alimento e à sua qualidade nutricional (Kalscheur; Moore, 2017). Portanto, a escolha do farelo de canola como fonte proteica primária destaca a sua importância na alimentação animal e faz desse alimento uma opção atrativa para utilização nas dietas de vacas leiteiras em substituição ao farelo de soja.

O farelo de soja é considerado uma fonte proteica de alta degradação ruminal, com teor médio de PB de 52,6%, sendo 67% de PDR e 33% de PNDR (NASEM, 2021). Já o farelo de canola tem teor médio de PB de 41,5%, sendo 68% de PDR e 32% de PNDR (NASEM, 2021). A proporção de PNDR do farelo de canola tem grande variabilidade nos estudos, de 32 a 63,2% (Broderick *et al.*, 2016; NASEM, 2021; Lage *et al.*, 2021). Essa variação no teor de PNDR do farelo de canola entre os estudos pode ser explicada pelo método empregado na extração do óleo (Heim; Krebs, 2018; Canola Council of Canada, 2019), por diferenças inerentes às plantas de processamento (Jayasinghe *et al.*, 2014; Broderick *et al.*, 2016) e ao método de determinação da degradabilidade proteica no rúmen (Paula *et al.*, 2017).

Heim e Krebs (2018) avaliaram a composição química e a degradabilidade ruminal proteica de amostras de farelo de canola obtidas pelo método de extração por solvente ou por prensagem. Os autores constataram maior teor de PNDR nas amostras obtidas pelo método de extração por prensagem em comparação ao método de extração por solvente (55,6 vs. 44,3%). O farelo de canola obtido do método de extração por prensagem tem maior proporção de PNDR do que o farelo de canola obtido do método de extração por solvente (Broderick *et al.*, 2016). Segundo os

autores, no método de extração por prensagem há maior quantidade de calor gerada no processo. O calor em excesso associado com a umidade induz a ligação da proteína com outras moléculas como os carboidratos, processo químico denominado reação de Maillard. Nessa reação, os aminoácidos, principalmente a lisina, se ligam aos açúcares dos carboidratos formando complexos insolúveis. A indução dessa ligação altera a estrutura física da proteína e limita o acesso microbiano à fração proteica, o que reduz a degradação proteica no rúmen.

Jayasinghe *et al.* (2014) avaliaram a degradabilidade proteica no rúmen de sete amostras de farelo de canola obtidas de sete diferentes plantas de processamento. Os autores constataram variação de 21,5% no teor de PNDR entre as plantas de processamento. Broderick *et al.* (2016) avaliaram a composição química e a degradabilidade ruminal proteica de 144 amostras de farelo de canola obtidas de 12 diferentes plantas de processamento do Canadá. O teor de PNDR variou 7,5% entre as plantas de processamento. Essa influência das plantas de processamento no teor de PNDR pode ser explicada por variações em fatores inerentes aos processos como a temperatura, a umidade e o tempo empregados em cada etapa dos processos (Slominski, 1997; Adewole *et al.*, 2016; Broderick *et al.*, 2016).

O método de determinação da degradabilidade proteica no rúmen utilizado no NRC (2001) é o *in situ* (Orskov; McDonald, 1979). Esse método tem vantagens por simular as condições reais do rúmen e apresentar alta correlação com os dados *in vivo*, porém assume que toda perda de partículas é por degradação, inclusive a proteína solúvel. Esse fato pode mudar a abordagem das avaliações do farelo de canola do NRC de 2001, pois as duas principais formas de proteína presentes no farelo de canola, a napina e a cruciferina, são ricas em ligações dissulfeto (Akbari; Wu, 2015). As proteínas ricas em ligações dissulfeto são solúveis, mas resistentes à degradação no rúmen (McNabb *et al.*, 1994). Ou seja, provavelmente essas proteínas passam juntamente com a fração líquida para o intestino delgado para serem absorvidas. Dessa forma, ao assumir que essa fração foi degradada no rúmen, o método não contabiliza essa parte na PNDR, subestimando o seu valor. O farelo de canola tem 20,4% do total de proteínas na forma solúvel com taxa de degradação de 19% por hora, enquanto o farelo de soja tem 16,9% do total de proteínas na forma solúvel com taxa de degradação de 46% por hora (Hedqvist; Udén, 2006).

A estimativa da proporção de PNDR do farelo de canola pode impactar na quantidade de proteína metabolizável, de proteína metabolizável permissível para leite

e no fluxo de aminoácidos essenciais gerados por dietas com farelo de canola, em comparação às dietas com farelo de soja. De acordo com o NRC de 2001, o valor de PNDR do farelo de canola é de 36% e do farelo de soja de 43%, resultando em menor quantidade de proteína metabolizável, de proteína metabolizável permissível para leite e menor fluxo de aminoácidos essenciais nas dietas com farelo de canola em comparação às dietas com farelo de soja, quando esses valores são utilizados. Diante disso, seria necessário utilizar teor de PB maior nas dietas com farelo de canola do que nas dietas com farelo de soja, para alcançar o mesmo suprimento de proteína metabolizável (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011). Porém, as estimativas apresentadas no NRC de 2001 não foram comprovadas nos estudos posteriores, nos quais foi observado desempenho superior nos animais consumindo farelo de canola, em comparação ao farelo de soja (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011; Broderick; Faciola; Armentano, 2015; Paula; Broderick; Faciola, 2020). Dessa forma, possivelmente, o NRC de 2001 subestima o teor de PNDR e o suprimento de proteína metabolizável quando o farelo de canola é utilizado (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011; Paula; Broderick; Faciola, 2020).

O farelo de soja tem adequado perfil de aminoácidos perante ao do leite, porém é deficiente em metionina (Schwab; Ordway; Whitehouse, 2003). A metionina é o principal aminoácido limitante em dietas nas quais o farelo de soja é utilizado como principal fonte proteica (Schwab, 2010). O teor de metionina no farelo de canola é 47% maior do que no farelo de soja (NASEM, 2021). Dentre as fontes proteicas vegetais utilizadas nas dietas de vacas leiteiras, o farelo de canola tem o perfil de aminoácidos que mais se adequa às necessidades de aminoácidos para a produção de leite (Evans; Wood, 2023). Maxin, Ouellet e Lapierre (2013) avaliaram a concentração plasmática de aminoácidos de vacas leiteiras alimentadas com a mesma dieta basal variando apenas na fonte proteica que foi farelo de soja, farelo de canola, grãos de destilaria de milho secos com alto teor de proteína ou grãos de destilaria de trigo secos com solúveis. As vacas alimentadas com farelo de canola foram os únicos animais que não tiveram deficiência de nenhum aminoácido no sangue. As vacas alimentadas com farelo de soja tiveram teor de metionina 25% menor no sangue do que as vacas alimentadas com farelo de canola (32,4 vs. 40,5 μM). A utilização do farelo de canola em substituição ao farelo de soja como fonte proteica da dieta tem sido proposta com relatos de melhor desempenho dos animais, com aumento do consumo de matéria seca, da produção de leite (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011; Martineau; Ouellet;

Lapierre, 2013, 2014; Broderick; Faciola; Armentano, 2015), da produção de proteína do leite (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011; Paula; Broderick; Faciola, 2020), redução do nitrogênio ureico no leite (Maxin; Ouellet; Lapierre, 2013; Broderick; Faciola; Armentano, 2015; Paula; Broderick; Faciola, 2020) e aumento da eficiência de utilização de nitrogênio (Broderick; Faciola; Armentano, 2015).

2.3.1. CONSUMO DE MATÉRIA SECA E PRODUÇÃO DE LEITE

A resposta no consumo de matéria seca, na produção de leite e nos teores e produções de gordura, proteína e lactose de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola é semelhante ou superior à observada em vacas leiteiras alimentadas com farelo de soja em dietas isoproteicas (Tabela 1). Brito e Broderick (2007) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras recebendo ureia, farelo de algodão, farelo de soja ou farelo de canola como fonte proteica da dieta. Foram utilizadas 16 vacas multíparas, com 118 ± 19 dias em lactação, e oito vacas holandesas primíparas com 99 ± 13 dias em lactação, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino 4×4 com períodos de 28 dias. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (16,6% PB) com inclusão de 16,1% de farelo de canola com base na matéria seca na dieta. O consumo de matéria seca aumentou 0,7 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja (24,9 vs. 24,2 kg/dia; $P < 0,01$). A produção de leite aumentou 1,1 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja (41,1 vs. 40,0 kg/dia; $P < 0,01$). A produção de leite corrigido para 3,5% de gordura, bem como o teor e a produção de gordura, proteína e lactose no leite não diferiram entre vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P > 0,05$).

Christen *et al.* (2010) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras recebendo grãos de destilaria de milho secos com alto teor de proteína, grãos de destilaria de milho secos com solúveis, farelo de soja ou farelo de canola como fonte proteica da dieta. Foram utilizadas 12 vacas holandesas, com 78 ± 24 dias em lactação, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino 4×4 com períodos de 28 dias. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (16% de PB) com inclusão de 12,7% de farelo de canola com base na matéria seca da dieta. O consumo de matéria seca não diferiu entre as vacas recebendo farelo de canola ou farelo de soja como fonte proteica da dieta (25,2 vs. 24,1 kg/dia; $P = 0,45$). A produção de leite não diferiu nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de

soja (31,7 vs. 31,7 kg/dia; $P = 0,63$). A produção de leite corrigido para energia, e os teores e produções de gordura, de proteína e de lactose não diferiram entre vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P \geq 0,05$).

Na meta-análise feita por Huhtanen, Hetta e Swensson (2011) foram avaliados 122 estudos com vacas leiteiras alimentadas com farelo de soja ou farelo de canola como fonte proteica em dietas a base de silagem de capim ou com a silagem de capim parcialmente substituída por silagem de leguminosas ou de planta inteira de cereais. O consumo de matéria seca aumentou 2,6 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em comparação as vacas alimentadas com o farelo de soja (19,4 vs. 16,8 kg/dia; $P < 0,01$). A produção de leite aumentou 3,9 kg por dia (27,2 vs. 23,3 kg/dia; $P < 0,01$) e a produção de leite corrigido para energia aumentou 5 kg por dia (28,6 vs. 23,6 kg/dia; $P < 0,01$) nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. Os teores de gordura e de proteína no leite não diferiram entre as vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P > 0,30$).

Em outra meta-análise foi avaliado o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja em dietas a base de diversos tipos de forragem em 27 experimentos (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013). O consumo de matéria seca aumentou 0,24 kg por dia para cada 10% de inclusão de farelo de canola na dieta em comparação ao farelo de soja ($P < 0,01$). A produção de leite aumentou em 0,62 kg por dia para cada 10% de inclusão de farelo de canola na dieta ($P < 0,01$). A produção de leite corrigido para 4% de gordura e para energia, a produção (kg) de gordura e de lactose e os teores (%) de gordura, proteína e lactose no leite não diferiram entre as vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P > 0,10$). No entanto, a produção de proteína no leite aumentou 16,8 gramas por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja ($P < 0,01$).

Maxin, Ouellet e Lapierre (2013) avaliaram o efeito da utilização de grãos de destilaria de milho secos com alto teor de proteína, grãos de destilaria de trigo secos com solúveis, farelo de soja ou farelo de canola como fonte proteica da dieta no desempenho produtivo de vacas leiteiras. Foram utilizadas oito vacas holandesas, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino 4×4 com períodos de 14 dias. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (17,2% de PB) com inclusão de 20,8% de farelo de canola com base na matéria seca da dieta. O consumo de matéria seca não diferiu entre as vacas recebendo farelo de canola ou farelo de soja como

fonte proteica da dieta (23,6 vs. 24,0 kg/dia; $P = 0,49$). A produção de leite não diferiu nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja (30,9 vs. 31,9 kg/dia; $P = 0,42$). A produção de leite corrigido para energia, e os teores e produções de gordura, de proteína e de lactose não diferiram entre vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P \geq 0,05$).

Broderick e Faciola (2014) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja com ou sem suplementação de metionina na dieta. Foram utilizadas 16 vacas holandesas, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino 4×4 com períodos de 21 dias. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (17% de PB) com inclusão de 11,7% de farelo de canola na dieta com base na matéria seca. O consumo de matéria seca aumentou 0,5 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja nas dietas sem suplementação de metionina (27,5 vs. 27,2 kg/dia; $P = 0,04$). Embora sem efeito significativo, a produção de leite das vacas recebendo de farelo de canola foi 0,4 kg acima da produção das vacas recebendo farelo de soja na dieta (38,5 vs. 38,1 kg/dia; $P = 0,18$). A produção de leite corrigido para energia tendeu a aumentar 1 kg por dia (39,6 vs. 38,7 kg/dia; $P = 0,09$) e a produção de gordura tendeu a aumentar 60 gramas por dia (1,63 vs. 1,57 kg/dia; $P = 0,03$) nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja na dieta. A produção de proteína não diferiu nas vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja na dieta ($P = 0,14$). O consumo de matéria seca, a produção de leite, de leite corrigido para energia, de gordura e de proteína não foram influenciadas pela suplementação de metionina e não houve interação da fonte proteica com a suplementação de metionina ($P \geq 0,15$).

Broderick, Faciola e Armentano (2015) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras recebendo farelo de canola ou farelo de soja como fonte proteica em dietas com baixo (15%) ou alto (17%) teor de PB. Foram utilizadas 30 vacas holandesas multíparas, com produção de leite média de $47,8 \pm 5,1$ kg de leite por dia e 81 ± 29 dias em lactação, e 20 vacas holandesas primíparas com produção de leite média de $36,5 \pm 4,4$ kg de leite por dia e 100 ± 99 dias em lactação, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino 5×5 com períodos de 21 dias. A inclusão de farelo de canola foi de 11,5% na dieta com baixo teor de PB, e 17,1% na dieta com alto teor de PB. Não houve interação do teor de PB com a fonte proteica da dieta ($P \geq 0,33$). O consumo de matéria seca aumentou 0,4 kg por dia nas vacas

alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja em ambas as dietas (25,2 vs. 24,8 kg/dia; $P = 0,05$). A produção de leite aumentou 1,0 kg por dia (40,3 vs. 39,3 kg/dia; $P < 0,01$) e a produção de leite corrigido para energia aumentou 1,0 kg por dia (39,5 vs. 38,5 kg/dia; $P = 0,04$) nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja em ambos os teores de PB na dieta. Os teores de gordura, proteína e lactose não diferiram nas vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P > 0,05$). A produção de gordura tendeu a aumentar 50 gramas por dia (1,61 vs. 1,56 kg/dia; $P = 0,06$) e a produção de proteína aumentou 30 gramas por dia (1,22 vs. 1,19 kg/dia; $P = 0,02$) nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. A produção de lactose não diferiu entre os tratamentos ($P = 0,13$).

Weiss *et al.* (2015) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras recebendo 0; 3,9 ou 13,9% de farelo de canola com base na matéria seca da dieta. Nos tratamentos com 0 e 3,9% de farelo de canola, o farelo de soja também foi incluído como fonte proteica nas dietas. No tratamento com 13,9% de farelo de canola, o farelo de soja não foi incluído na dieta. Foram utilizadas 30 vacas holandesas, com produção de leite variando de 33 a 48 kg de leite por dia e 150 ± 42 dias em lactação. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas com 15% de PB na matéria seca. O consumo de matéria seca não diferiu entre as vacas recebendo 0; 3,9 ou 13,9% de farelo de canola na dieta (25,5; 25,7 e 26,5 kg/dia; $P = 0,41$). Embora sem efeito significativo, a produção de leite das vacas recebendo 3,9% de farelo de canola foi 1,85 kg acima da produção das vacas recebendo farelo de soja na dieta (39,5 vs. 37,6 kg/dia; $P = 0,18$), e das vacas recebendo 13,9% de farelo de canola foi de 1,75 kg acima da produção das vacas recebendo farelo de soja na dieta (39,4 vs. 37,6 kg/dia; $P = 0,18$). O teor de gordura reduziu em 0,41% nas vacas recebendo 3,9% de farelo de canola (3,26 vs. 3,67%; $P = 0,03$) e em 0,39% por dia nas vacas recebendo 13,9% de farelo de canola (3,28 vs. 3,67%; $P = 0,03$), em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta. Os teores de proteína, de lactose e as produções de gordura, proteína e lactose do leite não diferiram entre vacas alimentadas com farelo de canola ou farelo de soja na dieta ($P > 0,10$).

Paula *et al.* (2018) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. Foram utilizadas 30 vacas holandesas multíparas, com produção de leite média de 44 ± 7 kg de leite por dia e 119 ± 23 dias em lactação, e 15 vacas holandesas primíparas com produção

de leite média de 34 ± 6 kg de leite por dia e 121 ± 19 dias em lactação, distribuídas em delineamento em blocos casualizados, recebendo as dietas experimentais por 12 semanas. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (15,7% de PB), com inclusão de 11,2% de farelo de canola com base na matéria seca da dieta. O consumo de matéria seca não diferiu entre as vacas recebendo farelo de canola ou farelo de soja na dieta (27,1 vs. 26,7 kg/dia; $P = 0,81$). A produção de leite não diferiu entre as vacas recebendo farelo de canola ou farelo de soja na dieta (41,3 vs. 40,0 kg/dia; $P = 0,48$). Também sem efeito significativo, a produção de leite corrigido para 3,5% de gordura e para energia foi 1,2 e 0,9 kg acima da produção das vacas recebendo farelo de soja na dieta ($P > 0,10$). O teor de lactose aumentou 0,03% (4,86 vs. 4,83% kg/dia; $P = 0,03$) nas vacas alimentadas com farelo de canola, mas os teores de gordura e proteína e as produções de gordura, de proteína e de lactose do leite não diferiram ($P > 0,10$) entre vacas alimentadas com farelo de canola ou farelo de soja na dieta.

Paula, Broderick e Faciola (2020) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja em dietas com diferentes proporções de silagem de alfafa e silagem de milho. Nesse estudo os autores objetivaram avaliar as possíveis interações do tipo de forragem (silagem de alfafa ou silagem de milho) e da fonte proteica (farelo de soja ou farelo de canola) na resposta produtiva, tendo em vista que os diferentes teores de PDR e de energia das fontes de forragem poderiam influenciar a utilização de nitrogênio no rúmen de acordo com a fonte proteica utilizada. Foram avaliadas dietas isoproteicas (16% de PB) com (I) 50% de silagem de alfafa e 10% de silagem de milho, (II) 30% de silagem de alfafa e 30% de silagem de milho, e (III) 10% de silagem de alfafa e 50% de silagem de milho. A relação forragem e concentrado foi fixa de 60:40. A inclusão de farelo de canola nas dietas foi de (I) 5,8; (II) 11,8 e (III) 17,8%. Foram utilizadas 24 vacas holandesas multíparas, com produção de leite média de $49 \pm 4,0$ kg de leite por dia e 102 ± 41 dias em lactação, e 24 vacas holandesas primíparas com produção de leite média de 40 ± 4 kg de leite por dia e 123 ± 30 dias em lactação, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino em arranjo fatorial 3×2 com períodos de 28 dias. Não houve interação da fonte proteica com as proporções de cada forragem que foram utilizadas nas dietas ($P \geq 0,25$). O consumo de matéria seca não diferiu entre vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja (23,9 vs. 23,6 kg/dia; $P = 0,40$). A produção de leite aumentou 0,86 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja (37,2 vs. 36,4 kg/dia; $P = 0,03$). A

produção de leite corrigido para 3,5% de gordura e para energia, a produção de gordura e os teores de gordura, proteína e lactose no leite não diferiram entre vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P > 0,10$). A produção de proteína do leite aumentou 20 gramas por dia (1,12 vs. 1,10 kg/dia; $P = 0,03$) e produção de lactose tendeu a aumentar 40 gramas por dia (1,81 vs. 1,77 kg/dia; $P = 0,06$) nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja.

Lage *et al.* (2021) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja em dietas isoproteicas suplementadas com metionina. Foram utilizadas 15 vacas holandesas com produção de leite média de $46,5 \pm 7,80$ kg de leite por dia e 95 ± 20 dias em lactação, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino 3×3 com períodos de 28 dias. A inclusão de farelo de canola foi de 17,1% na dieta. O consumo de matéria seca aumentou 2,4 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja (26,9 vs. 24,5 kg/dia; $P < 0,01$). A produção de leite aumentou 2,7 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja (43,8 vs. 41,1 kg/dia; $P < 0,01$). A produção de leite corrigido para energia, o teor e a produção de gordura, de proteína e de lactose do leite não diferiram nas vacas alimentadas com farelo de canola ou com farelo de soja ($P > 0,10$).

Benchaar *et al.* (2021) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. Os autores avaliaram a inclusão de 0, 8, 16 e 24% de farelo de canola com base na matéria seca da dieta. Foram utilizadas 16 vacas holandesas com produção de leite média de $47,5 \pm 4,9$ kg de leite por dia e 116 ± 23 dias em lactação, distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino 4×4 com períodos de 35 dias. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas com 16,3% de PB. O consumo de matéria seca aumentou de 1,1 a 1,9 kg por dia nas vacas recebendo 8% (26,9 kg/dia), 16% (27,3 kg/dia) ou 24% (27,7 kg/dia) de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (25,8 kg/dia; $P < 0,01$). A produção de leite das vacas recebendo 8% (41,3 kg/dia), 16% (42,0 kg/dia) ou 24% (43,4 kg/dia) de farelo de canola foi de 1,3 a 3,0 kg acima da produção das vacas recebendo farelo de soja na dieta (40,4 kg/dia; $P < 0,01$). O teor de gordura reduziu em 0,04% nas vacas recebendo 16% de farelo de canola (4,00 vs. 3,96%; $P < 0,01$) e em 0,16% por dia nas vacas recebendo 24% de farelo de canola (4,00 vs. 3,84%; $P < 0,01$), em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta. O teor de lactose reduziu em 0,01% nas vacas recebendo 16% de

farelo de canola (4,59 vs. 4,58%; $P < 0,01$) e em 0,04% por dia nas vacas recebendo 24% de farelo de canola (4,59 vs. 4,55%; $P < 0,01$), em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta. A produção de proteína aumentou 60 gramas por dia nas vacas recebendo 8% de farelo de canola (1,36 vs. 1,42 kg/d), 90 gramas por dia nas vacas recebendo 16% de farelo de canola (1,36 vs. 1,45 kg/d), e 100 gramas por dia nas vacas recebendo 24% de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (1,36 vs. 1,46 kg/d; $P < 0,01$). A produção de lactose aumentou 40 gramas por dia nas vacas recebendo 8% de farelo de canola (1,86 vs. 1,90 kg/d), 70 gramas por dia nas vacas recebendo 16% de farelo de canola (1,86 vs. 1,93 kg/d), e 120 gramas por dia nas vacas recebendo 24% de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (1,86 vs. 1,98 kg/d; $P < 0,01$). O teor de proteína e a produção de gordura não diferiram entre vacas alimentadas com farelo de canola ou farelo de soja na dieta ($P \geq 0,14$).

Tabela 1. Compilação dos resultados de desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja

Variável	Inclusão ¹ (% da MS)	CMS ² (kg/d)	Produção de leite (kg/d)	LCE ³ (kg/d)	Gordura (%)	Gordura (kg/d)	Proteína (%)	Proteína (kg/d)	Lactose (%)	Lactose (kg/d)	NUL ⁴ (mg/dL)
Brito e Broderick (2007)	16,1	24,9 vs. 24,2 (<i>P</i> < 0,01)	41,1 vs. 40,0 (<i>P</i> < 0,01)	ND ⁵	3,14 vs. 3,09 (<i>P</i> > 0,05)	1,29 vs. 1,22 (<i>P</i> > 0,05)	3,12 vs. 3,15 (<i>P</i> > 0,05)	1,27 vs. 1,23 (<i>P</i> > 0,05)	4,87 vs. 4,95 (<i>P</i> > 0,05)	2,01 vs. 1,96 (<i>P</i> > 0,05)	11,6 vs. 12,0 (<i>P</i> > 0,05)
Christen <i>et al.</i> (2010)	12,7	25,2 vs. 24,1 (<i>P</i> = 0,45)	31,7 vs. 31,7 (<i>P</i> = 0,63)	34,6 vs. 35,1 (<i>P</i> = 0,95)	4,07 vs. 4,21 (<i>P</i> > 0,05)	1,28 vs. 1,33 (<i>P</i> = 0,53)	3,33 vs. 3,33 (<i>P</i> = 0,08)	1,05 vs. 1,04 (<i>P</i> = 0,99)	4,72 vs. 4,71 (<i>P</i> = 0,58)	1,50 vs. 1,50 (<i>P</i> = 0,65)	9,8 vs. 9,9 (<i>P</i> = 0,50)
Maxin, Ouellet e Lapierre (2013)	20,8	23,6 vs. 24,0 (<i>P</i> = 0,49)	30,9 vs. 31,9 (<i>P</i> = 0,42)	30,0 vs. 30,9 (<i>P</i> = 0,75)	3,75 vs. 3,70 (<i>P</i> > 0,05)	1,09 vs. 1,12 (<i>P</i> = 0,53)	3,70 vs. 3,64 (<i>P</i> = 0,39)	1,13 vs. 1,15 (<i>P</i> = 0,83)	4,48 vs. 4,56 (<i>P</i> = 0,06)	1,38 vs. 1,45 (<i>P</i> = 0,21)	9,7 vs. 11,4 (<i>P</i> = 0,01)
Broderick e Faciola (2014)	11,7	27,5 vs. 27,2 (<i>P</i> = 0,04)	38,5 vs. 38,1 (<i>P</i> = 0,18)	39,6 vs. 38,7 (<i>P</i> = 0,09)	ND	1,63 vs. 1,57 (<i>P</i> = 0,06)	ND	1,29 vs. 1,27 (<i>P</i> = 0,14)	ND	ND	15,0 vs. 15,0 (<i>P</i> = 0,72)
Broderick, Faciola e Armentano (2015)	† ⁶	25,2 vs. 24,8 (<i>P</i> = 0,05)	40,3 vs. 39,3 (<i>P</i> < 0,01)	39,5 vs. 38,5 (<i>P</i> = 0,04)	4,02 vs. 3,99 (<i>P</i> = 0,49)	1,61 vs. 1,56 (<i>P</i> = 0,06)	3,06 vs. 3,04 (<i>P</i> = 0,51)	1,22 vs. 1,19 (<i>P</i> = 0,02)	4,87 vs. 4,88 (<i>P</i> = 0,71)	1,95 vs. 1,92 (<i>P</i> = 0,13)	10,3 vs. 11,5 (<i>P</i> < 0,01)
Weiss <i>et al.</i> (2015)	3,9	25,7 vs. 25,5 (<i>P</i> = 0,41)	39,5 vs. 37,6 (<i>P</i> = 0,18)	ND	3,26 vs. 3,67 (<i>P</i> = 0,03)	1,29 vs. 1,38 (<i>P</i> = 0,33)	3,01 vs. 3,12 (<i>P</i> = 0,70)	1,21 vs. 1,16 (<i>P</i> = 0,19)	4,72 vs. 4,79 (<i>P</i> = 0,78)	1,88 vs. 1,81 (<i>P</i> = 0,38)	9,2 vs. 10,6 (<i>P</i> = 0,05)
	13,9	26,5 vs. 25,5 (<i>P</i> = 0,41)	39,4 vs. 37,6 (<i>P</i> = 0,18)	ND	3,28 vs. 3,67 (<i>P</i> = 0,03)	1,31 vs. 1,38 (<i>P</i> = 0,33)	3,09 vs. 3,12 (<i>P</i> = 0,70)	1,24 vs. 1,16 (<i>P</i> = 0,19)	4,73 vs. 4,79 (<i>P</i> = 0,78)	1,91 vs. 1,81 (<i>P</i> = 0,38)	8,1 vs. 10,6 (<i>P</i> = 0,05)
Paula <i>et al.</i> (2018)	11,2	27,1 vs. 26,7 (<i>P</i> = 0,81)	41,3 vs. 40,0 (<i>P</i> = 0,48)	40,1 vs. 39,2 (<i>P</i> = 0,45)	4,09 vs. 4,07 (<i>P</i> = 0,80)	1,64 vs. 1,59 (<i>P</i> = 0,42)	3,14 vs. 3,20 (<i>P</i> = 0,18)	1,25 vs. 1,25 (<i>P</i> = 0,70)	4,86 vs. 4,83 (<i>P</i> = 0,03)	1,94 vs. 1,91 (<i>P</i> = 0,47)	12,8 vs. 13,7 (<i>P</i> < 0,01)
Paula, Broderick e Faciola (2020)	† ⁷	23,6 vs. 23,9 (<i>P</i> = 0,40)	37,2 vs. 36,4 (<i>P</i> = 0,03)	36,0 vs. 35,5 (<i>P</i> = 0,25)	3,93 vs. 4,00 (<i>P</i> = 0,21)	1,46 vs. 1,45 (<i>P</i> = 0,73)	3,02 vs. 3,02 (<i>P</i> = 0,85)	1,12 vs. 1,10 (<i>P</i> = 0,03)	4,84 vs. 4,85 (<i>P</i> = 0,87)	1,81 vs. 1,77 (<i>P</i> = 0,06)	12,9 vs. 14,1 (<i>P</i> < 0,01)
Lage <i>et al.</i> (2021)	17,1	26,9 vs. 24,5 (<i>P</i> < 0,01)	43,8 vs. 41,1 (<i>P</i> < 0,01)	41,4 vs. 40,3 (<i>P</i> = 0,74)	3,66 vs. 3,65 (<i>P</i> = 0,99)	1,60 vs. 1,54 (<i>P</i> = 0,67)	3,10 vs. 3,17 (<i>P</i> = 0,17)	1,36 vs. 1,34 (<i>P</i> = 0,82)	4,78 vs. 4,81 (<i>P</i> = 0,19)	2,10 vs. 2,05 (<i>P</i> = 0,86)	9,23 vs. 10,4 (<i>P</i> < 0,01)
	8,0	26,9 vs. 25,8 (<i>P</i> < 0,01)	41,3 vs. 40,4 (<i>P</i> < 0,01)	45,0 vs. 44,0 (<i>P</i> < 0,01)	4,00 vs. 4,00 (<i>P</i> = 0,01)	1,64 vs. 1,61 (<i>P</i> = 0,14)	3,46 vs. 3,42 (<i>P</i> = 0,29)	1,42 vs. 1,36 (<i>P</i> < 0,01)	4,60 vs. 4,59 (<i>P</i> = 0,05)	1,90 vs. 1,86 (<i>P</i> < 0,01)	12,7 vs. 13,6 (<i>P</i> < 0,01)
	16,0	27,3 vs. 25,8 (<i>P</i> < 0,01)	42,0 vs. 40,4 (<i>P</i> < 0,01)	45,6 vs. 44,0 (<i>P</i> < 0,01)	3,96 vs. 4,00 (<i>P</i> = 0,01)	1,65 vs. 1,61 (<i>P</i> = 0,14)	3,45 vs. 3,42 (<i>P</i> = 0,29)	1,45 vs. 1,36 (<i>P</i> < 0,01)	4,58 vs. 4,59 (<i>P</i> = 0,05)	1,93 vs. 1,86 (<i>P</i> < 0,01)	12,1 vs. 13,6 (<i>P</i> < 0,01)
	24,0	27,7 vs. 25,8 (<i>P</i> < 0,01)	43,4 vs. 40,4 (<i>P</i> < 0,01)	46,2 vs. 44,0 (<i>P</i> < 0,01)	3,84 vs. 4,00 (<i>P</i> = 0,01)	1,66 vs. 1,61 (<i>P</i> = 0,14)	3,38 vs. 3,42 (<i>P</i> = 0,29)	1,46 vs. 1,36 (<i>P</i> < 0,01)	4,55 vs. 4,59 (<i>P</i> = 0,05)	1,98 vs. 1,86 (<i>P</i> < 0,01)	12,2 vs. 13,6 (<i>P</i> < 0,01)

¹Inclusão de farelo de canola na dieta (com base na matéria seca da dieta). ²Consumo de matéria seca. ³Leite corrigido para energia. ⁴Nitrogênio ureico no leite. ⁵ND: não determinado. ⁶A inclusão de farelo de canola foi de 11,5% na dieta com baixo (15%) teor de PB, e de 17,1% na dieta com alto (17%) teor de PB. Como não houve interação do teor de PB e da fonte proteica da dieta para os parâmetros relatados na tabela, apenas o fator fonte proteica foi considerado. ⁷A inclusão de farelo de canola foi de 5,8% na dieta com 50% de silagem de alfafa e 10% de silagem de milho, 11,8% na dieta com 30% de silagem de alfafa e 30% de silagem de milho, e de 17,8% na dieta com 10% de silagem de alfafa e 50% de silagem de milho. Como não houve interação da proporção de cada forragem e da fonte proteica da dieta para os parâmetros relatados na tabela, apenas o fator fonte proteica foi considerado.

2.3.2. MECANISMOS ASSOCIADOS ÀS RESPOSTAS PRODUTIVAS

Nos estudos em que a resposta positiva no consumo de matéria seca de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja foi observada, a variação foi de 0,3 a 2,6 kg de aumento por dia (Brito e Broderick, 2007; Huhtanen, Hetta e Swensson, 2011; Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013; Broderick e Faciola, 2014; Broderick, Faciola e Armentano, 2015; Lage *et al.*, 2021; Benchaar *et al.*, 2021). Embora o consumo de matéria seca não tenha diferido em alguns estudos (Christen *et al.*, 2010; Maxin; Ouellet; Lapierre, 2013; Weiss *et al.*, 2015; Paula *et al.*, 2018; Paula, Broderick e Faciola, 2020) a variação observada foi aumento de 0,3 a 1,1 kg por dia nas vacas alimentadas com farelo de canola em comparação às vacas alimentadas com farelo de soja. Sendo assim, deve-se considerar a importância prática desse valor.

A explicação para maior consumo de matéria seca em animais alimentados com farelo de canola em substituição ao farelo de soja pode ser relacionada a efeitos no rúmen, pós-rúmen ou a uma combinação de ambos os fatores (Paula *et al.*, 2018). Considerando os efeitos no rúmen, a suposição de maior consumo de matéria seca é proposta pelo aumento da síntese microbiana em animais recebendo farelo de canola na dieta. Esse efeito não é totalmente elucidado, pois a produção de proteína microbiana normalmente não aumenta em vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja (Brito e Broderick, 2007; Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013; Maxin; Ouellet; Lapierre, 2013; Paula *et al.*, 2018; Benchaar *et al.*, 2021). Considerando os efeitos pós-rúmen, o aumento do consumo de matéria seca nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja possivelmente está associado com a resposta em produção de leite. A resposta na produção de leite quando o farelo de canola é utilizado em substituição ao farelo de soja na dieta normalmente é positiva. A maior produção de leite é explicada por efeitos metabólicos mediados pelo melhor suprimento de aminoácidos, que podem aumentar a produção de leite e, conseqüentemente, do consumo de matéria seca para suprir a demanda energética da glândula mamária quando o farelo de canola é utilizado em substituição ao farelo de soja (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011). Os autores denominaram esse efeito como “*pull effect*”, no qual o aumento na produção de leite “puxa” o consumo de matéria seca. Essa teoria é a mais aceita atualmente para explicar o aumento do consumo de matéria seca em vacas leiteiras alimentadas com

farelo de canola em substituição ao farelo de soja na dieta. Por fim, o consumo de matéria seca de vacas leiteiras recebendo farelo de canola em substituição ao farelo de soja como fonte proteica na dieta pode se assemelhar ou aumentar em 0,3 a 2,6 kg por dia, com inclusões de farelo de canola na dieta variando de 3,9 até 20,8%.

O aumento da produção de leite em vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja na dieta pode ser explicado por efeitos metabólicos mediados pelo melhor suprimento de aminoácidos (Huhtanen; Hetta; Swensson, 2011). Segundo os autores, o farelo de canola aumenta o suprimento de aminoácidos essenciais para o intestino delgado e o suprimento de proteína metabolizável com um perfil de aminoácidos semelhante ao do leite, o que melhora a produção de leite. Martineau, Ouellet e Lapierre (2014) fizeram uma meta-análise avaliando as concentrações plasmáticas de aminoácidos em vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição a outras fontes proteicas, incluindo o farelo de soja. Os autores observaram maior concentração plasmática de aminoácidos essenciais, de metionina, e dos aminoácidos de cadeia ramificada nos animais recebendo farelo de canola em comparação a todas as outras fontes proteicas. A metionina e os aminoácidos de cadeia ramificada são nutrientes capazes de estimular a via mTOR (Coleman *et al.*, 2020), que regula a síntese proteica e a proliferação celular (Grobner, 2011). Portanto, por meio da ativação da via mTOR, o farelo de canola também pode estimular a produção de leite.

A resposta positiva em produção de proteína, de gordura e de lactose do leite em vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja na dieta pode ser explicada pelo aumento da produção de leite nesses animais. Por outro lado, a redução do teor de gordura em vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja na dieta pode estar associada ao efeito de diluição causado pelo aumento de produção de leite nesses animais (Weiss *et al.*, 2015). O aumento do teor de lactose em vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja na dieta pode estar relacionado a maior produção de leite desses animais. O processo de síntese de lactose se inicia no retículo endoplasmático das células mamárias, onde pela ação da lactose sintase ocorre a formação do dissacarídeo (Costa *et al.*, 2019). Em seguida, a lactose é transportada para o complexo de Golgi, onde é embalada em vesículas secretoras. A quantidade de lactose dentro dessas vesículas gera uma forte pressão osmótica, pois a lactose não pode atravessar facilmente a membrana lipídica dessas vesículas. Devido a essa

pressão osmótica, a água é atraída para o interior das vesículas secretoras a fim de re-estabelecer o equilíbrio. Esse influxo de água para as vesículas resulta no aumento do volume do leite. Portanto, o aumento da porcentagem de lactose está associado diretamente com o aumento na produção de leite (Costa *et al.*, 2019). Além disso, essa resposta também pode ser associada ao maior suprimento de aminoácidos essenciais para a glândula mamária nas vacas alimentadas com farelo de canola. A extração de aminoácidos do grupo 2 pela glândula mamária ocorre em excesso em relação à quantidade secretada na proteína do leite (NASEM, 2021). Esse excesso de aminoácidos pode ser utilizado como substrato para a síntese de aminoácidos não essenciais (NASEM, 2021) e como fonte de carbono para a síntese de lactose na glândula mamária (Bequette *et al.*, 2006; Lapierre, Lemosquet e Ouellet, 2013; Silva *et al.*, 2022).

2.3.3. EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é considerado elemento de importância nutricional de alto custo nas dietas de animais ruminantes. A eficiência de utilização do nitrogênio por ruminantes é baixa, sendo que cerca de 15 a 40% é utilizado para a produção (Calsamiglia *et al.*, 2010) e até 85% pode ser excretado no meio ambiente. Em vacas leiteiras, a eficiência de utilização de nitrogênio pode variar de 20 a 45% (Aguirre-Villegas *et al.*, 2017). O excesso da excreção desse elemento e as emissões de amônia oriunda dos dejetos, têm impacto negativo para o meio ambiente (Paula; Broderick; Faciola, 2020). A variação na estimativa da eficiência de utilização de nitrogênio reflete as diferentes práticas nutricionais, sendo que melhor eficiência de utilização do nitrogênio em sistemas de produção de leite indica melhor conversão do nitrogênio consumido em proteína do leite e menor excreção para o meio ambiente. Diversas pesquisas têm sido feitas para aumentar a eficiência do uso do nitrogênio (Calsamiglia *et al.*, 2010). Segundo os autores, as principais recomendações da literatura são baseadas no ajuste para sincronismo da degradação de proteína e carboidratos fermentáveis, na utilização de dietas equilibradas em PDR e PNDR e na modificação do perfil de aminoácidos que chegam no intestino delgado para a absorção.

O fornecimento do perfil de aminoácidos adequado para a síntese proteica maximiza o uso dos aminoácidos pela glândula mamária, reduz a excreção de nitrogênio e aumenta a eficiência do uso do nitrogênio (Arriola Apelo; Knapp; Hanigan,

2014; Presteggaard-Wilson *et al.*, 2021). Dentre as fontes proteicas vegetais utilizadas nas dietas de vacas leiteiras, o farelo de canola é a fonte com perfil de aminoácidos mais semelhante ao perfil de aminoácidos da proteína microbiana e do leite (Schingoethe, 1996). Na meta-análise de Martineau, Ouellet e Lapierre (2014), os autores concluíram que houve aumento da concentração plasmática do total de aminoácidos essenciais e dos aminoácidos de cadeia ramificada, com redução do nitrogênio ureico no sangue e no leite, e aumento da eficiência de utilização do nitrogênio quando o farelo de canola foi utilizado em substituição a outras fontes proteicas vegetais. Essa resposta demonstra a importância do perfil de aminoácidos do farelo de canola em comparação a outras fontes proteicas vegetais utilizadas na dieta de vacas leiteiras.

O efeito da utilização do farelo de canola em substituição ao farelo de soja na eficiência de utilização do nitrogênio em vacas leiteiras é inconsistente nos estudos (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013; Broderick; Faciola; Armentano, 2015; Paula; Broderick; Faciola, 2020; Benchaar *et al.*, 2021). Broderick, Faciola e Armentano (2015) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras recebendo farelo de canola ou farelo de soja como fonte proteica em dietas com baixo (15%) ou alto (17%) teor de PB. A produção de proteína do leite foi maior (1,22 vs. 1,19 kg/dia; $P = 0,02$) e eficiência de utilização do nitrogênio aumentou 0,8% (30,8 vs. 30,0%; $P < 0,01$) nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja em ambos os teores de PB. A excreção de nitrogênio via leite (10,3 vs. 11,5 mg/dL; $P < 0,01$) e via urina (206 vs. 229 g/dia; $P < 0,01$) foi menor nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja em ambos os teores de PB. Nesse estudo não foi relatado o consumo de nitrogênio e a excreção de nitrogênio via fezes.

Paula, Broderick e Faciola (2020) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras recebendo farelo de canola em substituição ao farelo de soja em dietas com diferentes proporções de silagem de alfafa e silagem de milho. Foram avaliadas três diferentes proporções dessas forragens na dieta: (I) 50% de silagem de alfafa e 10% de silagem de milho, (II) 30% de silagem de alfafa e 30% de silagem de milho, e (III) 10% de silagem de alfafa e 50% de silagem de milho. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas com 16% de PB. A inclusão de farelo de canola nas dietas foi de (I) 5,8; (II) 11,8 e (III) 17,8%. O consumo de nitrogênio não diferiu entre as vacas recebendo farelo de canola ou farelo de soja na dieta ($P = 0,39$). A produção de proteína do leite foi maior (1,12 vs. 1,10 kg/dia; $P = 0,03$) e eficiência de utilização do nitrogênio

estimada foi de 29,1% para as vacas alimentadas com farelo de canola e 28,9% para as vacas alimentadas com farelo de soja, com aumento numérico de 0,2%. A excreção de nitrogênio via leite (12,9 vs. 14,1 mg/dL; $P < 0,01$) e via urina (241 vs. 253 g/dia; $P = 0,05$) foi menor nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. A excreção de nitrogênio via fezes não diferiu entre as vacas recebendo farelo de canola ou farelo de soja na dieta (184 vs. 183 g/dia; $P = 0,72$). Não houve interação da fonte proteica com as proporções de cada forragem que foram utilizadas nas dietas ($P \geq 0,25$).

Benchaar *et al.* (2021) avaliaram o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. Os autores avaliaram a inclusão de 0, 8, 16 e 24% de farelo de canola com base na matéria seca da dieta. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas com 16,3% de PB. O consumo de nitrogênio foi maior nas vacas recebendo 8% (700 g/dia), 16% (707 g/dia) ou 24% (718 g/dia) de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (679 g/dia; $P < 0,01$). A produção de proteína do leite foi maior nas vacas recebendo 8% (213 g/dia), 16% (218 g/dia) ou 24% (222 g/dia) de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (210 g/dia; $P < 0,01$). A eficiência de utilização do nitrogênio estimada não diferiu entre as vacas recebendo 8% (30,4%), 16% (30,9%) ou 24% (30,9%) de farelo de canola em comparação às vacas recebendo farelo de soja na dieta (30,9%; $P = 0,71$). A excreção de nitrogênio via leite foi menor nas vacas recebendo 8% (12,7 mg/dL), 16% (12,1 mg/dL) ou 24% (12,2 mg/dL) de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (13,6 mg/dL; $P < 0,01$). A excreção de nitrogênio via urina foi menor nas vacas recebendo 8% (234 g/d), 16% (224 g/d) ou 24% (224 g/d) de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (238 g/d; $P < 0,01$). A excreção de nitrogênio via fezes foi maior nas vacas recebendo 8% (217 g/d), 16% (224 g/d) ou 24% (233 g/d) de farelo de canola em comparação as vacas recebendo farelo de soja na dieta (206 g/d; $P < 0,01$).

O aumento da eficiência de utilização do nitrogênio em vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola pode ser explicado pelo maior suprimento de PNDR do farelo de canola, e melhor utilização dos aminoácidos essenciais absorvidos (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013; Maxin; Ouellet; Lapierre, 2013). O maior suprimento de PNDR pode aumentar o suprimento de aminoácidos essenciais no intestino, na proteína metabolizável (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013; Maxin;

Ouellet; Lapierre, 2013) e no plasma de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola (Maxin; Ouellet; Lapierre, 2013). O perfil de aminoácidos do farelo de canola é o mais semelhante com o perfil de aminoácidos do leite dentre as fontes proteicas vegetais utilizadas nas dietas (Evans; Wood, 2023). Portanto, o farelo de canola pode permitir adequado suprimento e perfil de aminoácidos essenciais fornecidos pela PNDR. Na meta-análise de Martineau, Ouellet e Lapierre (2014) as concentrações plasmáticas do total de aminoácidos essenciais, de metionina, e dos aminoácidos de cadeia ramificada foram maiores nos animais recebendo farelo de canola em comparação a todas as outras fontes proteicas vegetais.

Além disso, o farelo de canola pode suprir de forma adequada as quantidades de PDR (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2013) com adequado perfil de aminoácidos (Maesoomi *et al.*, 2006) e não limitar a disponibilidade de nitrogênio para a síntese microbiana. Paula *et al.* (2018) avaliaram o consumo e fluxo omasal das frações de nitrogênio de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. Foram utilizadas 30 vacas holandesas multíparas, com produção de leite média de 44 ± 7 kg de leite por dia com 119 ± 23 dias em lactação, e 15 vacas holandesas primíparas com produção de leite média de 34 ± 6 kg de leite por dia com 121 ± 19 dias em lactação, distribuídas em delineamento em blocos casualizados, recebendo as dietas experimentais por 12 semanas. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (15,7% PB), com inclusão de 11,2% de farelo de canola com base na matéria seca da dieta. O consumo de matéria seca não diferiu entre as vacas recebendo farelo de canola ou farelo de soja na dieta (27,1 vs. 26,7 kg/dia; $P = 0,81$). O consumo de nitrogênio (668 vs. 625 g/dia; $P = 0,04$) e o suprimento de PDR (2,96 vs. 2,58 kg/dia; $P = 0,10$) foi maior nas vacas alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja. A quantidade de nitrogênio digerida no rúmen tendeu a ser maior nas vacas alimentadas com farelo de canola em comparação ao farelo de soja (472 vs. 413 g/dia; $P = 0,10$). De acordo com os autores, o aumento numérico no consumo de matéria seca das vacas alimentadas com farelo de canola propiciou maior consumo de nitrogênio. Assim, houve maior disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos ruminais, garantindo suprimento adequado de PDR.

2.4. NUTRIÇÃO PROTEICA NA REPRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

A proteína é um dos principais componentes da dieta que influenciam a reprodução de vacas leiteiras. A proteína dietética fornece PDR para a síntese de

proteína microbiana, e PNDR para o suprimento de aminoácidos no intestino delgado (NASEM, 2021). A proteína microbiana e a PNDR após a digestão intestinal fornecem o *pool* de aminoácidos disponíveis para serem utilizados para as funções fisiológicas. Na reprodução, os aminoácidos desempenham papel crucial, e a otimização dos aminoácidos metabolizáveis para os animais é fundamental para assegurar essa função. O suprimento de forma adequada e o perfil de aminoácidos das dietas podem favorecer a reprodução de vacas leiteiras, tanto por ação direta dos aminoácidos no sistema reprodutivo, quanto pela ação indireta da redução dos teores de nitrogênio ureico no plasma.

Os aminoácidos são componentes do fluido encontrado no trato reprodutivo da fêmea e podem beneficiar o desenvolvimento oocitário (Sinclair *et al.*, 2008; Read *et al.*, 2021), embrionário (Grobner, 2011; Leese, McKeegan e Sturmey, 2021) e o estabelecimento da prenhez (Grobner, 2011). Os aminoácidos essenciais podem atuar na reprodução por meio da síntese proteica, da estimulação da via da proteína alvo da rapamicina em mamíferos “*mammalian target of rapamycin*” - mTOR (Coleman *et al.*, 2020; Leese, McKeegan e Sturmey, 2021), do metabolismo de um carbono (D’Mello, 2003), da síntese de moléculas antioxidantes (Zhou *et al.*, 2016), do metabolismo de lipídeos (Acosta *et al.*, 2017), da síntese de insulina, do hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (Yang *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2009), de estradiol (Yang *et al.*, 2000), da melhoria da qualidade folicular e oocitária (Liu *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2018) e do reconhecimento (Grobner, 2011) e manutenção da prenhez (Wu, 2021). Já os aminoácidos não essenciais estão envolvidos nos processos de síntese proteica (D’Mello, 2003), de síntese de enzimas antioxidantes (D’Mello, 2003; Coleman *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021), do desenvolvimento das células da massa celular interna e das células do trofoblasto do embrião (Najafzadeh *et al.*, 2018) e na prevenção dos efeitos tóxicos da amônia no sistema reprodutivo (Orsi; Leese, 2004).

O efeito dos aminoácidos no desenvolvimento oocitário, embrionário e no estabelecimento da prenhez podem ser avaliados por meio da suplementação de aminoácidos no meio de maturação dos oócitos e/ou no meio de cultivo dos prováveis zigotos ou por meio do fornecimento de um aminoácido em específico para vacas leiteiras na forma de *top-dress*. Wiltbank *et al.* (2015), embasados em 17 estudos, destacaram que os principais aminoácidos estudados relacionados ao desenvolvimento embrionário e estabelecimento da prenhez em vacas leiteiras são a

metionina, a lisina e a histidina. Dentre os três, a metionina tem sido o aminoácido mais estudado e a resposta tem sido variada, com efeito positivo (Bonilla *et al.*, 2010; Elsaadawy; Wu; Bu, 2022) ou sem efeito (Stangaferro *et al.*, 2021; Toledo *et al.*, 2023) no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. O balanceamento de dietas com suprimento e perfil adequado de aminoácidos também pode beneficiar a reprodução por possibilitar a redução dos teores de nitrogênio ureico no plasma. A utilização de dietas com alto teor de PB ou deficientes em carboidratos fermentáveis pode resultar em utilização ineficiente do nitrogênio, absorção excessiva de nitrogênio amoniacal do rúmen e maior teor de nitrogênio ureico no plasma (Thatcher; Santos; Staples, 2011). O maior teor de nitrogênio ureico no plasma tem sido associado com a redução da fertilidade de vacas leiteiras (Lean *et al.*, 2012; Wiltbank *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2022). O excesso de nitrogênio amoniacal do rúmen pode ser refletido nas concentrações de nitrogênio ureico no sangue e no leite, e esses indicadores são utilizados para avaliar as associações do metabolismo da proteína dietética com os parâmetros reprodutivos (Butler, 1998; Sinclair *et al.*, 2014). O nitrogênio ureico do sangue pode se difundir facilmente para o útero, e dessa forma atuar como antagonista da fertilidade em vacas leiteiras (Jordan *et al.*, 1983; Lean *et al.*, 2012; Wiltbank *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015).

A redução da fertilidade de vacas leiteiras causada pelo excesso de nitrogênio ureico pode estar associada à alteração no ambiente uterino e no desenvolvimento folicular e oocitário (Elrod; Butler, 1993; Feng *et al.*, 2022). No ambiente uterino, as implicações podem ser pelo efeito tóxico nas células endometriais (Feng *et al.*, 2022), por alteração nas secreções de prostaglandina (Butler, 1998; Kowsar *et al.*, 2016), e de minerais (Jordan *et al.*, 1983), e pela redução do pH uterino (Elrod; Van Amburgh; Butler, 1993; Elrod; Butler, 1993). O desenvolvimento folicular e oocitário pode ser prejudicado pela alta concentração de nitrogênio no fluido folicular, a qual pode prejudicar a foliculogênese e oogênese por reduzir o crescimento e viabilidade das células da granulosa (Rooke *et al.*, 2004), por alterar os processos de maturação nuclear e citoplasmática do oócito (Sinclair *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2009), e por induzir a apoptose celular (Santos *et al.*, 2009; Kowsar *et al.*, 2018). Além das implicações diretas do efeito do excesso de nitrogênio no ambiente uterino e folicular, esse efeito também pode ser de forma indireta pelo gasto energético para detoxificação da amônia à ureia no fígado (Butler, 1998; Leroy *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2021).

Na revisão de literatura feita por Butler (1998), o autor postulou o valor máximo de nitrogênio ureico no plasma de 19 mg/dL e no leite para que não ocorram prejuízos na fertilidade de vacas leiteiras. Em 2017, outro grupo de pesquisa realizou uma meta-análise, a partir de 21 estudos, da relação entre as concentrações de nitrogênio ureico no plasma e no leite e o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (Raboisson *et al.*, 2017). Os autores observaram redução de 43% da taxa de prenhez quando a concentração de nitrogênio ureico no plasma e no leite foram acima de 19 mg/dL ($P < 0,05$). O valor máximo estabelecido de nitrogênio ureico no plasma e no leite foi de 19 mg/dL. Esse valor permaneceu consistente com a revisão de literatura realizada por Butler (1998), mesmo após quase 10 anos.

Embora esses valores de nitrogênio ureico no plasma e no leite sejam considerados limiares para a reprodução, respostas variáveis dessa associação em rebanhos leiteiros podem ser observadas na literatura (Carroll *et al.*, 1988; Blanchard *et al.*, 1990; Elrod e Butler, 1993; Garcia-Bojalil *et al.*, 1994; Barton *et al.*, 1996; Sinclair *et al.*, 2000; Westwood *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2009; Kowsar *et al.*, 2018). A razão para a variação na resposta entre o teor de nitrogênio ureico no sangue e no leite com os parâmetros reprodutivos em vacas leiteiras não é totalmente elucidada (Berry *et al.*, 2016).

A avaliação dos efeitos do maior teor de nitrogênio ureico no sangue e no leite sobre o desenvolvimento oocitário, embrionário, e nos índices reprodutivos pode ser feita fornecendo aos animais dietas variando nos teores de PB, na relação de PDR e PNDR, no tipo e proporção de carboidratos, ou por meio da inclusão de ureia na dieta. Adicionalmente, estudos *in vitro* são feitos pela adição de ureia ao meio de maturação dos oócitos e/ou ao meio de cultivo dos prováveis zigotos.

No primeiro caso, o aumento das concentrações de nitrogênio ureico no plasma e no leite é considerado fator de forma isolada a afetar os parâmetros reprodutivos dos animais. Porém, a relação proteína e energia da dieta, o balanço energético negativo (Garcia-Bojalil *et al.*, 1994), a interação do consumo de PB com o balanço energético (Butler, 1998), o período de fornecimento das dietas (Hammon; Wang; Holyoak, 2000; Leroy *et al.*, 2008), a produção de leite (Westwood *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2004), o número de lactações, a saúde dos animais, as condições ambientais, as práticas de manejo (Garcia-Bojalil *et al.*, 1994), e as interações desses fatores, também podem afetar os parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras. Portanto, nessas condições, o efeito se torna multifatorial, o que pode explicar a variação das respostas

obtidas em cada estudo. No segundo caso, o fator nitrogênio ureico é aplicado de forma isolada por tempo determinado, de acordo com a metodologia padrão de maturação e cultivo *in vitro*, para avaliar o desenvolvimento oocitário e embrionário. Portanto, dessa forma, os outros fatores anteriormente citados que poderiam também estar interferindo na resposta são excluídos da avaliação. Nesses estudos, não há muita variação nas respostas e, geralmente, o desenvolvimento oocitário e embrionário são prejudicados pelo excesso de nitrogênio ureico (De Wit *et al.*, 2001; Kowsar *et al.*, 2018).

De acordo com o NASEM (2021), a formulação de dietas visando à otimização dos aminoácidos metabolizáveis alinha-se a atual tendência de reduzir a PB da dieta e aumentar o suprimento de aminoácidos para vacas leiteiras, limitando problemas na reprodução, associados ao alto teor de nitrogênio ureico no plasma. A utilização de fontes proteicas com maior teor de PNDR e melhor perfil de aminoácidos pode aumentar o fluxo de proteína e aminoácidos metabolizáveis para o animal, reduzir o teor de nitrogênio ureico no sangue e no leite e, dessa forma, melhorar o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. Tamminga (2006) mostrou a relação do teor de PDR da dieta e do teor de nitrogênio ureico no sangue com parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras. O autor fez um levantamento de dez estudos, em que foram relatados o teor de PDR, o teor de nitrogênio ureico no sangue e parâmetros reprodutivos, como dias para a primeira ovulação, dias para a primeira inseminação, taxa de concepção à primeira inseminação, dias em aberto, número de serviços por concepção e taxa de prenhez. O autor observou que em todos os estudos houve melhoria nos índices reprodutivos das vacas que foram alimentadas com menor teor de PDR, associado positivamente com o teor de nitrogênio ureico no sangue.

Aboozar *et al.* (2012) avaliaram o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes teores de PNDR na dieta no início da lactação. Foram utilizadas 58 vacas holandesas, distribuídas em delineamento em blocos casualizados, recebendo as dietas experimentais da terceira semana pós-parto até 120 dias em lactação. As dietas foram: (I) baixo (6,65%), (II) médio (7,72%) e (III) alto (8,79%) teor de PNDR, sendo todas as dietas com valor fixo de 11,3% de PDR. As dietas de médio e alto teor de PNDR geraram maior fluxo de proteína metabolizável. A produção de leite aumentou 3,12 kg por dia nas vacas alimentadas com alto teor de PNDR na dieta, em comparação às vacas alimentadas com baixo teor de PNDR na dieta (38,54 vs. 35,42 kg/dia; $P = 0,03$). A produção de leite não diferiu entre as vacas

recebendo alto (38,54 kg) ou médio (35,81 kg), e entre as vacas recebendo médio (35,81 kg) ou baixo (35,42) teor de PNDR na dieta ($P > 0,05$). O número de serviços por concepção (1,76; 2,37 e 2,72) e o número de dias em aberto (90, 123 e 122) foram menores nas vacas alimentadas com alto teor de PNDR na dieta, em comparação com as vacas alimentadas com médio ou baixo teor de PNDR na dieta ($P < 0,05$). A taxa de concepção na primeira inseminação foi maior nas vacas alimentadas com alto teor de PNDR em comparação às alimentadas com baixo teor de PNDR na dieta (50,1 vs. 24,6%; $P = 0,03$) e foi maior nas vacas alimentadas com médio teor de PNDR em comparação às alimentadas com baixo teor de PNDR na dieta (41,0 vs. 24,6%; $P = 0,03$). A taxa de concepção na primeira inseminação não diferiu entre vacas alimentadas com alto ou médio teor de PNDR na dieta (50,1 vs. 41,0%; $P = 0,03$).

Na meta-análise feita por Lean *et al.* (2012) foram avaliados 21 estudos nos quais o teor de PDR da dieta foi associado com o efeito do alto teor de nitrogênio ureico no sangue e a taxa de concepção de vacas leiteiras. Os autores observaram que a taxa de concepção não foi afetada pela concentração de nitrogênio ureico no sangue ($P > 0,05$). No entanto, as vacas alimentadas com dietas com maior teor de PDR tiveram redução de 9% na chance de concepção, em dietas que variaram de 11 a 23% no teor de PB ($P = 0,02$). Na meta-análise feita por Rodney *et al.* (2018) foram avaliados 14 estudos em que a relação entre a degradabilidade da fonte proteica e o intervalo do parto à prenhez de vacas leiteiras foi estudada. Os autores observaram que vacas alimentadas com dietas com fontes de maior degradação no rúmen tiveram maior intervalo do parto à prenhez ($P > 0,05$).

2.5. A UTILIZAÇÃO DO FARELO DE CANOLA EM SUBSTITUIÇÃO AO FARELO DE SOJA NA REPRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

A utilização do farelo de canola nas dietas, além de propiciar benefícios na produção, pode também ser favorável para a reprodução de vacas leiteiras. A utilização de dietas com farelo de canola pode aumentar o teor de aminoácidos essenciais no sangue de vacas leiteiras em comparação a dietas com farelo de soja (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2014). Martineau, Ouellet e Lapierre (2014) avaliaram a concentração plasmática de aminoácidos de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em comparação a outras fontes proteicas vegetais em 21 experimentos oriundos de 10 estudos. Os autores observaram aumento ($P < 0,05$) do total de aminoácidos e de aminoácidos essenciais no sangue nas vacas alimentadas com

farelo de canola em substituição a outras fontes proteicas da dieta. Maxin, Ouellet e Lapierre (2013) avaliaram a concentração plasmática de aminoácidos de vacas leiteiras alimentadas com farelo de soja ou farelo de canola como fonte proteica da dieta. As vacas alimentadas com farelo de canola tiveram teor de metionina 25% maior do que as vacas alimentadas com farelo de soja (40,5 vs. 32,4 μM , $P < 0,05$).

O farelo de canola por ser uma fonte proteica de menor degradabilidade ruminal do que o farelo de soja, possibilita redução na produção de nitrogênio amoniacal no rúmen (Broderick, Faciola e Armentano, 2015) e do nitrogênio ureico no sangue (Martineau; Ouellet; Lapierre, 2014). Na meta-análise feita por Martineau, Ouellet e Lapierre (2014), os autores observaram redução no teor de nitrogênio ureico no sangue de 2,27 mg/dL para cada 10% de fornecimento do farelo de canola em substituição a outras fontes proteicas da dieta.

2.5.1. QUALIDADE OOCITÁRIA

O maior suprimento de PNDR das dietas com farelo de canola pode aumentar o suprimento de aminoácidos metabolizáveis para vacas leiteiras (Maxin; Ouellet; Lapierre, 2013). O aumento da disponibilidade de aminoácidos no sangue reflete nas concentrações dos aminoácidos no fluido folicular (Leroy *et al.*, 2004; Sinclair *et al.*, 2008). Portanto, ao aumentar a disponibilidade desse nutriente no sangue e fluido folicular via dieta pode ocorrer resposta positiva na qualidade oocitária de vacas leiteiras (Santos; Cerri; Sartori, 2008; Reed, 2022).

Sinclair *et al.* (2008) correlacionaram a concentração de aminoácidos do fluido folicular com a qualidade de oócitos bovinos oriundos de abatedouro. Os complexos *cumulus-oophorus* (COCs) foram obtidos por meio de aspiração de folículos com 6 a 8 mm de diâmetro. A qualidade oocitária foi avaliada por morfologia dos COCs de acordo com as células do *cumulus* e características do citoplasma. Os COCs de qualidade excelente - grau 1 (mais de cinco camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo), boa - grau 2 (menos de cinco camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo ou com granulações sutis) e regular - grau 3 (menos de cinco camadas do *cumulus* ligeiramente expandidas com citoplasma irregular) foram utilizados nas análises devido a melhor qualidade. Os COCs foram maturados por período de 20 a 24 horas, fertilizados e cultivados. Os embriões foram avaliados quanto à fase de desenvolvimento nos dias 2 e 8 de cultivo. O fluido de cada folículo foi coletado separadamente para a análise da concentração

e do perfil de aminoácidos. A concentração total de aminoácidos foi menor ($P < 0,05$) no fluido oriundo de folículos cujos oócitos não clivaram ($4,29 \mu\text{mol/mL}$), em comparação com o fluido de folículos cujos oócitos clivaram ($5,28 \mu\text{mol/mL}$) ou se desenvolveram a blastocistos ($5,42 \mu\text{mol/mL}$). Dentre todos os aminoácidos essenciais e não essenciais avaliados, os mais correlacionados positivamente com o grau de qualidade oocitária foram a metionina e a leucina ($P < 0,05$). O autor pontuou que a maior concentração de metionina no fluido folicular foi positivamente correlacionada à avaliação morfológica dos COCs.

Rooke *et al.* (2009) avaliaram a relação da concentração plasmática de aminoácidos com a qualidade oocitária em novilhas leiteiras. Trinta e duas novilhas leiteiras, com aproximadamente 24 meses de idade, foram distribuídas em delineamento em blocos casualizados em arranjo fatorial 2×2 , sendo o primeiro fator a concentração de amido (alta - 42,4% ou baixa - 14,9%) e o segundo fator a concentração de leucina na dieta (alta - 10,3% ou baixa - 8,4%). Para obter maior concentração de leucina na dieta, os autores incluíram farelo de glúten de milho como fonte proteica. Na dieta com baixa concentração de leucina foi utilizado o farelo de soja como fonte proteica. As novilhas foram sincronizadas, os COCs foram aspirados e avaliados quanto à morfologia de acordo com as células do *cumulus* e as características do citoplasma. Os COCs que não estavam desnudos foram maturados por 24 horas, e fertilizados. Os prováveis zigotos foram cultivados e avaliados quanto a clivagem no dia 2 e quanto a produção de blastocistos e fase de desenvolvimento no dia 8 de cultivo. O número de COCs recuperados, a qualidade oocitária e o número de oócitos que clivaram não foram influenciados pelo teor de amido ou de leucina da dieta ($P > 0,05$). A concentração plasmática do total de aminoácidos foi associada positivamente ($P < 0,01$) com a proporção de oócitos que clivaram após fertilização.

O efeito de maior suprimento de PNDR na dieta e da alteração da concentração de aminoácidos no sangue e fluido folicular via dieta especificamente na qualidade oocitária de vacas leiteiras ainda precisa ser melhor elucidado. Os estudos, em sua maioria, são feitos *in vitro* com a suplementação de determinados aminoácidos no meio de maturação (Rosenkrans; First, 1994; Rezaei; Chian, 2005). A linha de pesquisa que têm como objetivo avaliar a composição de aminoácidos no fluido folicular de animais alimentados com diferentes fontes proteicas na dieta, e sua relação com a qualidade oocitária é escassa.

Além dos mecanismos associados ao maior suprimento de PNDR e aminoácidos metabolizáveis, a inclusão do farelo de canola na dieta de vacas leiteiras pode melhorar a qualidade oocitária por reduzir o teor de nitrogênio ureico no sangue. Embora a relação do teor de nitrogênio ureico no sangue e o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras seja controversa, os resultados são mais consistentes quando o foco é a qualidade oocitária. Sinclair *et al.* (2000) avaliaram o desenvolvimento folicular e a competência de desenvolvimento *in vitro* de oócitos coletados de novilhas alimentadas com dietas que geraram baixa ou alta concentração de nitrogênio ureico no plasma. Foram utilizadas 48 novilhas (Charolês × Holstein-Friesian) com média de 20 meses de idade. As dietas foram formuladas para serem isoenergéticas e isoproteicas, diferindo apenas na fonte primária de carboidratos e de proteína. A primeira fonte de carboidrato era menos fermentável (fibra oriunda de palha) e a segunda mais fermentável (amido oriundo de trigo e cevada) no rúmen. A primeira fonte proteica era de liberação mais lenta (farelo de colza) e a segunda fonte de liberação mais rápida (ureia) no rúmen. Essa configuração nas dietas resultou no arranjo fatorial 2 × 2 com as duas fontes de carboidratos (baixa ou alta liberação de energia) e duas taxas de liberação de nitrogênio (síncrona ou assíncrona). As quatro combinações resultantes foram: (I) dieta com baixa liberação de energia, síncrona; (II) dieta com baixa liberação de energia, assíncrona; (III) dieta com rápida liberação de energia, síncrona; (IV) dieta com rápida liberação de energia, assíncrona. As dietas foram fornecidas durante 18 dias. As combinações I e III resultaram no grupo de baixa formação de amônia no rúmen, e as combinações II e IV no grupo de alta formação de amônia no rúmen. As concentrações de nitrogênio ureico no plasma e de amônia no fluido folicular foram maiores nas novilhas alimentadas com dietas que geraram alta concentração de amônia no rúmen do que naquelas alimentadas com dietas que geraram baixa concentração de amônia no rúmen (19,6 vs. 16,0 mg/dL e 911,7 vs. 787,3 nmol/mL, respectivamente, $P < 0,01$). O número de folículos pequenos e médios, e o número de oócitos recuperados não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,10$). As taxas de clivagem (47,4 vs. 62,4%; $P = 0,02$) e de blastocistos (10,9 vs. 20,6%; $P = 0,06$) foram menores quando os oócitos foram derivados de novilhas que receberam dieta que propiciou alta concentração de nitrogênio ureico no plasma em comparação às novilhas alimentadas com a dieta que propiciou baixa concentração de nitrogênio ureico no plasma. O número total de blastocistos que se desenvolveram no

dia 7 e 8, o estágio de desenvolvimento, e a qualidade dos embriões não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,10$).

Santos *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do teor de nitrogênio plasmático na capacidade dos COCs recuperados se desenvolverem a blastocistos por meio da fertilização e cultivo *in vitro*. Foram utilizadas 56 novilhas (Holstein-Friesian), que foram abatidas e os ovários foram coletados e separados em três grupos, de acordo com o teor de nitrogênio ureico no plasma: (I) abaixo de 13 mg/dL; (II) de 13 a 16 mg/dL; e (III) acima de 16 mg/dL. Os COCs foram obtidos por meio de aspiração de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm e maturados durante 24 horas. Posteriormente, os COCs foram fertilizados e os prováveis zigotos cultivados por oito dias. A proporção de oócitos oriundos de novilhas com teor de nitrogênio ureico no plasma acima de 16 mg/dL que clivaram e se desenvolveram a blastocistos no dia 8 foi menor, em comparação aos oócitos oriundos de novilhas com teor de nitrogênio ureico no plasma abaixo de 13 mg/dL e de 13 a 16 mg/dL (taxa de clivagem: 72,5%, 72,2% e 61,7%; $P < 0,01$, e taxa de blastocistos: 34,0%, 28,3% e 23,0%, respectivamente; $P < 0,05$). A taxa de apoptose celular foi maior nos blastocistos que foram oriundos dos oócitos de novilhas com teor de nitrogênio ureico no plasma acima de 16 mg/dL, em comparação aos blastocistos que foram oriundos dos oócitos de novilhas com teor de nitrogênio ureico no plasma abaixo de 13 mg/dL e de 13 a 16 mg/dL (43,2%, 25,9% e 19,0%, respectivamente; $P < 0,05$).

Em um estudo *in vitro*, De Wit, Cesar e Kruip (2001) avaliaram os efeitos da suplementação de ureia na maturação oocitária e na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos oriundos de abatedouro. Os COCs foram obtidos por meio de aspiração de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm e avaliados quanto à morfologia. Os COCs com células do *cumulus* compactas e com presença de granulações escuras no citoplasma foram maturados durante 24 horas em meio de maturação base sem ureia (controle) ou com 6 mM de ureia, que corresponde a 16,8 mg/dL de nitrogênio ureico no sangue. Após a maturação, os oócitos foram avaliados quanto a fase de desenvolvimento nuclear (vesícula germinativa, metáfase I, telófase e metáfase II), que foi considerada a medida de qualidade oocitária. Em conjunto a esse primeiro experimento, foi realizado outro para avaliar o desenvolvimento embrionário. Os COCs foram submetidos aos mesmos tratamentos e maturados conforme descrito anteriormente. Após o período de maturação, os COCs foram fertilizados e cultivados por 9 dias. O número de oócitos no estágio de vesícula germinativa foi menor no grupo

controle do que no grupo que recebeu adição de ureia no meio de maturação ($P < 0,01$). O número de oócitos no estágio de metáfase I e II foi menor no grupo que recebeu adição de ureia no meio de maturação ($P < 0,01$). A porcentagem de oócitos fertilizados (43,2 vs. 64,1%), de embriões clivados (56,1 vs. 68,8%), e a porcentagem de mórula e blastocistos no dia 7 (14,8 vs. 22,4%) de avaliação expressas como porcentagem dos oócitos cultivados foram menores no grupo que recebeu ureia no meio de maturação em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). O desenvolvimento embrionário quando expresso como porcentagem dos oócitos clivados não foi afetado pela adição de ureia ao meio de maturação ($P > 0,05$).

Kowsar *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da suplementação de ureia no desenvolvimento de oócitos bovinos oriundos de abatedouro. Os COCs foram obtidos por meio de aspiração de folículos com diâmetro entre 4 e 8 mm, classificados e somente os de qualidade excelente - grau 1 (mais de três camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo) e boa - grau 2 (menos de três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo ou com granulações sutis) foram utilizados nas análises. Os COCs foram maturados durante 24 horas em meio de maturação base sem ureia (controle), ou com 20 ou com 40 mg/dL de ureia. As concentrações utilizadas no meio correspondem a 0; 9,3 e 18,7 mg/dL de nitrogênio ureico no sangue. Após a maturação, os COCs foram fertilizados e os prováveis zigotos foram cultivados e avaliados quanto a fase de desenvolvimento nos dias 1, 3, 7 e 9 de cultivo. A taxa de fertilização foi maior no grupo controle em comparação aos grupos com adição de 20 e de 40 mg/dL de ureia no meio de maturação (87,6; 81,1 e 75,1%, respectivamente, $P < 0,05$). A taxa de oócitos degenerados no dia 3 de cultivo foi maior nos grupos com adição de 20 mg/dL e de 40 mg/dL de ureia no meio de maturação em comparação ao grupo controle ($P < 0,01$). As proporções de oócitos fertilizados e cultivados que se tornaram blastocistos foram menores nos grupos com adição de 20 mg/dL e de 40 mg/dL de ureia no meio de maturação em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$).

2.5.2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Os processos metabólicos do organismo produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de forma natural durante as reações que envolvem ambos os compostos. O termo “espécie reativa” refere-se a moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados (Keane; Ealy, 2024). Devido a essa característica, essas

espécies podem reagir com outras moléculas para ganhar estabilidade, o que, pode levar a diversos danos celulares. As espécies reativas de oxigênio são as mais estudadas nesse contexto, sendo reconhecidas por seus efeitos nocivos no oócito e no embrião (Keane; Ealy, 2024). O organismo, por sua vez, possui mecanismos antioxidantes que ajudam a manter um equilíbrio adequado entre a produção de espécies reativas e a proteção celular. Quando há um excesso dessas espécies, pode ocorrer o que se denomina estresse oxidativo (Sordillo; Aitken, 2009; Gilbert, 2019).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes da célula, resultando em peroxidação lipídica da membrana celular, oxidação de proteínas e danos ao DNA (Sordillo; Aitken, 2009). Segundo os autores, essas alterações podem induzir a célula ao processo de apoptose, comprometendo a integridade e a função celular. Os mecanismos de defesa produzidos pelo organismo para neutralizar as espécies reativas de oxigênio são conduzidos por via enzimática ou não enzimática. A via enzimática é a via primária de defesa (Lu *et al.* 2018) e é considerada a mais eficiente, pois catalisa diretamente a redução das espécies reativas (Sordillo; Aitken, 2009). As enzimas como a glutatona, a superóxido dismutase e a catalase são as principais enzimas que facilitam essas reações, convertendo espécies reativas em moléculas menos prejudiciais.

No oócito, níveis fisiológicos de espécies reativas de oxigênio são essenciais para a maturação e competência oocitária (Krisher, 2013). Porém, em excesso, podem prejudicar os processos de maturação nuclear e dessa forma reduzir a qualidade e o desenvolvimento oocitário (Lu *et al.* 2018; Gilbert, 2019). Portanto, é fundamental que o oócito mantenha equilíbrio adequado entre o estresse oxidativo e a defesa antioxidante (Krisher, 2013). O sistema antioxidante intra-folicular é responsável pela regulação dessa defesa antioxidante no oócito (Gonzalez-Maldonado *et al.*, 2018). O principal sistema enzimático que atua no desenvolvimento oocitário é o mediado pela glutatona (Keane; Ealy, 2024). De acordo com os autores, é necessário o armazenamento elevado da enzima glutatona no oócito para que os processos de maturação e fertilização ocorram de maneira adequada. Além desse sistema de neutralização das espécies reativas, os sistemas das enzimas superóxido dismutase e catalase também atuam em conjunto, formando uma rede de defesa antioxidante integrada.

Os oócitos que se desenvolvem dentro de um fluido folicular com melhor capacidade antioxidante podem ser de melhor qualidade, o que pode aumentar a taxa

de fertilização (Gupta *et al.*, 2011). O fluido folicular é formado através da transudação do soro sanguíneo (Gérard *et al.*, 2002) e por substâncias produzidas localmente no ambiente folicular pelas células da teca e granulosa (Guerreiro *et al.*, 2018). Portanto, alterações metabólicas no soro sanguíneo podem se refletir na composição bioquímica do fluido folicular e podem influenciar diretamente a qualidade oocitária (Leroy *et al.*, 2004). Dessa forma, a qualidade e o desenvolvimento oocitário podem ser melhorados com o aumento da produção de enzimas antioxidantes no sangue e fluido folicular de vacas leiteiras.

Os aminoácidos são substratos para a produção de enzimas antioxidantes (D'Mello, 2003; Zhou *et al.*, 2016; Coleman *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Keane; Ealy, 2024). Ali, Bilodeau e Sirard (2003) avaliaram a suplementação do aminoácido cisteína que é considerado substrato de enzimas antioxidantes no desenvolvimento de oócitos bovinos. Os COCs foram obtidos por meio de aspiração de folículos com tamanho entre 2 e 6 mm, classificados e somente os oócitos de grau I foram utilizados nas análises. Os oócitos foram maturados durante 24 horas em meio de maturação base sem (controle) ou com cisteína (0,6 mM). Após a maturação, os oócitos foram fertilizados, cultivados e a taxa de clivagem foi avaliada depois de 72 h de cultivo. O número de embriões que se desenvolveram a mórula e a blastocisto foi avaliado no dia 8 de desenvolvimento. A taxa de clivagem não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). A proporção de oócitos que se desenvolveram a mórula e a blastocisto foi maior no tratamento com cisteína em comparação ao tratamento controle (33,3% vs. 20,3%; $P < 0,05$). No mesmo estudo, os autores cultivaram zigotos em meio de cultivo com em meio de maturação base sem (controle) ou com cisteína (0,6 mM). Esses zigotos não receberam suplementação de cisteína no meio de maturação e fertilização. Semelhante ao ocorrido com os oócitos que foram maturados em meio com cisteína, a proporção de oócitos que se desenvolveram a mórula e a blastocisto foi maior no tratamento com cisteína em comparação ao tratamento controle (30,6 vs. 22,2%; $P < 0,05$).

2.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O farelo de canola é um coproduto proteico vegetal que tem ganhado popularidade nas dietas de vacas leiteiras, devido aos seus efeitos similares ou superiores na produção de leite e sólidos do leite, assim como na eficiência de utilização do nitrogênio, perante a outras fontes proteicas como o farelo de soja. Além

disso, o farelo de canola pode propiciar redução do teor de nitrogênio ureico no sangue em comparação com a utilização do farelo de soja. Esses efeitos são explicados pelo maior suprimento de PNDR, aliado ao aumento da disponibilidade de aminoácidos metabolizáveis oriundos dessa fonte proteica.

O maior suprimento de PNDR com melhor perfil de aminoácidos, o maior fluxo de aminoácidos metabolizáveis gerado e o menor teor de nitrogênio ureico no sangue de vacas leiteiras alimentadas com farelo de canola em substituição ao farelo de soja podem impactar positivamente a qualidade oocitária. Além disso, é possível que o maior suprimento de aminoácidos metabolizáveis estimule a atividade de enzimas antioxidantes no fluido folicular e, dessa forma, favoreça a qualidade oocitária.

No Brasil, as dietas de vacas leiteiras são baseadas em milho e soja. O farelo de soja é a principal fonte proteica que é utilizada nas dietas, sendo uma fonte proteica de alta degradabilidade ruminal e com baixo teor de metionina. Portanto, nessas dietas o principal aminoácido limitante é a metionina. Nesse contexto, a utilização do farelo de canola nas dietas de vacas leiteiras, no nosso país, pode ser uma opção promissora. A produção de canola no Brasil está em expansão com aumento aproximado de 70% no ano de 2023 em relação ao ano anterior. As projeções indicam crescimento ainda mais significativo na produção, com possibilidade de aumento de até 100% em 2024 em comparação com 2023. Esse aumento na produção acarreta maior disponibilidade do coproduto farelo de canola, o que pode fazer com que essa fonte proteica seja uma alternativa viável e econômica para a produção de leite brasileira. Portanto, todos esses pontos corroboram para a utilização desse coproduto e estão alinhados com os pilares de sustentabilidade econômica e ambiental do sistema de produção de leite.

REFERÊNCIAS

- ABOOZAR, M. *et al.* Impacts of different levels of RUP on performance and reproduction of Holstein fresh cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 1338-1345, 2012.
- ACOSTA, D. A. V. *et al.* Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on steroidogenic potential of the first postpartum dominant follicle and expression of immune mediators in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 96, p. 1-9, 2017.
- ADEWOLE, D. I. *et al.* Chemical and nutritive characteristics of canola meal from Canadian processing facilities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 222, p. 17-30, 2016.
- AGUIRRE-VILLEGAS, H. A. *et al.* Dairy cow nitrogen efficiency. **Sustainable Dairy. University of Wisconsin Extension. Sustainable Dairy Fact Sheet Series**, 2017.
- AKBARI, A.; WU, J. An integrated method of isolating napin and cruciferin from defatted canola meal. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 308-315, 2015.
- ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 939-949, 2003.
- ALMEIDA, R. *et al.* Associations of days open with milk urea nitrogen and other herd traits in dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 50, e20200081, 2021.
- ANGELOTTI-MENDONÇA, J. *et al.* Canola (*Brassica napus* L.). **Piracicaba, São Paulo, Brasil: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Divisão de Biblioteca**, 2016.
- ARCE-CORDERO, J. A. *et al.* Effects of neutral detergent fiber digestibility estimation method on calculated energy concentration of canola meals from 12 Canadian processing plants. **Journal of Animal Science**, v. 99, n. 11, p. skab309, 2021.
- ARRIOLA APELO, S. I.; KNAPP, J. R.; HANIGAN, M. D. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4000-4017, 2014.
- BARTON, B. A. *et al.* Effects of dietary crude protein, breed, parity, and health status on the fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 12, p. 2225-2236, 1996.
- BELL, J. M.; KEITH, M. O. A survey of variation in the chemical composition of commercial canola meal produced in Western Canadian crushing plants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, n. 2, p. 469-480, 1991.
- BENCHAAAR, C. *et al.* Diet supplementation with canola meal improves milk production, reduces enteric methane emissions, and shifts nitrogen excretion from urine to feces in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 9, p. 9645-9663, 2021.

- BEQUETTE, B. J. *et al.* Application of stable isotopes and mass isotopomer distribution analysis to the study of intermediary metabolism of nutrients. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. suppl_13, p. E50-E59, 2006.
- BERRY, D. P. *et al.* Milk production and fertility in cattle. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 269-290, 2016.
- BONILLA, L. *et al.* Methionine requirements for the preimplantation bovine embryo. **Journal of Reproduction and Development**, p. 1006110280 1006110280, 2010.
- BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, 1998.
- BLANCHARD, T. *et al.* Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 6, p. 905-908, 1990.
- BRODERICK, G. A.; KOWALCZYK, T.; SATTER, L. D. Milk production response to supplementation with encapsulated methionine per os or casein per abomasum. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 12, p. 1714-1721, 1970.
- BRODERICK, G. A.; FACIOLA, A. P. Effects of supplementing rumen-protected met and lys on diets containing soybean meal or canola meal in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 750-751, 2014.
- BRODERICK, G. A.; FACIOLA, A. P.; ARMENTANO, L. E. Replacing dietary soybean meal with canola meal improves production and efficiency of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 5672-5687, 2015.
- BRODERICK, G. A. *et al.* Chemical and ruminal in vitro evaluation of Canadian canola meals produced over 4 years. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7956-7970, 2016.
- BRODERICK, G. A. Optimizing ruminant conversion of feed protein to human food protein. **Animal**, v. 12, n. 8, p. 1722-1734, 2018.
- BRITO, A. F.; BRODERICK, G. A. Effects of different protein supplements on milk production and nutrient utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1816-1827, 2007.
- CALSAMIGLIA, S. *et al.* Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v. 4, p. 1184-1196, 2010.
- CANOLA COUNCIL OF CANADA. **Canola Meal Dairy Feed Guide**. 2019. 6th ed. Canola Council of Canada.
- CANOLA COUNCIL OF CANADA. History of canola seed development. 2016. Disponível em: <<https://www.canolacouncil.org/canola-encyclopedia/history-of-canola-seed-development/>> Acesso em: 02 jan. 2024.
- CARROLL, D. J. *et al.* Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 12, p. 3470-3481, 1988.
- COHICK, W. S. *et al.* Effects of intake and postruminal casein infusion on performance and concentrations of hormones in plasma of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 12, p. 3022-3031, 1986.

COLEMAN, D. N. *et al.* Amino acids and the regulation of oxidative stress and immune function in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 98, p. S175-S193, 2020.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Informações agropecuárias. 2024. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/902-canola2024>>. Acesso em: 03 jan. 2024.

COSTA, A. *et al.* Invited review: Milk lactose-Current status and future challenges in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 5883-5898, 2019.

CHENG, Z. *et al.* Relationships between circulating urea concentrations and endometrial function in postpartum dairy cows. **Animals**, v. 5, n. 3, p. 748-773, 2015.

CHRISTEN, K. A. *et al.* Response of lactating dairy cows to high protein distillers grains or 3 other protein supplements. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 5, p. 2095-2104, 2010.

DE MORI, C.; TOMM, G. O.; FERREIRA, P. E. P. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil.** Passo Fundo: Embrapa Trigo. Documentos online, 149, 2014. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/988475/1/2014documentosonline149.pdf>>.

DE MORI, C. *et al.* **Levantamento de tecnologias empregadas no cultivo de canola pelos produtores do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais.** Passo Fundo: Embrapa Trigo. Documentos online, 181, 2019. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/205197/1/ID44766-2019DO181.pdf>>.

D'MELLO, J. P. F. **Amino Acids in Animal Nutrition.** Wallingford: CABI Publishing. 2003.

DE WIT, A. A. C.; CESAR, M. L. F.; KRUIP, T. A. M. Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus oocyte-complexes. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 8, p. 1800-1804, 2001.

ELROD, C. C.; VAN AMBURGH, M.; BUTLER, W. R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 702-706, 1993.

ELROD, C. C.; BUTLER, W. R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 694-701, 1993.

ELSAADAWY, S. A.; WU, Z.; BU, D. Feasibility of Supplying Ruminally Protected Lysine and Methionine to Periparturient Dairy Cows on the Efficiency of Subsequent Lactation. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 892709, 2022.

EVANS, E.; WOOD, B. Canola Meal as a Feed Ingredient for Lactating Dairy Cows. **Journal of Advances in Dairy Research**, v. 11, p. 625, 2023.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAOSTAT. 2024. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#compare>>. Acesso em: 02 jan. 2024.

FENG, R. *et al.* Progesterone regulates inflammation and receptivity of cells via the NF- κ B and LIF/STAT3 pathways. **Theriogenology**, v. 186, p. 50-59, 2022.

GARCIA-BOJALIL, C. M. *et al.* Protein degradability and calcium salts of long chain fatty acids in the diets of lactating dairy cows: reproductive responses. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1385-1395, 1998.

GÉRARD, N. *et al.* Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR). **Reproduction-Cambridge**, v. 124, n. 2, p. 241-248, 2002.

GILBERT, R. O. Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 4, p. 3754-3765, 2019.

GUINARD, J.; RULQUIN, H.; VÉRITÉ, R. Effect of graded levels of duodenal infusions of casein on mammary uptake in lactating cows. 1. Major nutrients. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 8, p. 2221-2231, 1994.

GUO, K. *et al.* Effects of milk urea nitrogen and other factors on probability of conception of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1878-1885, 2004.

GUPTA, S. K.; PRATAP, A. History, origin, and evolution. **Advances in Botanical Research**, v. 45, p. 1-20, 2007.

GUPTA, S. *et al.* Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 5, p. 673-680, 2011.

GONZALEZ-MALDONADO, J. *et al.* Antioxidant supplementation in female ruminants during the periconceptional period: A review. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 31, n. 4, p. 245-255, 2018.

GUERREIRO, T. M. *et al.* A metabolomic overview of follicular fluid in cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 10, 2018.

GROBNER, A. E. **Differential effects of bovine conceptus-derived signaling molecules on the uterine environment supporting embryo development while allowing maternal immune tolerance.** 2011. Tese de Doutorado. München, Technische Universität München.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; HOLYOAK, G. R. Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1-2, p. 23-30, 2000.

HEDQVIST, H.; UDÉN, P. Measurement of soluble protein degradation in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 1-2, p. 1-21, 2006.

HEIM, R.; KREBS, G. Utilisation of canola meal as protein source in dairy cow diets: a review. **Agriculture and Natural Resources**, v. 54, n. 6, p. 623–632-623–632, 2020.

HUHTANEN, P.; HETTA, M.; SWENSSON, C. Evaluation of canola meal as a protein supplement for dairy cows: A review and a meta-analysis. **Canadian Journal of Animal Science**, v.91, p.529-543, 2011.

- JAYASINGHE, N. *et al.* Ruminal degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in canola meal. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 566-567, 2014.
- JORDAN, E. R. *et al.* Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 9, p. 1854-1862, 1983.
- KALSCHEUR, F. K.; MOORE, E. A. S. **Canola Meal Versus Soybean Meal in Dairy Cow Diets**. Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop. 2017. Disponível em: <<https://www.canolacouncil.org/canolamazing/wordpress/wp-content/uploads/2019/04/kalscheur-canola-vs-soy-proceedings-Penn-2017.pdf>>.
- KEANE, J. A.; EALY, A. D. An overview of reactive oxygen species damage occurring during in vitro bovine oocyte and embryo development and the efficacy of antioxidant use to limit these adverse effects. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 330, 2024.
- KOWSAR, R. *et al.* Urea induces T helper 2 (Th2) type environment at transcriptional level and prostaglandin E2 secretion in bovine oviduct epithelial cells in culture. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5844-5850, 2016.
- KOWSAR, R. *et al.* Urea changes oocyte competence and gene expression in resultant bovine embryo in vitro. **Zygote**, v. 26, n. 3, p. 207-219, 2018.
- KHACHATOURIANS, G. G.; SUMNER, A. K.; PHILLIPS, P. W. B. An introduction to the history of canola and the scientific basis for innovation. In: **The biotechnology revolution in global agriculture: innovation, invention, and investment in the canola industry**. Wallingford UK: CABI. p. 33-47, 2001.
- KRISHER, R. **Oocyte physiology and development in domestic animals**. Wiley-Blackwell, 2013.
- LAGE, C. F. A. *et al.* Lactational performance, enteric gas emissions, and plasma amino acid profile of dairy cows fed diets with soybean or canola meals included on an equal protein basis. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 3052-3066, 2021.
- LAPIERRE, H.; LEMOSQUET, S.; OUELLET, D. R. Contribution of essential amino acids to glucose metabolism and lactose secretion in late lactation dairy cows. In: **Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production: 4 th International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition. Sacramento, California, USA. 2013**. p. 447-448.
- LEAN, I. J. *et al.* Effects of dietary crude protein on fertility: Meta-analysis and meta-regression. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, n. 1, p. 31-42, 2012.
- LEESE, H. J.; MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. Amino acids and the early mammalian embryo: Origin, fate, function and life-long legacy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 18, p. 9874, 2021.
- LEROY, J. L. M. R. *et al.* Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1131-1143, 2004.
- LEROY, J. L. M. R. *et al.* Reduced fertility in High-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I the importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in High-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 612-622, 2008.

LIU, T. *et al.* Dietary supplementation of leucine in pre-mating diet improves the within-litter birth weight uniformity, antioxidative capability, and immune function of primiparous SD rats. **BioMed Research International**, v. 2018.

LU, J. *et al.* A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p. 1-18, 2018.

MAESOOMI, S. M. *et al.* Canola meal as a substitute for cottonseed meal in diet of midlactation Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1673-1677, 2006.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

Registro nacional de cultivares. 2024. Disponível em:

<https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>.

Acesso em: 03 jan. 2024.

MARTINEAU, R.; OUELLET, D. R.; LAPIERRE, H. Feeding canola meal to dairy cows: A meta-analysis on lactational responses. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 3, p. 1701-1714, 2013.

MARTINEAU, R.; OUELLET, D. R.; LAPIERRE, H. The effect of feeding canola meal on concentrations of plasma amino acids. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1603-1610, 2014.

MARTIN, N. B.; NOGUEIRA JR, S. Canola: uma nova alternativa agrícola de inverno para o centro-sul brasileiro. **Informações Econômicas**. São Paulo, v. 23, n. 4, p. 9-25, 1993.

MAXIN, G.; OUELLET, D. R.; LAPIERRE, H. Effect of substitution of soybean meal by canola meal or distillers grains in dairy rations on amino acid and glucose availability. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.7806-7817, 2013.

MAWSON, R. *et al.* Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 1. Rapeseed production and chemistry of glucosinolates. **Die Nahrung**, v. 37, n. 2, p. 131-140, 1993.

MCNABB, W. C. *et al.* In-vitro rates of rumen proteolysis of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (rubisco) from lucerne leaves, and of ovalbumin, vicilin and sunflower albumin 8 storage proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 64, n. 1, p. 53-61, 1994.

NAJAFZADEH, V. *et al.* Bovine blastocyst development depends on threonine catabolism. **bioRxiv**, p. 397562, 2018.

NASEM - NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. 2021. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 8th rev. ed. National Academies Press, 2021.

NIE, H. T. *et al.* Amino acids profile within peripheral blood and follicular fluid based on high-performance liquid chromatography methods may explain differences in folliculogenesis between short-term under/over-fed treatments during luteal phase of Hu sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 1, p. 72-82, 2019.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle: 2001**. National Academies Press, 2001.

ORSI, N.; LEESE, H. J. Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts in vitro. **Reproduction**, v. 127, n. 1, p. 131-140, 2004.

ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **The Journal of Agricultural Science**, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

PAULA, E. M. *et al.* Effects of replacing soybean meal with canola meal differing in rumen-undegradable protein content on ruminal fermentation and gas production kinetics using 2 in vitro systems. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5281-5292, 2017.

PAULA, E. M. *et al.* Effects of replacing soybean meal with canola meal or treated canola meal on ruminal digestion, omasal nutrient flow, and performance in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.328-339, 2018.

PAULA, E. M. *et al.* Feeding canola, camelina, and carinata meals to ruminants. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 704, 2019.

PAULA, E. M.; BRODERICK, G. A.; FACIOLA, A. P. Effects of replacing soybean meal with canola meal for lactating dairy cows fed 3 different ratios of alfalfa to corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.103, p.1463-1471, 2020.

PRESTEGAARD-WILSON, J. M. *et al.* A survey of United States dairy cattle nutritionists' practices and perceptions of reducing crude protein in lactating dairy cow diets. **Applied Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 697-709, 2021.

PRZYBYLSKI, R.; MAG, T. **Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses: Canola/rapeseed oil**. Blackwell Publishing Ltd, Hoboken, 2002, pp. 98-127.

RABOISSON, D. *et al.* High urea and pregnancy or conception in dairy cows: A meta-analysis to define the appropriate urea threshold. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7581-7587, 2017.

RADFAR, M.; ROGIEWICZ, A.; SLOMINSKI, B. A. Chemical composition and nutritive value of canola-quality Brassica juncea meal for poultry and the effect of enzyme supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 225, p. 97-108, 2017.

DE MORI, C.; TOMM, G. O.; FERREIRA, P. E. P. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo (Embrapa Trigo. Documentos online, 149, 2014. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/988475/1/2014documentosonline149.pdf>>.

RAYMER, P. L. **Canola: an emerging oilseed crop. Trends in new crops and new uses**. (Eds J Janick, A Whipkey), 2002, pp. 122–126. (ASHS Press: Alexandria, VA).

READ, C. C. *et al.* Correlation between pre-ovulatory follicle diameter and follicular fluid metabolome profiles in lactating beef cows. **Metabolites**, v. 11, n. 9, p. 623, 2021.

REED, C. B. *et al.* The microenvironment of ovarian follicles in fertile dairy cows is associated with high oocyte quality. **Theriogenology**, v. 177, p. 195-205, 2022.

REZAEI, N.; CHIAN, R. Effects of essential and non-essential amino acids on in-vitro maturation, fertilization and development of immature bovine oocytes. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, v. 3, p. 36-41, 2005.

RODNEY, R. M. *et al.* Effects of nutrition on the fertility of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 5115-5133, 2018.

ROOKE, J. A. *et al.* Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 53-71, 2004.

ROOKE, J. A. *et al.* Dietary carbohydrates and amino acids influence oocyte quality in dairy heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 3, p. 419-427, 2009.

ROSENKRANS JR, C. F.; FIRST, N. L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 2, p. 434-437, 1994.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 88-97, 2008.

SANTOS, P. *et al.* Effects of plasma urea nitrogen levels on the bovine oocyte ability to develop after in vitro fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 5, p. 783-787, 2009.

SANCHEZ, J. M., CLAYPOOL, D. W. Canola meal as a protein supplement in dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.80-85, 1983.

SILVA, J. V. V. *et al.* Effects of branched-chain amino acids on glucose uptake and lactose synthesis rates in bovine mammary epithelial cells and lactating mammary tissue slices. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 2, p. 1717-1730, 2022.

SINCLAIR, K. D. *et al.* Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2670-2680, 2000.

SINCLAIR, K. D. *et al.* Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 16, n. 6, p. 859-868, 2008.

SINCLAIR, K. D. *et al.* Reducing dietary protein in dairy cow diets: Implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. **Animal**, v. 8, n. 2, p. 262-274, 2014.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 104-109, 2009.

SOUZA, V. C. *et al.* Assessing amino acid utilization in young Nellore steers fed high-concentrate diets with different sources and levels of nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, 114642, 2020.

SCHWAB, C. G.; SATTER, L. D.; CLAY, A. B. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 7, p. 1254-1270, 1976.

SCHWAB, C. G.; ORDWAY, R. S.; WHITEHOUSE, N. L. Amino acid balancing in the context of MP and RUP requirements. In: **Proc. Four-State Appl. Dairy Nutr. Manage. Conf., Lacrosse, WI. Midwest Plan Service, Iowa State University, Ames**. 2003. p. 25-34.

Schwab, C. G. The principles of balancing diets for amino acids and their impact on N utilization efficiency. In: **Proceedings of the 23rd Ruminant Nutrition Symposium. University of Florida, Gainesville, FL**. 2010. p. 1-15.

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

SCHINGOETHE, D. J. Balancing the amino acid needs of the dairy cow. **Animal Feed Science and Technology**, v. 60, n. 3-4, p. 153-160, 1996.

SLOMINSKI, B. A. Developments in the breeding of low fibre rapeseed/canola. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 6, n. 3, p. 303-318, 1997.

STANGAFERRO, M. L. *et al.* Effects of feeding rumen-protected methionine pre-and postpartum on reproductive outcomes of multiparous Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 10, p. 11210-11225, 2021.

TAMMINGA, S. The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negative energy balance and fertility in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3-4, p. 227-239, 2006.

TOLEDO, M. Z. *et al.* Effects of feeding rumen-protected methionine pre-and postpartum in multiparous Holstein cows: Health disorders and interactions with production and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 3, p. 2137-2152, 2023.

TOMM, G. O., *et al.* "Can canola be produced in tropical areas? (b)." In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS. **Proceedings... Prague: International Consultative research group on Rapeseed**. Prague, Czech Republic, 2011.

TOMM, G. O. *et al.* **Panorama atual e indicações para aumento de eficiência da produção de canola no Brasil**. Embrapa Trigo, Passo Fundo. Documentos Online, 118, 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/207071/1/CNPT-ID41945.pdf>>.

THATCHER, W.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R. Dietary manipulations to improve embryonic survival in cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1619-1631, 2011.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1-2, p. 1-27, 2007.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Oilseeds: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture, 2024. Disponível em: <https://fas.usda.gov/data/search?reports%5B0%5D=report_commodities%3A26&reports%5B1%5D=report_type%3A10259>. Acesso em: 02 jan. 2024.

WEISS, W. P. *et al.* Effect of including canola meal and supplemental iodine in diets of dairy cows on short-term changes in iodine concentrations in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4841-4849, 2015.

WESTWOOD, C. T. *et al.* Effects of genetic merit and varying dietary protein degradability on lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2926-2940, 2000.

WILTBANK, M. C. *et al.* Potential benefits of feeding methionine on reproductive efficiency of lactating dairy cows. **Four-State Dairy Nutrition and Management**, v.4, p.19-26, 2014.

WILTBANK, M. C. *et al.* Nutrition and reproductive efficiency: Transition period management, energy status, and amino acid supplementation alter reproduction in lactating dairy cows. In: **Proceedings of the 2015 Florida Ruminant Nutrition Symposium**. Gainesville, FL, USA: University of Florida IFAS Extension, 2015. p. 2-4.

WU, G. Amino acids in nutrition, health, and disease. **Frontiers in Bioscience Landmark**, v. 26, n. 12, p. 1386-1392, 2021.

YANG, H. *et al.* Effects of dietary lysine intake during lactation on blood metabolites, hormones, and reproductive performance in primiparous sows. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 4, p. 1001-1009, 2000.

YANG, Y. X. *et al.* Effects of lysine intake during late gestation and lactation on blood metabolites, hormones, milk composition and reproductive performance in primiparous and multiparous sows. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 3 4, p. 199-214, 2009.

ZHOU, Z. *et al.* Rumen-protected methionine compared with rumen-protected choline improves immunometabolic status in dairy cows during the peripartal period. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8956-8969, 2016.

SECOND PART - MANUSCRIPT

**This manuscript is formatted according to the Journal of Dairy Science
submission guidelines.**

INTERPRETIVE SUMMARY

Lactational performance, nitrogen metabolism and oocyte quality of crossbred dairy cows fed canola meal in replacement of soybean meal. *By Faria et al.* Canola meal can be a promising source among plant-derived protein coproducts for the diets of dairy cows. Canola meal can support similar DMI, and milk yield compared to soybean meal in the diet. Cows fed canola meal had greater rumination time while lying down and shorter meal duration. Canola meal did not affect plasma and follicular fluid metabolites, N partition, and oocyte quality. Canola meal decreased milk fat content associated with greater BW and decreased MUN, indicating that nitrogen use was optimized in low-yielding crossbred dairy cows.

RUNNING HEAD

CANOLA MEAL FOR DAIRY COWS

Lactational performance, nitrogen metabolism and oocyte quality of crossbred dairy cows fed canola meal in replacement of soybean meal

Letícia R. Faria¹, Débora R. Gomide², Júlia M. Batista¹, Clara E. M. Martins³, Stefânia P. Souza¹, Erick D. Batista¹, Marcos N. Pereira¹, Trevor J. DeVries⁴, Miller P. Palhão³, Renato R. Lima⁵ and Nadja G. Alves^{1*}

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37203-202, Brazil

²Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional Epamig Sul, São João Del Rei, MG 36301-360, Brazil

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37203-202, Brazil

⁴Department of Animal Biosciences of Guelph, University of Guelph, ON N1G 2W1, Canada

⁵Departamento de Estatística, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37203-202, Brazil

*Corresponding author: N. G. Alves. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 37203-202, Brazil. e-mail: nadja@ufla.br

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of replacing soybean meal with canola meal in isoproteic diets on lactational performance, nitrogen metabolism and oocyte quality of dairy cows. Thirty lactating crossbred Holstein × Gir cows (168 ± 66 DIM) were blocked by genetic composition ($\frac{3}{4}$ Holstein × $\frac{1}{4}$ Gir; $\frac{5}{8}$ Holstein × $\frac{3}{8}$ Gir; $\frac{7}{8}$ Holstein × $\frac{1}{8}$ Gir), parity (primiparous vs. multiparous ≥ 2 calvings), and milk yield in a randomized complete block design, and allocated to one of two treatments: (1) soybean meal diet (SBM; $n = 15$) and (2) canola meal diet (CM; $n = 15$) offered for eight wk. Nineteen cows (SBM: $n = 8$ and CM: $n = 11$) were submitted to two ovum pick-up sessions at 15-d interval for cumulus-oocyte complex and follicular fluid recovery. Milk yield (13.1 kg/d) and DMI (16.2 kg/d) did not differ ($P \geq 0.21$) between cows fed SBM or CM. The OM and NDF digestibilities were lower ($P \leq 0.02$) in cows fed CM than SBM. Fat content in milk was lower ($P = 0.03$) and total solids content in milk tended to be lower ($P = 0.06$) in cows fed CM than SBM. The MUN was lower ($P < 0.01$) in cows fed CM than SBM (13.1 vs. 16.3 mg/dL). The BW was greater (561 vs. 544 kg; $P = 0.01$) and BCS tended to be greater (3.1 vs. 3.0; $P = 0.10$) in cows fed CM than SBM. Meal frequency, rumination time while lying down and proportion of daily intake in the morning were greater in cows fed CM than in cows fed SBM ($P = 0.01$). Rumination time was lower in wk 8 than wk 4 and 6 in the cows fed SBM; and it was lower than

that of cows fed CM in wk 8 (treatment $\times$ wk, $P = 0.02$). The proportion of daily intake at night was lower in cows fed CM in wk 8 compared to wk 4 and 6; and it was lower for cows fed CM than SBM in wk 8 (treatment $\times$ wk, $P = 0.01$). Diets did not affect plasma and follicular fluid glucose and urea-N, N partition, microbial protein synthesis and fecal pH ($P \geq 0.12$). Urinary pH was lower in cows fed CM than SBM in wk 7 but did not differ between treatments in wk 3 and 5 (treatment $\times$ wk, $P < 0.01$). The numbers of total, viable and degenerated oocytes, the proportion of viable and degenerated oocytes, and glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities did not differ ($P \geq 0.20$) between treatments. CM in replacement of SBM in isoproteic diets fed to crossbred Holstein-Gir cows did not affect milk yield, DMI, N partition and oocyte quality, decreased milk fat content and milk urea-N, and increased BW of the cows.

Key words: byproduct, dietary protein, nitrogen, methionine, milk protein.

INTRODUCTION

Soybean meal (**SBM**) is the most used protein source in the diets of dairy cows (Huhtanen et al., 2011; Canola Council of Canada, 2019). This protein source has high ruminal degradability (NASEM, 2021) and does not provide an ideal supply of AA for dairy cows due to its low methionine content (Schwab, 2010). Therefore, the use of protein sources with higher RUP and an adequate AA profile is a nutritional strategy to supply metabolizable AA for the animal properly.

Canola meal (**CM**) has emerged as a promising source among plant-derived protein byproducts for diets of dairy cows. This is attributed to the increased availability of this feed, as well as improved performance and nitrogen utilization efficiency when used as a substitute for other common plant protein sources (Huhtanen et al., 2011; Martineau et al., 2013). Previous studies have reported similar or greater DMI, yield of

milk and milk components, and nitrogen utilization efficiency of dairy cows fed CM in replacement of soybean meal (Broderick et al., 2015; Paula et al., 2018). These results may be attributable to the greater MP supply from the RUP fraction (Maxin et al., 2013), and to the AA profile of CM, which closely resembles the AA profile of the milk (Evans and Wood, 2023).

Replacing SBM with CM in the diet may also benefit oocyte developmental competence. The CM may increase essential AA plasma concentration, mainly methionine, and reduce plasma urea-N (**PUN**) in dairy cows compared to SBM (Maxin et al., 2013; Martineau et al., 2014). The AA are components of the fluid present in the female reproductive tract and may benefit oocyte development (Sinclair et al., 2008; Read et al., 2021). Conversely, follicular and oocyte development may be negatively affected by high nitrogen concentration, which are considered toxic to both structures (Butler, 1998; Raboisson et al., 2017). Therefore, by promoting increased AA levels and reduced PUN, the use of CM as a substitute for SBM may contribute to improved oocyte quality of dairy cows. However, to the best of our knowledge, no studies have specifically evaluated the effect of replacing SBM with CM on oocyte quality. Given the increasing focus on optimizing nutrition for reproductive performance in dairy cows, this knowledge gap highlights the importance of this study. Investigating the impact of CM on oocyte quality is essential to better understand how dietary protein sources may affect reproduction in dairy cattle.

We hypothesized that feeding CM as a substitute for SBM as a protein source in the diet would improve lactational performance, nitrogen utilization efficiency, and oocyte quality in crossbred dairy cows. Therefore, the objectives of this study were to evaluate lactational performance, feeding behavior and rumination, utilization and partition of dietary nitrogen, and oocyte quality in crossbred dairy cows fed CM

replacing SBM. It is worth mentioning that low-producing dairy cows were used in this study to evaluate the effects of CM under conditions representative of animals with moderate nutritional demands, ensuring broader applicability of the results across production systems. This approach complements previous studies conducted on high-producing dairy cows, providing a more comprehensive understanding of the dietary impacts across different production levels.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the Experimental Farm Risoleta Neves owned by Minas Gerais Agricultural Research Corporation (EPAMIG) in São João Del Rei, MG, Brazil. Experimental procedures were approved by the Ethics Committee in Utilization of Animals of the Minas Gerais Agricultural Research Corporation (protocol number 001/2023).

Cows, Dietary Treatments and Experimental Design

Thirty crossbred Holstein-Gir cows (493 ± 51 kg BW, 11.7 ± 3.2 kg/d milk yield, 168 ± 66 DIM) were used in the experiment. Cows were blocked by genetic composition ($\frac{3}{4}$ Holstein $\times$ $\frac{1}{4}$ Gir; $\frac{5}{8}$ Holstein $\times$ $\frac{3}{8}$ Gir; $\frac{7}{8}$ Holstein $\times$ $\frac{1}{8}$ Gir), parity (10 primiparous and 20 multiparous ≥ 2 calvings), and milk yield in a randomized complete block design study and allocated to one of two treatments: (1) SBM diet ($n = 15$) and (2) CM diet ($n = 15$). Cows were fed a control diet for a 1-wk covariate period and then switched to the experimental diets for an 8-wk study. Chemical composition of the feeds is shown in Table 2. Experimental diets were fed as TMR with a forage-to-concentrate ratio of 70:30 and corn silage was the only forage source used in the diets (Table 3). These diets were formulated to maximize forage use (i.e., 0.95 forage NDF as a percentage of body weight), and reduce concentrate, due to the low milk yield of

the cows. Diets were formulated to be isoproteic with the same ingredients, varying only in the protein source (SBM or CM). The CM was obtained through solvent extraction (NUTRITEC Animal Nutrition; Lajeado, RS, Brazil). Diets were formulated to aim for a slightly positive balance of RDP (+8 and + 25 g/d for SBM and CM, respectively; NRC, 2001) to effectively demonstrate the effects of the protein source. Soyhulls were the only ingredient that varied in both diets. Soyhulls were used to maintain the same CP level in the diets. The other feed ingredients were kept at a constant concentration in the diets.

Diets were offered twice daily at 0700 h and 1400 h in equal amounts. The concentrate ingredients were mixed in a mixer (Usibras, Patrocínio, MG, Brazil) and then the concentrate was mixed manually with the corn silage in the feed bunks. Cows were housed in four pens (i.e., one pen with eight and another with seven cows per treatment) and had free access to water during the experiment. The feeding rate was adjusted to alloworts between 5 and 10% on an as-fed basis. Orts from each pen were collected and weighted daily around 0600 h. The daily Orts were $7.4 \pm 1.7\%$ of offered (mean $\pm$ SD). Samples of corn silage were collected weekly for DM determination with a microwave oven and the TMR was adjusted accordingly. The BW was measured on Wednesdays after the morning milking during the covariate period and in wk 2, 4, and 6 with an individual walk-over weigh scale (Valfran, Votuporanga, SP, Brazil). BW gain was calculated as the slope of the linear regression of BW over the wk of the experimental period. The BCS (1 to 5, thin to fat; Wildman et al., 1982) was the mean of two independent evaluators measured on the same day of BW measures.

Experimental Procedures and Sample Collections

Feed and Orts Samples

Corn silage samples were collected weekly. Concentrate feed samples were collected once during the entire experiment. Orts samples were collected daily. Immediately after collection, corn silage and Orts samples were frozen (-20°C). Orts samples were pooled weekly. Corn silage and Orts samples were dried at 55°C for 72 h and ground in a Wiley mill (Star FT 80, Fortinox - Indústria, Comércio e Serviços, Piracicaba, SP, Brazil) to pass through a 2-mm screen. After that, half of each ground sample was re-grounded to pass through a 1-mm screen. Concentrate feed samples were ground without undergoing a pre-drying process. The 2-mm samples were used for determination of undigested NDF (**uNDF₂₄₀**) content. After grinding, 2-mm samples were placed in nonwoven fabric bags (TNT; 100 g/m^2) with dimensions of $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ (Valente et al., 2011). Samples were placed in bags maintaining a ratio of 20 mg DM/cm^2 of surface (Nocek, 1988). Samples were incubated in the rumen of 2 cannulated Nellore heifers for 240 h (Valente et al., 2011). Nellore heifers ($614 \pm 4.2\text{ kg BW}$) were housed in individual pens with free access to water and fed once daily at 0700 h. Diets were fed as TMR with a forage-to-concentrate ratio of 60:40 and contained (DM basis) 60% corn silage, 15% ground corn, 20% distillers dried grains, 1% urea, 4% mineral-vitamin premix, and 14.1% CP. After removal of the rumen, bags were immediately immersed in ice water to stop microbial activity. After that, bags were washed and dried, and the NDF content was determined (Van Soest et al., 1991). The **uNDF₂₄₀** was measured as the residual NDF remaining in the bags (Valente et al., 2011).

The 1-mm samples were analyzed for DM (105°C for 24 h), ash (complete combustion in a muffle furnace at 600°C for 4 h) and NDF (Van Soest et al., 1991). Starch plus free glucose content was measured with α -amylase and amyloglucosidase followed by colorimetry for glucose, adapted from Hall et al. (2015). Total N was

analyzed by the DUMAS method using the Leco-FP 828 LC equipment (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA) and converted to CP using the factor of 6.25. Non-fibrous carbohydrates (**NFC**) were calculated as $\text{NFC} = 100 - \text{ash} - \text{ether extract} - \text{NDF} - (\text{CP} - 0.64 \times \text{CP equivalent from urea})$. The adjustment for supplemental nonprotein nitrogen was based on NASEM (2021).

Fecal Samples

Fecal samples were collected by spot technique directly from the rectum of cows twice a day, with an 8 h interval, over three consecutive days during wk 3, 5, and 7. A weekly composite sample was made for each cow. Fecal samples were dried, grounded and analyzed as previously described for feed and orts samples. One subsample from wet fecal samples was obtained for total N analysis by the DUMAS method and converted to CP using the factor of 6.25, and for pH determination (HANNA Instruments, Barueri, SP, Brazil). The pH was measured by diluting a wet fecal sample (10 g) with 100 mL of distilled water.

Nutrient Intake and Apparent Total-Tract Digestibility

Daily feed intake (kg/d) was calculated by determining the weight difference between the offered feed and the orts dividing by number of cows of each pen. The uNDF₂₄₀ contents in feeds, orts, and feces were used to estimate the fecal output of DM. Fecal output of DM (kg/d) was calculated for each pen by dividing uNDF₂₄₀ intake by uNDF₂₄₀ concentration in feces. The total tract apparent digestibility (%) of DM, OM, CP, NDF, starch, and NFC was calculated by dividing the amount of digested nutrients by the amount of nutrients intake.

Urine Samples

Urine samples were collected by spot technique twice a day, with an 8 h interval, over three consecutive days during wk 3, 5, and 7. Urine samples were filtered through voile fabric and the pH was measured immediately with a benchtop pH meter. After that, 60 mL of concentrated urine was frozen (-20°C) for the subsequent determination of total N concentration and creatinine. Another 15 mL was acidified immediately in 60 mL of 0.072 N sulfuric acid (H₂SO₄) and frozen (-20°C) for subsequent determination of purine derivatives (allantoin and uric acid) and urea. Total N was analyzed by the DUMAS method and converted to CP using the factor of 6.25. Creatinine, uric acid, and urea were analyzed with an automatic biochemistry analyzer (AmaMedical, Osasco, SP, Brazil) using colorimetric commercial kits (BIOCLIN, Belo Horizonte, MG, Brazil). Allantoin was determined by colorimetric method, according to Chen and Gomes (1992).

Urine volume was determined by considering individual BW and using a creatinine excretion rate of 29 mg/kg of BW (Valadares et al., 1999). Urine volume was used to compute the excretion of nitrogen, urea, allantoin, and uric acid. Total excretion of urinary N and urea (g/d), as well as of allantoin and uric acid (mmol/d), was calculated by multiplying urine volume by the corresponding N, urea, allantoin and uric acid concentrations. The purine derivatives (**PD**) excretion (mmol/d) was calculated as the sum of urinary allantoin and uric acid. The relative rumen microbial yield was estimated by the excretion (mmol/d) of PD in urine and by the purine derivative to creatinine ratio (Chizzotti et al., 2008). The efficiency of ruminal microbial growth was estimated as PD/DOMI (mmol/kg).

Milk Samples

Cows were milked twice daily (0700 and 1430 h) in a herringbone milking parlor. Milk yield was recorded daily throughout the experiment and the means of each cow

were used to compare treatments. Milk samples were collected daily in proportion to the yield from each milking over three consecutive days during wk 3, 5, and 7. Samples were stored in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol under refrigeration. The concentrations of fat, CP, casein, lactose, total solids, SCC, and MUN were analyzed by mid-infrared analysis in a commercial laboratory (Clínica do Leite, Piracicaba, SP, Brazil). Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated (NASEM, 2021): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The secretion of ECM (kg/d) was calculated as: Milk energy secretion / 0.70 (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose). Feed efficiencies were calculated as milk yield/DMI and ECM/DMI. Digestible OM intake (**DOMI**) was estimated and the ECM/DOMI ratio was calculated as a measure of energy usage efficiency.

Blood Samples

Blood samples were collected on Wednesdays during the covariate period and in wk 3, 5, and 7 from the jugular vein, approximately 4 h after the morning feeding. Samples were collected in tubes (BIOCON, Belo Horizonte, MG, Brazil) with sodium fluoride for glucose determination and EDTA for PUN and BHB determination. After sampling, tubes were centrifuged ($3,200 \times g$ for 15 min) and plasma was obtained and frozen (-20°C) until laboratory analysis. Glucose and urea were measured in an automatic biochemistry analyzer using colorimetric commercial kits (BIOCLIN, Belo Horizonte, MG, Brazil). The PUN was calculated by multiplying the urea concentration by 0.4667. Plasma BHB concentrations were measured by BHB enzymatic kinetics using the RANBUT D-3-Hydroxybutyrate kit (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, NI, UK). The kinetic enzymatic reaction has a sensitivity of 0.1 mmol/L. Briefly, 75 μL of plasma were added to each well, 300 μL of buffer mixed with enzyme/coenzyme was

incubated in a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) for 60 s at 37°C, and then the first reading was taken. Subsequent readings were taken after 1 and 2 min and mean absorbance change per minute was calculated. On the same day of follicular aspirations, blood samples were collected to determine glucose and urea, as previously described.

Nitrogen Metabolism

Wet fecal and urine samples were analyzed for total N by the DUMAS method. Milk CP content was analyzed by mid-infrared analysis. Milk CP secretion was calculated by multiplying the milk CP content by the daily milk production of each cow. Subsequently, the weekly average of milk CP secretion were calculated. Milk N secretion was calculated by dividing milk CP secretion per 6.34 (NASEM, 2021). The proportion of N intake (% of daily intake) and excretion (g/d) of fecal-N, urine-N, and milk-N were calculated.

Feeding Behavior and Rumination

Feeding behavior was monitored during the last day of wk 4, 6 and 8 by visual observation at 10-min intervals continuously for 24 h. The 10-minute intervals were chosen to provide a more effective analysis, given the number of cows and the difficulty in simultaneously monitoring all individuals allocated in paddocks. The shorter observation periods would have made it challenging to capture a reliable sample of behaviors. Activities were classified as ingestion, drinking, standing idleness, lying idleness, standing rumination, and lying rumination. Individual feeding observations were combined and separated into meals using a meal criterion calculated for each cow. Meal criteria (i.e. the minimum time interval between meals to be considered a new meal) were individually calculated for each cow according to DeVries et al. (2003).

Briefly, the intervals between two eating observations were $\log_{10}$ -transformed and the frequency of the intervals was fit in a normal distribution using a software package (MIX 3.1.3; MacDonald and Green, 1988). A mixture of two normal distributions was fitted and meal criteria was established.

Meal frequency (meals/d) is the number of different meals in a day and was calculated by counting the number of intervals that exceeded the meal criteria. Total meal time (min/d) is the total of eating time and was calculated by multiplying the number of eating observations per day by 10 min and adding all nonfeeding intervals that were shorter than the meal criteria of each cow. Meal duration (min/meal) is the duration of meals, and it was calculated as the total daily meal time divided by the meal frequency. The moment of the largest daily meal (min) was calculated by subtracting the time the cow began her largest meal from the time the morning diet was delivered. The duration of the largest meal (min) refers to the total time taken for the largest meal. First meal duration (min) refers to the total time taken for the first meal eaten by the cow. The total time spent chewing (min) was calculated by summing the total eating time and the total rumination time. The proportion of daily intake in the morning (0600 to 1200 h), afternoon (1200 to 1800 h), and night (1800 to 0600 h) were determined.

Ultrasound-Guided Transvaginal Follicular Aspiration

Nineteen cows (SBM: $n = 8$ and CM: $n = 11$) were selected for the follicular aspiration process to obtain cumulus-oocyte complexes (**COCs**) and follicular fluid. Dairy cows were selected based on their stage of pregnancy. Only cows with less than 4 months of gestation were aspirated (non-pregnant cows: SBM $n = 2$ and CM $n = 4$ and pregnant cows: SBM $n = 6$ and CM $n = 7$). Cows were submitted to two ovum pick-up (**OPU**) sessions at 15-d interval with the first OPU session conducted at the beginning of wk 8 of the study and the second OPU session at the end of wk 9. The

cows were fed experimental diets until the second aspiration session. All OPUs were performed by assisted ultrasonography (ultrasound Mindray®, model Z-50 VET) with a 7.5 MHz micro-convex probe, coupled with an aspiration guide and vacuum pump (WTA, Cravinhos, SP, Brazil). Briefly, cows received a local anesthesia injected epidurally between the last sacral and first caudal vertebrae, in the sacro-coccygeal space, using 3 to 5 mL of 2% lidocaine without a vasoconstrictor (Anestésico L, Pearson, São Paulo, SP, Brazil). Ovarian follicles between 3 and 8 mm were visualized and aspirated on a random day. The aspirated fluid was collected in plastic tubes (Falcon, Ciencor Scientific Ltda, São Paulo, SP, Brazil), containing Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline (**DMPBS**) solution (Biodux, Itapira, SP, Brazil) plus sodium heparin (Liquemine, Roche, São Paulo, SP, Brazil) and maintained at 37°C. The aspirated content was taken to the laboratory, filtered using an embryo collection filter (WTA, Cravinhos, SP, Brazil), and washed with DMPBS until the liquid became translucent, containing the recovered COCs. The fluid from the largest follicle present in the ovaries was collected in a microtube. After collection, the follicular fluid was centrifuged ($3,000 \times g$ for 15 minutes). The sediment was discarded, and the fluid was stored (-80°C) until laboratory analysis.

Oocyte Quality

COCs were evaluated and classified to determine oocyte quality under stereomicroscopy. The classification was based on the homogeneity of the cytoplasm and the number of compact layers of cumulus cells (Oliveira et al., 2014): grade 1 (more than three compact layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm), grade 2 (one to three layers of cumulus cells, homogeneous cytoplasm or subtle granulations), grade 3 (less than three layers of cumulus cells or partially denuded, irregular cytoplasm), and grade 4 (denuded and degenerated oocytes, expanded

cumulus cells and heterogeneous cytoplasm, with severe granulations). Subsequently, the total number of oocytes, the number of viable oocytes (grades 1 and 2), and the number of degenerated oocytes (grade 4) were determined. The proportion of viable oocytes was calculated by dividing the number of viable oocytes by the total number of oocytes. Similarly, the proportion of degenerated oocytes was determined by dividing the number of degenerated oocytes by the total number of oocytes.

Follicular Fluid Analyses

The activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase was quantified in follicular fluid by enzymatic colorimetric assay. Catalase activity was measured through the decomposition of hydrogen peroxide at 240 nm (Aebi, 1984). Superoxide dismutase activity was quantified based on the oxidation of pyrogallol at 570 nm (Madesh and Balasubramanian, 1997). Glutathione peroxidase activity was measured by evaluating the oxidation rate of NADP in the presence of hydrogen peroxide, reduced glutathione, and glutathione reductase at 240 nm (Gunzler et al., 1984). Bradford method (Bradford, 1976) was performed to determine the protein concentration of the samples and normalize the results. The readings were taken using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Enzyme activities were expressed as units per milligram of protein (U per mg of protein) per mL of follicular fluid. Glucose and urea concentrations in follicular fluid were measured in an automatic biochemistry analyzer using colorimetric commercial kits (BIOCLIN, Belo Horizonte, MG, Brazil). Follicular fluid urea-N was calculated by multiplying the urea concentration by 0.4667.

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using SAS software (version 9.4, SAS University Edition, Cary, USA). All variables related to DMI (intake and apparent total-tract digestibility of nutrients, feed efficiencies, N intake, milk protein N, urinary and fecal N as a proportion of intake, ECM/DOMI and PD/DOMI ratio) were analyzed considering the pen as the experimental unit, because DMI was measured by pen. The remaining variables were analyzed considering the cow as the experimental unit, as they were collected individually from each animal. The model for milk yield, yields and contents of fat, protein, lactose, casein, total solids and MUN had a DIM and the measure of the same variable at the end of the covariate period as a covariate effect. The model for BW and blood metabolites had a measure of same variable at the end of the covariate period.

Before analyses, all data were tested for normality of residuals with the Shapiro-Wilk test, using the UNIVARIATE procedure. Data with a normal distribution (intake of NDF and starch, mean apparent total-tract digestibility of DM, OM, NDF, CP and non-NDF OM, feed efficiencies, ECM/DOMI, contents of fat, casein, lactose and total solids contents, milk yields of fat, protein, lactose, casein, and total solids, MUN, linear SCC, BW, feeding behavior and rumination data, partition of N intake into milk, urine and feces, N intake, milk protein N, urine and fecal N, PD/DOMI, fecal pH, PUN throughout the experiment, glucose and urea-N in plasma during the follicular aspiration for OPU sessions, and follicular fluid urea-N) were analyzed as repeated measures using the MIXED procedure. Non-normally distributed data (intake of DM, OM and CP, mean apparent total-tract digestibility of starch, milk yield, ECM, protein content in milk, BW gain, BCS, urinary excretion of allantoin, uric acid, measures of relative rumen microbial yield, total urine volume, urinary urea N, urinary urea N as % of total urinary N, urinary pH, glucose and BHB plasma concentrations throughout the experiment,

and follicular fluid glucose) were analyzed as repeated measures using the GLIMMIX procedure, fitting a Gamma distribution and the logarithmic link function. The model included the random effect of block (1-15) and pen (1-4), and the fixed effects of treatment (SBM or CM), wk (1-8), and the interaction between treatment and wk (**T × W**). Cow within treatment was the subject in the repeated statement. The best covariance structure was chosen based on the lowest value for the Akaike's Information Criterion. Covariance structures tested were first order autoregressive, compound symmetry, and unstructured.

The model used for BW gain had only the random effect of block (1-15) and pen (1-4), and fixed effect of treatment (SBM or CM). The model used for oocyte quality, activity of antioxidant enzymes, and plasma and follicular fluid metabolites in OPU sessions had only the random effect of cow (1-19) and OPU (first or second), and the fixed effect of treatment (SBM or CM). The number of total, viable, and degenerated oocytes was analyzed using GLIMMIX procedure, fitting a Poisson distribution and the logarithmic link function. The proportion of viable and degenerated oocytes was analyzed using GLIMMIX procedure, fitting a Binomial distribution and the logarithmic link function. Correlation was analyzed for MUN mean during the experiment, and follicular fluid urea-N mean at the day of OPU sessions using the CORR procedure. Statistical significance was declared at $P \leq 0.05$ and tendency at $P \leq 0.10$. A Tukey test was used for multiple comparisons when there was a significant effect of wk or interaction between treatment and wk.

RESULTS

Treatment Diets

The MP requirement and supply predicted by NASEM (2021) were greater for the CM than SBM diet, resulting in a lower MP balance for CM diet (Table 4). The NE_L

requirement and balance, the NEL-allowable milk, and milk true protein predicted by NASEM (2021) were greater for the CM diet than the SBM diet (Table 4). Duodenal metabolizable AA flows, net AA utilization and target and predicted metabolizable AA efficiencies from dietary treatments were estimated by NASEM (2021) model using measured DMI, milk yield, milk composition, BW, BW gain, BCS, and feed composition (Table 5). Duodenal metabolizable flows of leucine, lysine, methionine, threonine and valine were greater in cows fed CM than the SBM diet. The net utilization of leucine was greater in CM than the SBM diet. The predicted metabolizable efficiency from all AA were above the target values for SBM and CM diets.

Nutrient Intake and Apparent Total-Tract Digestibility

Intake and apparent total-tract digestibility of nutrients are reported in Table 6. DMI did not differ ($P = 0.27$) between cows fed SBM or CM diets. The same response was observed for intake of OM, CP, NDF, non-NDF OM and starch ($P \geq 0.21$). The intake of NDF ($1.5 \pm 0.05\%$) and FNDF as a proportion of BW ($1.3 \pm 0.05\%$) did not differ ($P \geq 0.26$) between cows fed SBM or CM diets. The DMI and OM, CP, NDF, non-NDF OM and starch intakes differ over time ($P \leq 0.04$), but there was no $T \times W$ effect ($P \geq 0.99$).

Mean apparent total-tract digestibility of OM and NDF were greater for cows fed SBM ($P \leq 0.02$), while DM, CP, non-NDF OM and starch digestibilities did not differ between treatments ($P \geq 0.12$). Mean apparent total-tract digestibility of NDF of cows fed CM was lower compared to cows fed SBM diet on wk 3 (46.0 vs. 49.4%) and 7 (34.2 vs. 36.1%) but did not differ on wk 5 (43.3 vs. 44.3%; $P < 0.01$ for $T \times W$; Figure 2). Mean apparent total-tract digestibility of nutrients, except of CP and starch digestibilities, differ over time ($P \leq 0.01$). There were no $T \times W$ effect ($P \geq 0.54$) for mean apparent total-tract digestibility of dietary constituents.

416 ***Lactation Performance***

417 Lactation performance is reported in Table 7. Milk yield, ECM and feed
 418 efficiencies did not differ ($P \geq 0.48$) between cows fed SBM or CM diets. Fat content in
 419 milk of cows fed CM was lower ($P = 0.03$) to that of cows fed SBM diet. Protein and
 420 casein contents did not differ between the treatments ($P \geq 0.35$). Milk lactose content
 421 of cows fed CM diet tended to be greater compared to cows fed SBM diet on wk 5
 422 (4.20 vs. 4.04%), but did not differ between wk 3 (4.17 vs. 4.17%) and 7 (4.27 vs.
 423 4.19%; $P = 0.10$ for $T \times W$; Figure 3A). Milk total solids content of cows fed CM tended
 424 to be lower ($P = 0.06$) than in cows fed SBM diet. Milk yields of fat, protein, lactose,
 425 casein, and total solids did not differ between the treatments ($P \geq 0.19$). The MUN of
 426 cows fed SBM diet was greater in wk 5 (17.22 ± 0.53 mg/dL), compared to wk 3 (16.04
 427 ± 0.51 mg/dL) and 7 (15.99 ± 0.57 mg/dL), but MUN of cows fed CM diet was lower in
 428 wk 5 (12.26 ± 0.53 mg/dL) compared to wk 3 (13.19 ± 0.57 mg/dL), and 7 (13.45 ± 0.51
 429 mg/dL; $P < 0.01$ for $T \times W$; Figure 3B). Linear SCC of cows fed CM diet did not differ
 430 among wk. Otherwise, cows fed SBM diet had increased linear SCC in wk 5 ($4.92 \pm$
 431 0.23) compared to wk 3 (3.78 ± 0.23), but both did not differ to wk 7 (4.32 ± 0.23 ; $P =$
 432 0.01 for $T \times W$; Figure 3C). The BW was greater ($P = 0.01$), and BCS tended to be
 433 greater ($P = 0.10$) in cows fed CM diet than SBM diet. A time effect was observed (P
 434 ≤ 0.01), except for milk yields of protein, lactose, casein, and MUN ($P \geq 0.09$). There
 435 was no $T \times W$ ($P \geq 0.26$) for yields of milk and ECM, feed efficiency, contents and yields
 436 of fat, protein, casein, total solids, casein yield, BCS, and BW.

437 ***Feeding Behavior and Rumination***

438 Feeding behavior and rumination are reported in Table 8. Cows fed CM had
 439 greater ($P = 0.01$) meal frequency, but shorter ($P = 0.01$) meal duration than cows fed
 440 SBM diet. No differences were observed in meal time, largest meal moment, largest

meal duration, first meal duration, eating time, and chewing time between treatments ($P \geq 0.16$). Rumination time of cows fed SBM diet in wk 8 (367 ± 29.4 min/d) was lower compared to wk 4 (474 ± 29.1 min/d) and 6 (448 ± 29.1 min/d). In cows fed CM diet, rumination time did not differ between wk ($T \times W$; $P = 0.02$; Figure 4A). Rumination time while lying down was greater in cows fed CM compared to cows fed SBM diet ($P < 0.01$). Rumination time while standing did not differ between treatments ($P = 0.14$). The proportion of daily intake in the morning was greater in cows fed CM compared to cows fed SBM diet ($P = 0.05$). The proportion of daily intake in the afternoon did not differ between treatments ($P = 0.97$). The proportion of daily intake at night was lower in cows fed CM diet in wk 8 (14.5%) compared to wk 4 (24.0%) and 6 (24.5%), and it was lower in cows fed CM than SBM diet in wk 8 (23.7%; $P = 0.01$ for $T \times W$; Figure 4B). A time effect was observed ($P \leq 0.04$) on meal frequency, meal time, eating, rumination and chewing time, rumination while standing and proportion of daily intake in the morning and night. There was no $T \times W$ ($P \geq 0.13$) for meal frequency, meal duration, meal time, largest meal moment, largest meal duration, first meal duration, eating time, chewing time, standing and lying rumination, or proportion of daily intake in the morning and afternoon.

Blood and Follicular Fluid Metabolites

The PUN, plasma glucose and BHB concentrations throughout the experiment are reported in Table 9. These blood metabolites did not differ ($P \geq 0.13$) between treatments. Nonetheless, PUN concentration was greater ($P = 0.02$) in wk 5 (18.0 ± 0.20 mg/dL) compared to wk 7 (17.4 ± 0.22 mg/dL), but both did not differ from wk 3 (17.6 ± 0.29 mg/dL). No time effect was observed for plasma glucose and BHB concentrations ($P \geq 0.56$). There was no $T \times W$ ($P \geq 0.30$) for any of the metabolites evaluated. Glucose and urea-N in plasma and follicular fluid at the day of OPU

sessions are reported in Table 10. Glucose and urea-N in plasma and follicular fluid did not differ ($P \geq 0.39$) between cows fed SBM or CM diets. There was no correlation between MUN and follicular fluid urea-N ($r^2 = 0.22$; $P = 0.24$; Figure 5).

Nitrogen partition, Microbial Protein Synthesis, and pH

The partition of N intake into milk, urine and feces, purine derivatives, microbial protein synthesis, and fecal and urine pH are reported in Table 11. The N intake, milk protein N (g/d), and urine and fecal N (g/d) did not differ ($P \geq 0.29$) between cows fed SBM or CM diets. The partition on N intake into milk, urine and feces did not differ between treatments ($P \geq 0.37$). Total urine volume, urinary urea N, urinary urea N as % of total urinary N, urinary excretion of allantoin, uric acid, measures of relative rumen microbial yield and PD/DOMI did not differ between treatments ($P \geq 0.12$). Fecal pH did not differ ($P = 0.38$) between cows fed SBM or CM diet. Urinary pH of cows fed CM was lower than of cows fed SBM diet on wk 7 (7.3 ± 0.06 vs. 7.9 ± 0.07), but did not differ in wk 3 (8.1 ± 0.07 vs. 8.2 ± 0.07) and 5 (8.2 ± 0.07 vs. 8.3 ± 0.07 ; $P < 0.01$ for $T \times W$; Figure 6). There was no $T \times W$ ($P \geq 0.37$) for the other parameters evaluated. Time effects were observed ($P \leq 0.03$) for N intake, milk protein N as % of N intake, total urine volume, fecal N excretion, fecal N excretion as % of intake, relative microbial yield measured as PD/creatinine multiplied by BW and $BW^{0.75}$, and fecal pH.

Oocyte Quality and Activity of Antioxidant Enzymes

Oocyte quality and activity of antioxidant enzymes in follicular fluid are reported in Table 12. The numbers of total oocytes, viable oocytes, and degenerated oocytes, the proportion of viable and degenerated oocytes and glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities in follicular fluid did not differ ($P \geq 0.20$) between cows fed SBM or CM diets.

DISCUSSION

Composition of feed ingredients used in TMR is within the values reported by NASEM (2021). Crude protein content (% of DM) was $51.2 \pm 0.51\%$ for SBM, and $42.9 \pm 3.21\%$ for CM. NASEM (2021) reports values of $52.6 \pm 1.69\%$ for SBM and $41.5 \pm 1.55\%$ for CM. As expected, CM had more NDF (39.5% of DM) than SBM (26.0% of DM), which resulted in NDF content slightly higher in the CM diet. This difference was 0.3 percentage units, and it has also been observed in other studies that replaced SBM with CM in the diet (Paula et al., 2018; Paula et al., 2020). In our study, soyhulls were used to maintain the same CP concentration in the diets. The dietary content of soyhulls was greater in the SBM diet (6.4% of DM) than in the CM diet (3.1% of DM). This difference is due to the higher CP content of SBM than CM. Urea was added in equal amounts (0.7% of DM) to the diets to ensure a positive RDP balance. The other feed ingredients were kept at a constant concentration in the diet. Thus, the slight changes in the chemical composition of the diets were attributed to the varying chemical compositions of soyhulls, SBM and CM.

The CM diet had a lower predicted MP balance than the SBM diet. This can be attributed to the higher MP requirement for milk production in cows fed CM diet, which was 0.9 kg above of the cows fed SBM. Consequently, the MP balance was lower in the CM diet, because more MP was used for milk production. The MP and NE_G requirements was greater for cows fed CM diet, according to BW gain, BW and BCS. The proportion of nutrients deposited for BW is not negligible compared to that excreted in milk in the low-production cows, unlike in high-production cows, where nutrient allocation primarily favors milk synthesis. Cows fed CM directed more nutrients for gain than cows fed SBM, likely due to the increased duodenal metabolizable flux and net utilization of valine, leucine, and threonine, which are essential AA

predominantly found in skeletal muscle of dairy cows (Meijer et al., 1994). Moreover, branched-chain AA can stimulate skeletal muscle protein synthesis through the activation of the mTOR pathway (Neinast et al., 2019).

Apparent total-tract digestibilities of OM and NDF for the CM diet was 2.2 and 2.1% units lower than that for the SBM diet, respectively. The main source of fiber in both diets was corn silage, and their dietary inclusion was kept constant across diets, whereas the percentage of soyhulls was greater in CM diet. The proportion of NDF from soyhulls relative to the NDF from protein source (canola meal or soybean meal) was lower in CM diet than the SBM diet. Soyhulls contain highly digestible fiber compared to canola meal or soybean meal. Therefore, the decrease in the NDF digestibility in the CM diet may be associated with the higher proportion of NDF intake from canola meal. In the present study, the potentially degradable NDF (i.e. NDF minus uNDF₂₄₀ for each feed) was 22.8% for CM, 25.1% for SBM and 67.8% for soyhulls (data not shown). The decrease in OM digestibility may be explained by the lower digestibility of NDF, which is a substantial component of OM.

The DMI of our study is in accordance with the other studies (Weiss et al., 2015; Paula et al., 2018; Paula et al., 2020), with no difference in DMI between cows fed CM or SBM diet. Despite the lower degradability of OM and NDF, DMI was not affected in cows fed CM diet. The lower NDF digestibility in cows fed CM diet was influenced by the lower proportion of soyhulls relative to the protein source in this treatment, as discussed earlier. Neutral detergent fiber from nonforage fiber sources, such as soyhulls, did not affect DMI (Armentano and Pereira, 1997). Therefore, even with reduced NDF digestibility, the CM diet did not affect DMI. Huhtanen et al. (2011) proposed one theory to explain the increased milk yield in cows fed CM, suggesting that this increase in milk yield “pulls” DMI to meet the energy and protein demands of

the mammary gland, a phenomenon known as the “pull effect”. In a meta-analysis, Martineau et al. (2014) concluded that cows fed CM have higher plasma concentrations of essential AA, methionine, and branched-chain AA compared to other protein sources. Methionine and branched-chain AA are nutrients capable of stimulating the mTOR pathway (Coleman et al., 2020), which regulates protein synthesis and cell proliferation (Neinast et al., 2019). Therefore, beyond the theory proposed by Huhtanen et al. (2011), we speculate that, through the activation of the mTOR pathway, the CM may also stimulate milk yield. Milk yield in our study, as well as DMI, is in accordance with other studies (Maxin et al., 2013; Weiss et al., 2015; Paula et al., 2018), reported no difference between cows fed CM or SBM diet. Feed efficiencies did not differ between treatments, because of similar DMI and milk yield.

The CM diet decreased milk fat content compared to the SBM diet. This response may be associated with the higher MP supply from the CM diet. Glucogenic substrates primarily originate from degraded starch or gluconeogenesis. Therefore, since both diets had the same starch content and the apparent total-tract digestibility did not differ between treatments, the higher MP supply may have contributed to an increase in glucogenic AA, mainly valine and leucine, which increased duodenal metabolizable flux and net utilization, as predicted by NASEM (2021). According to van Knegsel et al. (2007), glucogenic nutrients can stimulate body fat deposition and the partitioning of metabolizable energy into body tissue. The stimulation of body fat deposition and the partitioning of metabolizable energy into body tissue may be associated with higher insulin secretion, due to the lipogenic effect of insulin (Bauman and Currie, 1980), and insulin signaling in subcutaneous adipose tissue (Liang et al., 2021). Insulin secretion may be stimulated by leucine (Neinast et al., 2019). Thus, we hypothesized that the decrease in milk fat content and the increase in BW and BCS,

in cows fed CM diet might be associated with this mechanism. Benchaar et al. (2021) also found a decrease in milk fat content, associated with a tendency for increased BW gain in cows fed CM compared to SBM diet. Milk lactose content tended to be greater in cows fed CM compared to SBM diet in wk 5 due to greater milk yield in this wk compared to wk 3 and 7. Lactose percentage is directly associated with the increase in milk yield, due to osmotic pressure generated by lactose synthesis that influxes water resulting in a greater volume of milk being produced (Costa et al., 2019). Milk fat yield was unaffected by the CM diet, suggesting that greater volume of milk may have caused a dilution effect and contributed to the observed difference in milk fat content. The elevated milk fat and protein contents observed in cows in our study can be attributed to their low milk yield, due to inverse relationship between milk yield and content of these components. Protein and casein contents in the milk of cows fed CM or SBM diet were similar. Milk true protein production estimated by the NASEM (2021) was 690 g/d for SBM diet and 720 g/d for CM diet. The estimate was higher than the actual yield (420 vs. 460 g/d), probably because both diets provided AA in excess, and the mammary gland utilized these AA with lower efficiency. Additionally, the low genetic potential for milk production of the cows in our study may have contributed to the discrepancy observed between the estimated and actual milk protein yield. The tendency for lower milk TS content in cows fed CM diet compared to cows fed SBM diet is explained by the lower milk fat content in those cows. However, this decrease was not sufficient to alter milk TS yield.

Milk urea-N concentration was 24% lower in cows fed CM diet compared to those fed SBM diet. This result is consistent with other studies (Paula et al., 2018; Paula et al., 2020; Benchaar et al., 2021), in which lower MUN concentration in cows fed CM diet as a replacement for SBM diet was reported. The lower MUN concentration

in cows fed CM diet may be related to better utilization of metabolizable AA in body tissue metabolism. Probably, these AA were directed toward BW gain rather than gluconeogenesis or catabolism, as suggested by the BW observed in our study.

To our knowledge, no previous studies reported the effect of feeding cows with CM in replacement to SBM on feeding behavior and rumination. Cows fed a CM diet had similar eating time and greater meal frequency, which resulted in shorter meal duration. We speculate that the higher meal frequency in these cows was driven by the regulatory effects on DMI, potentially due to oxidative metabolism in the liver from oxidizable carbons derived from AA catabolism (Oba and Allen, 2003). This fact may have increased the net ATP production by the liver, which is capable of suppress DMI (Allen, 2000; Allen, 2020). Rumination time is highly correlated with intake of NDF rather than NDF content of the diet (Beauchemin, 2018). In our study, rumination time did not differ between treatments, in accordance with similar intakes of NDF and FNDF as a proportion of BW. Although DMI was similar, CM diet had a significant effect on the proportion of daily intake in the morning. Cows fed SBM diet did not exhibit better AA utilization in body tissue metabolism, as suggested by the BW and MUN values. Probably, in these cows, the AA were directed toward gluconeogenesis and catabolism. An increase in the supply of AA per se does not guarantee positive responses in N efficiency. When the supply of MP does not provide a desirable AA profile for the animal, AA catabolism and N excretion increases, and N efficiency is not improved (Schwab et al., 2003; Arriola Apelo et al., 2014). The SBM does not meet the ideal AA profile for dairy cows, as it is low in methionine (Schwab, 2010). In contrast, CM is the plant-origin protein source whose AA profile closely resembles that of milk (Evans and Wood, 2023). Amino acids can be oxidized in the Krebs cycle, and glucogenic AA are anaplerotic (i.e., can stimulate the oxidation of Acetyl-CoA) and

decrease DMI (Allen, 2020). Given that, the proportion of daily intake was greater in the morning, cows fed SBM diet likely had higher N intake in this period, which may have contributed to the increased oxidation of AA to Acetyl-CoA, resulting in a lower proportion of daily intake in the morning.

Our results for urinary N and urea N (% of total urinary N) and fecal N (% of total N intake) are in accordance with other studies (Paula et al., 2018; Paula et al., 2020) in which no difference was observed between cows fed CM or SBM diet. The lack of difference in these variables between the diets was consistent with similar values of N intake, milk protein N, and urinary and fecal N excretion (g/d). Although we did not observe an effect of CM diet on these parameters, MUN concentration was lower, suggesting a more efficient N metabolism for cows fed CM diet. The improved N utilization in these cows may be associated with greater utilization in body tissue metabolism, as discussed earlier.

Nitrogen efficiency in dairy cows can range from 20 to 45% (Aguirre-Villegas et al., 2017). Nitrogen efficiency in our study was low, which may be due to the low milk production of the cows and the stage of lactation (i.e. mide lactation). Likewise, Hristov et al. (2004) reported N efficiency of 18% and 16% in Holstein cows in late lactation, producing 22.7 and 23.2 kg of milk, respectively, when fed diets with 15.8% and 18.3% CP, containing either adequate or high levels of RDP. Due to the lower N efficiency, N excretion via urine and feces was high, like that occurred in our study. According to the authors, dairy cows in late lactation consuming diets with excess CP or RDP had decreased N efficiency and a large loss of N in urine. Possibly, CP content in diets of our study was high, which may have also contributed to the reduction in N efficiency, since there is a negative relationship between CP content of the diet and N efficiency (Huhtanen and Hristov, 2009). Urinary excretion of allantoin, uric acid, rumen microbial

yield and efficiency of ruminal microbial growth were similar between treatments. Similarly, other authors (Brito and Broderick, 2007; Paula et al., 2018) reported no difference in these parameters between cows fed CM or SBM diet. This result indicates that the provision of RDP in the CM diet was sufficient to support microbial protein synthesis. Moreover, cows in both treatments had similar N and OM intakes. Microbial protein synthesis and OM intake are positively related (Clark et al., 1992). Therefore, this result suggests that CM did not alter ruminal N metabolism, supporting the findings of Maxin et al. (2013), who reported that changes in AA supply are primarily explained by differences in RUP fractions rather than effects on microbial protein synthesis. The decrease in urinary pH of cows fed CM diet may be attributed to more sulfur content in CM than the SBM (NASEM, 2021).

Glucose demand in lactating cows comes from approximately 28% of the total glucose supply from absorbed glucose, 67% from gluconeogenesis, and 5% from other sources (Huntington, 1997). In both diets, cows had similar intake and digestibility of starch, which may explain the similarity in glucose concentrations. In cows fed CM diet, we suppose that the lower MUN concentration could be related to better utilization of metabolizable AA in body tissue metabolism, suggesting that these animals may have directed AA toward BW gain rather than gluconeogenesis or catabolism. In contrast, cows fed SBM diet may have directed AA towards gluconeogenesis and catabolism, as indicated by BW and MUN values. Although not statistically significant, lower glucose concentrations in cows fed CM diet provide support for this idea. Glucose concentrations in follicular fluid were consistently less than those in plasma in cows fed both diets. This might be occurred because glucose is the primary energy source for oocyte development and cumulus cells facilitate glucose uptake by the oocyte (Krisher, 2013). The similar values in BHB concentration in cows fed CM or SBM diet

indicates that there was no fat mobilization, as cows gained BW throughout the experiment.

To our knowledge, no previous studies reported the effect of feeding cows with CM in replacement of SBM on the oocyte quality of dairy cows. The CM may increase essential AA plasma concentration, mainly methionine, and reduce PUN and MUN in dairy cows when compared to SBM (Maxin et al., 2013; Martineau et al., 2014). Nonetheless, in our study, it was observed lower PUN ($P = 0.13$) and MUN in cows fed CM diet. Furthermore, despite the MUN was lower in cows fed CM diet, there was no correlation between MUN and follicular fluid urea-N. Sinclair et al. (2008) observed that AA concentration in follicular fluid is positively related to oocyte quality grade, with methionine and leucine showing the strongest associations. In our study, we hypothesized that the higher Met content from CM, could improve oocyte quality. The duodenal metabolizable Met flow was 8.8% greater in cows fed CM than in SBM diet. Despite the higher duodenal flow of metabolizable Met, oocyte quality was not improved, which may be attributed to the fact that the amount of Met provided was already sufficient to support oocyte quality in both treatments. Oocytes that develop within follicular fluid with better antioxidant capacity may be of better quality, which can increase fertilization rates (Gupta et al., 2011). Amino acids are substrates to produce antioxidant enzymes (Coleman et al., 2020). In our study, we hypothesized that the higher Met content from CM diet would increase antioxidant enzyme activity, which could increase radical-scavenging activity and, consequently, oocyte quality. However, antioxidant enzyme activity in the follicular fluid was similar between treatments, likely due to an excess of AA provided by the SBM diet. The threshold value of PUN and MUN considered harmful to oocyte development is 19 mg/dL (Butler, 1998; Raboisson et al., 2017). In our study, PUN, MUN, and follicular fluid urea-N remained below 19

mg/dL. Therefore, the amount of AA provided, urea-N values below 19 mg/dL in plasma, milk and follicular fluid, and activity of antioxidant enzymes may explain the similarity in oocyte quality between cows fed the CM or SBM diets. Based on the findings of the present study, we suggest future research to further elucidate the role of CM in improving oocyte quality.

CONCLUSIONS

In conclusion, our results indicate that canola meal can support similar DMI, and milk yield compared to soybean meal in the diet. Canola meal diet decreased OM and NDF digestibility, MUN, and urinary pH. Cows fed canola meal diet had greater meal frequency, shorter meal duration, rumination time while lying down and proportion of daily intake in the morning. Diets did not affect plasma glucose, urea-N and BHB, and follicular fluid glucose and urea-N, as well as N intake, milk protein N, microbial yield, nitrogen excretion in urine and feces, antioxidant enzyme activity in the follicular fluid and oocyte quality. However, the decrease in milk fat content associated with greater BW and decreased MUN in low-yielding crossbred dairy cows, requires further consideration and indicates that nitrogen use was optimized in these cows.

NOTES

The authors are grateful to the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG) and the Federal University of São João Del Rei (UFSJ) for providing access to animals, research facilities, and staff necessary for this study. The authors thank the Federal University of Lavras (UFLA) for providing necessary infrastructure for laboratory analyses, and Brazilian Federal Foundation for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for the scholarship. The authors are grateful the Group of Studies in Nutrition and Reproduction of Ruminants (NUTRAN, UFLA) for helping in laboratory analysis. The authors are grateful to the NUTRITEC Animal Nutrition

(Lajeado, RS, Brazil) for providing the canola meal and soyhulls used in the diets. The authors are grateful to the laboratory Clínica do Leite (Piracicaba, SP, Brazil) for the milk analysis. The authors are grateful to the BIOCLIN company (Belo Horizonte, MG, Brazil) for the donation of colorimetric commercial kits, and the BIOCON company (Belo Horizonte, MG, Brazil) for the donation of all materials necessary for blood collections. The use of cows and all experimental procedures were approved by Ethics Committee in Utilization of Animals of the Minas Gerais Agricultural Research Corporation (protocol number 001/2023). This study received no external funding. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Pages 121-126 in *Methods in Enzymology - Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press, Cambridge.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1598–1624.
[https://doi.org/10.3168/jds.S00220302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S00220302(00)75030-2).
- Allen, M. S. 2020. Review: Control of feed intake by hepatic oxidation in ruminant animals: Integration of homeostasis and homeorhesis. *Animal*. 14:S55-S64.
<https://doi.org/10.1017/S1751731119003215>.
- Armentano, L., and M. Pereira. 1997. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trials. *J. Dairy Sci.* 80:1416–1425. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76071-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76071-5).
- Arriola Apelo, S. I., J. R. Knapp, and M. D. Hanigan. 2014. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* 97:4000-4017. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7392>.

- 740 Aguirre-Villegas, H. A., M. A. Wattiaux and, R. A. Larson, L. Chase, S. D.
 741 Ranathunga, and M. D. Ruark. 2017. Dairy cow nitrogen efficiency. University of
 742 Wisconsin–Extension. Accessed July 10, 2024.
 743 [https://www.virtualfarm.psu.edu/assets/uploads/content/](https://www.virtualfarm.psu.edu/assets/uploads/content/DairyCap_DairyCowNitrogenEfficiency-Final-Final.pdf)
 744 [DairyCap_DairyCowNitrogenEfficiency-Final-Final.pdf](https://www.virtualfarm.psu.edu/assets/uploads/content/DairyCap_DairyCowNitrogenEfficiency-Final-Final.pdf).
- 745 Bauman D. E., and W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and
 746 lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J.*
 747 *Dairy Sci.* 63:1514-1529. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83111-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83111-0).
- 748 Beauchemin, K. A. 2018. Invited review: Current perspectives on eating and
 749 rumination activity in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:4762 4784.
 750 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13706>.
- 751 Benchaar, C., F. Hassanat., K. A. Beauchemin., G. Gislón., and D. R. Ouellet. 2021.
 752 Diet supplementation with canola meal improves milk production, reduces enteric
 753 methane emissions, and shifts nitrogen excretion from urine to feces in dairy cows.
 754 *J. Dairy Sci.* 104:9645-9663. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20053>.
- 755 Butler, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy
 756 cattle. 1998. *J. Dairy Sci.* 81, 2533-2539. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)70146-8)
 757 [0302\(98\)70146-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)70146-8).
- 758 Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of
 759 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.*
 760 *Biochem.* 72:248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- 761 Brito, A. F., and G. A. Broderick. 2007. Effects of feeding different protein
 762 supplements on milk production and nutrient utilization in dairy cows. *J. Dairy Sci.*
 763 90:1816-1827. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-558>.

- 764 Broderick, G. A., A. P. Faciola, and L. E. Armentano. 2015. Replacing dietary
 765 soybean meal with canola meal improves production and efficiency of lactating
 766 dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 5672-5687. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9563>.
- 767 CANOLA COUNCIL OF CANADA. 2019. Canola Meal Dairy Feed Guide. 6th ed.
 768 Canola Council of Canada, Winnipeg, MB.
- 769 Coleman, D. N., V. Lopreiato., A. Alharthi., and J. J. Loor. 2020. Amino acids and the
 770 regulation of oxidative stress and immune function in dairy cattle. *J. Anim. Sci.*
 771 98:S175-S193. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa138>.
- 772 Costa, A., N. Lopez-Villalobos., N. W. Sneddon., L. Shalloo., M. Franzoi., M. De
 773 Marchi., and M. Penasa. 2019. Invited review: Milk lactose-Current status and
 774 future challenges in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 102:5883-5898.
 775 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15955>.
- 776 Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep
 777 and Cattle Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives: An Overview of
 778 Technical Details. International Feed Resources Unit, Rowett Research Institute.
- 779 Chizzotti, M. L., S. C. Valadares Filho, R. F. D. Valadares, F. H. M. Chizzotti, and L.
 780 O. Tedeschi. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot
 781 urine sampling in Holstein cattle. *Livest. Sci.* 113:218–225.
 782 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.03.013>
- 783 Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis
 784 and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.*
 785 75:2304-2323. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77992-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77992-2).
- 786 Detmann, E., L. F. Costa e Silva, G. C. Rocha, M. N. N. Palma, and J. P. P.
 787 Rodrigues. 2021. Métodos para análise de alimentos. Produção Independente (In
 788 Portuguese).

- 789 DeVries, T. J., M. A. G. von Keyserlingk, D. M. Weary, and K. A. Beauchemin. 2003.
 790 Measuring the feeding behavior of lactating dairy cows in early to peak lactation. J.
 791 Dairy Sci. 86:3354-3361. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73938-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73938-1).
- 792 Evans, E., and B. Wood. 2023. Canola meal as a feed ingredient for lactating dairy
 793 cows. J. Adv. Dairy Res. 11:625.
- 794 Günzler, W. A., G. J. Steffens, A. Grossmann, S. A. Kim, F. Otting, A. Wendel, and L.
 795 Flohé. 1984. The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. De Gru.
 796 365, 195-212. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1984.365.1.195>.
- 797 Gupta, S., A. Choi, Y. Y. Hope, S. M. Czerniak, E. A. Holick, L. J. Paoella, A.
 798 Agarwal, and C. M. Combelles. 2011. Fluctuations in total antioxidant capacity,
 799 catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine
 800 folliculogenesis. Reprod. Fertil. Dev., 23:673-680.
- 801 Hall, M. B. 2000. Neutral Detergent-Soluble Carbohydrates-Nutritional Relevance
 802 and Analysis. Bulletin No. 339. University of Florida.
- 803 Hall, M. B., J. Arbaugh, K. Binkerd, A. Carlson, T. Doan, T. Grant, C. Heuer, H. D.
 804 Inerowicz, B. Jean-Louis, R. Johnson, J. Jordan, D. Kondratko, E. Maciel, K.
 805 McCallum, D. Meyer, C. A. Odijk, A. Parganlija-Ramic, T. Potts, L. Ruiz, S.
 806 Snodgrass, D. Taysom, S. Trupia, B. Steinlicht, and D. Welch. 2015.
 807 Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-
 808 colorimetric method: Collaborative study. J. AOAC Int. 98:397-409.
 809 <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-012>.
- 810 Huhtanen, P., M. Hetta, and C. Swensson. 2011. Evaluation of canola meal as a
 811 protein supplement for dairy cows: A review and a meta-analysis. Can. J. Anim.
 812 Sci. 91:529-543. <https://doi.org/10.4141/cjas2011-029>.

- 813 Huhtanen, P., and A. N. Hristov. 2009. A meta-analysis of the effects of dietary
 814 protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency
 815 in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3222–3232. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1352>.
- 816 Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *J.*
 817 *Anim. Sci.* 75:852–867. <https://doi.org/10.2527/1997.753852x>
- 818 Hristov, A. N., R. P. Etter, J. K. Ropp, and K. L. Grandeen. 2004. Effect of dietary
 819 crude protein level and degradability on ruminal fermentation and nitrogen
 820 utilization in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 82:3219–3229.
 821 <https://doi.org/10.2527/2004.82113219x>
- 822 Krisher, R. L., and J. R. Herrick. 2013. Oocyte metabolism and its relationship to
 823 developmental competence. Pages 165–189 in *Oocyte Physiology and*
 824 *Development in Domestic Animals*. R. L. Krisher, ed. Wiley-Blackwell.
- 825 Liang, Y., N. Ma, D. N. Coleman, F. Liu, Y. Li, H. Ding, F. F. Cardoso, C. Parys, F. C.
 826 Cardoso, and J. J. Loo. 2021. Methionine and arginine supply alters abundance
 827 of amino acid, insulin signaling, and glutathione metabolism-related proteins in
 828 bovine subcutaneous adipose explants challenged with N-acetyl-d-sphingosine.
 829 *Animals (Basel)* 11:2114. <https://doi.org/10.3390/ani11072114>.
- 830 MacDonald, P. D. M., and P. E. Green. 1988. User's Guide to Program MIX: An
 831 Interactive Program for Fitting Mixtures of Distributions. Release 2.3, January
 832 1988. Ichthus Data Systems.
- 833 Madesh, M., and K. A. Balasubramanian. 1997. Activation of liver mitochondrial
 834 phospholipase A2 by superoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 346, 187–192.
 835 <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0288>.

- 836 Martineau, R., D. R. Ouellet, and H. Lapierre. 2013. Feeding canola meal to dairy
837 cows: A meta-analysis on lactational responses. *J. Dairy Sci.* 96:1701-1714.
838 <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5740>.
- 839 Martineau, R., D. R. Ouellet, and H. Lapierre. 2014. The effect of feeding canola
840 meal on concentrations of plasma amino acids. *J. Dairy Sci.* 97:1603-1610.
841 <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7125>.
- 842 Maxin, G., D. R. Ouellet, and H. Lapierre. 2013. Effect of substitution of soybean
843 meal by canola meal or distillers grains in dairy rations on amino acid and glucose
844 availability. *J. Dairy Sci.* 96:7806-7817. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6976>.
- 845 Meijer, G. A., J. Van der Meulen, J. G. Bakker, C. J. Van der Koelen, and A. M. Van
846 Vuuren. 1995. Free amino acids in plasma and muscle of high yielding dairy cows
847 in early lactation. *J. Dairy Sci.* 78:1131–1141. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76730-3)
848 [0302\(95\)76730-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76730-3)
- 849 NASEM (National Academies of Sciences Engineering and Medicine). 2021. Nutrient
850 Requirements of Dairy Cattle. 8th rev. ed. The National Academies Press,
851 Washington, DC.
- 852 Neinast, M., D. Murashige, and Z. Arany. 2019. Branched chain amino acids. *Annu*
853 *Rev Physiol.* 81:139–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114455>
- 854 Nocek, J. E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy
855 digestibility: a review. *J. Dairy Sci.* 71:2051-2069.
856 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79781-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79781-7).
- 857 NRC (National Research Council). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th
858 rev. ed. The National Academies Press, Washington, DC.
- 859 Oba, M., and M. S. Allen. 2003. Effects of corn grain conservation method on feeding
860 behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch

861 concentrations. J. Dairy Sci. 86:174-183. <https://doi.org/10.3168/jds.S0022->
862 0302(03)73598-X.

863 Oliveira, G. A.; R. V. Sarapião., C. C. R. Quintão. 2014. Biotécnicas da reprodução
864 em bovinos. 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em bovinos” no Laboratório
865 de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. Juiz de Fora:
866 Paula, E. M., G. A. Broderick, M. A. C. Danes, N. E. Lobos, G. I. Zanton, and A. P.
867 Faciola. 2018. Effects of replacing soybean meal with canola meal or treated
868 canola meal on ruminal digestion, omasal nutrient flow, and performance in
869 lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 101:328-339. <https://doi.org/10.3168/jds.2017->
870 13392.

871 Paula, E. M., G. A. Broderick, and A. P. Faciola. 2020. Effects of replacing soybean
872 meal with canola meal for lactating dairy cows fed 3 different ratios of alfalfa to
873 corn silage. J. Dairy Sci. 103:1463-1471. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16947>.

874 Raboisson, D., A. Albaaj, G. Nonne, and G. Foucras. 2017. High urea and pregnancy
875 or conception in dairy cows: A meta-analysis to define the appropriate urea
876 threshold. J. Dairy Sci. 100:7581-7587. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12009>.

877 Read, C. C., L. Edwards, N. Schrick, J. D. Rhinehart, R. R. Payton, S. R. Campagna,
878 H. F. Castro, J. L. Klabnik, E. J. Horn, and S. E. Moorey. 2021. Correlation
879 between pre-ovulatory follicle diameter and follicular fluid metabolome profiles in
880 lactating beef cows. Metabolites 11:623. <https://doi.org/10.3390/metabo11090623>.

881 Sinclair, K. D., L. A. Lunn, W. Y. Kwong, K. Wonnacott, R. S. T. Linforth, J. Craigon.
882 2008. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-
883 vitro embryo development. RBM online, 16:859-868.

- 884 Schwab, C. G., R. S. Ordway, and N. L. Whitehouse. 2003. Amino acid balancing in
885 the context of MP and RUP requirements. Pages 10-25 in Proc Four-State Applied
886 Nutrition and Management Conference.
- 887 Schwab, C. G. 2010. The principles of balancing diets for amino acids and their
888 impact on N utilization efficiency. Pages 1-15 in Proc. 23rd Ruminant Nutr. Symp.,
889 University of Florida, Gainesville, FL.
- 890 Valadares, R. F. D., G. A. Broderick, S. D. C. Valadares Filho, and M. K. Clayton.
891 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein
892 synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. J. Dairy Sci.
893 82:2686-2696. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75525-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75525-6).
- 894 Valente, T. N. P., E. Detmann, A. C. de Queiroz, S. C. Valadares Filho, D. I. Gomes,
895 and J. F. Figueiras. 2011. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages
896 using bags made from different textiles. Rev. Bras. Zootec. 40:2565-2573.
897 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011001100039>.
- 898 Van Knegsel, A. T. M., H. Van den Brand., J. Dijkstra., and B. Kemp. 2007. Effects of
899 dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables
900 in dairy cows in early lactation. Theriogenology. 68:S274-S280.
901 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.043>.
- 902 Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber,
903 neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal
904 nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
905 [0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- 906 Weiss, W. P., D. J. Wyatt., D. H. Kleinschmit., and M. T. Socha. 2015. Effect of
907 including canola meal and supplemental iodine in diets of dairy cows on short-term

- 908 changes in iodine concentrations in milk. J. Dairy Sci. 98:4841-4849.
909 <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9209>.
- 910 Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, J. H. F. Troutt Jr., and T.
911 N. Lesch. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to
912 standard production characteristics. J. Dairy Sci. 65:495-501.
913 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82223-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223-6).

914 **Table 2.** Composition of dietary ingredients

Component	Corn silage		Soyhulls		Ground corn		Soybean meal		Canola meal	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
DM, % of as-fed	28.6	2.53	89.6	0.53	88.4	0.30	89.1	0.26	88.6	0.39
OM, % of DM	93.9	0.09	95.2	0.11	98.1	0.06	93.3	0.06	90.5	0.35
CP, % of DM	9.1	0.60	12.2	0.18	9.0	.	51.2	0.51	42.9	3.21
NDF, % of DM	56.8	2.74	71.1	3.42	10.6	0.32	26.0	0.62	39.5	1.30
Starch, % of DM	29.7	1.06	0.6	0.05	71.3	2.07	1.6	0.16	1.5	0.10

915

Table 3. Composition of diets containing soybean meal (SBM) or canola meal (CM) as the main protein source

Item	SBM	CM
Ingredients, % of DM		
Corn silage	70.1	70.1
Soyhulls	6.4	3.1
Ground corn	9.6	9.6
Soybean meal	11.3	-
Canola meal	-	14.7
Urea	0.7	0.7
Limestone	0.2	0.2
Minerals and vitamins ¹	1.7	1.7
Composition		
DM, % of as fed	42.0	45.2
OM, % of DM	92.7	92.2
CP, % of DM	16.1	16.2
CP from soybean meal, % of DM	6.20	-
CP from canola meal, % of DM	-	6.73
NDF, % of DM	48.3	48.6
Forage NDF, % of DM	39.3	38.3
Ether extract, ² % of DM	2.7	3.0
NFC, ³ % of DM	26.8	25.7
Starch, % of DM	25.1	25.1
Non-starch NFC, ⁴ % of DM	1.7	0.6

¹Premix contained 20.5% of Ca; 6.0% of P; 2.0% of Mg; 3.5% of K; 2.0% of S; 7.0% of Na; 15 mg/kg of Co; 700 mg/kg of Cu; 1600 mg/kg of Mn; 2500 mg/kg of Zn; 19 mg/kg of Se; 40 mg/kg of I; 200,000 UI/kg of vitamin A; 50,000 UI/kg of vitamin D; 1,500 UI/kg of vitamin E and 1,000 mg/kg of monensin.

²Fat contents of individual dietary ingredients were obtained from the NASEM (2021) nutrient composition tables.

³NFC = 100 - ash - ether extract - NDF - (CP - 0.64 × CP equivalent from urea). The adjustment for supplemental nonprotein nitrogen was based on NASEM (2021).

⁴Non-starch NFC = NFC - starch.

Table 4. Predicted MP and NEL requirement and balance, and production variables by NASEM (2021) for treatments¹

Item	SBM	CM
Predicted MP requirement and balance, ² g/d		
MP requirement	1,087	1,160
Scurf	11	11
Endogenous urinary	175	178
Metabolic fecal	295	319
Body reserves	16	19
Lactation	590	633
MP supply	1,501	1,547
MP balance	+414	+388
Predicted NEL requirement and balance, ² Mcal/d		
Maintenance	11.00	11.16
Milk production	9.86	10.11
Gain	1.12	1.31
Balance	0.59	0.78
Predicted production variables ²		
NEL, Mcal/kg of DM	1.44	1.38
NEL-allowable milk, kg/d	13.3	14.5
Milk true protein, g/d	690	710

¹SBM: soybean meal and CM: canola meal.

²Calculated based on the measured DMI, milk yield, milk composition, BW, BCS and feed composition using the NASEM (2021) model.

930 **Table 5.** Duodenal AA flows, net AA utilization and predicted metabolizable AA efficiencies by NASEM (2021) for treatments¹

AA	Duodenal metabolizable AA flows (g/d)		Net AA utilization (g/d)		Predicted metabolizable AA efficiency		Predicted/Target ¹	
	SBM	CM	SBM	CM	SBM	CM	SBM	CM
His	35	35	21	22	0.59	0.62	0.79	0.83
Ile	92	94	38	41	0.41	0.43	0.58	0.61
Leu	137	140	66	71	0.47	0.49	0.64	0.67
Lys	118	121	55	59	0.46	0.48	0.64	0.67
Met	34	37	17	18	0.49	0.48	0.67	0.66
Phe	87	87	34	37	0.38	0.41	0.63	0.68
Thr	82	86	36	39	0.43	0.44	0.67	0.69
Trp	19	20	11	12	0.55	0.58	0.64	0.67
Val	94	99	45	48	0.47	0.48	0.64	0.65

931 ¹SBM: soybean meal and CM: canola meal. Target metabolizable AA efficiency: His = 0.75; Ile = 0.71; Leu = 0.73; Lys = 0.72; Met = 0.73; Phe = 0.60; Thr = 0.64; Trp = 0.86; Val
 932 = 0.74.

933 ²Predicted metabolizable AA efficiency divided by target metabolizable AA efficiency. Values = 1 means the provided amount is equal to the target; < 1 indicates the provided
 934 amount is in excess; and > 1 indicates the provided amount is deficient.

935 **Table 6.** Intake and total-tract apparent digestibility of nutrients on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM)¹

Item	Treatments		SEM	<i>P</i> -value		
	SBM	CM		Treatment	Week	Treatment × Week
Intake, kg/d						
DM	15.6	16.8	0.78	0.27	0.02	1.00
OM	14.3	15.4	0.72	0.30	0.04	1.00
CP	2.5	2.7	0.13	0.23	<0.01	0.99
NDF	7.4	8.1	0.38	0.23	<0.01	0.99
Non-NDF OM	6.9	7.3	0.26	0.33	0.01	0.97
Starch	3.9	4.2	0.13	0.21	<0.01	1.00
Digestibility, %						
DM	56.7	54.4	0.54	0.12	<0.01	0.57
OM	59.8	57.6	0.29	0.02	<0.01	1.00
CP	55.1	48.3	13.80	0.79	0.97	0.94
NDF	43.3	41.2	0.07	<0.01	<0.01	<0.01
Non-NDF OM	78.0	76.6	0.44	0.14	0.35	0.54
Starch	92.7	92.7	0.30	0.99	0.06	0.97

936 ¹All variables were analyzed considering the pen as the experimental unit.

937 **Table 7.** Lactation performance of dairy cows on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM)¹

Item	Treatments		SEM	<i>P</i> -value		
	SBM	CM		Treatment	Week	Treatment × Week
Yield						
Milk, kg/d	12.6	13.5	1.05	0.48	<0.01	0.54
ECM, kg/d	13.9	14.1	0.89	0.84	<0.01	0.92
Feed efficiency						
Milk/DMI	0.8	0.8	0.05	0.98	<0.01	0.65
ECM/DMI	0.9	0.9	0.03	0.61	<0.01	0.76
ECM/DOMI	1.6	1.6	0.07	0.83	<0.01	0.75
Milk component						
Fat, %	4.56	4.16	0.117	0.03	<0.01	0.27
Fat, kg/d	0.574	0.548	0.0354	0.55	<0.01	0.84
Protein, %	3.40	3.36	0.039	0.35	<0.01	0.86
Protein, kg/d	0.422	0.456	0.0241	0.24	0.11	0.88
Lactose, %	4.18	4.28	0.105	0.13	<0.01	0.10
Lactose, kg/d	0.515	0.570	0.0353	0.20	0.40	0.78
Casein, %	2.65	2.63	0.031	0.66	<0.01	0.72
Casein, kg/d	0.327	0.356	0.0192	0.19	0.09	0.87
TS, %	13.07	12.70	0.136	0.06	<0.01	0.26
TS, kg/d	1.635	1.701	0.1089	0.63	0.01	0.92
MUN, mg/dL	16.28	13.10	0.447	<0.01	0.50	<0.01
Linear SCC, ² 1 to 9	4.34	4.19	0.187	0.58	<0.01	0.01
BCS, 1 to 5	3.04	3.10	0.025	0.10	<0.01	0.60
BW, kg	544	561	4.6	0.01	<0.01	0.55

BW gain, ³ g/d	225	192	16.7	0.15	.	.
---------------------------	-----	-----	------	------	---	---

938

¹Feed efficiency was analyzed considering the pen as the experimental unit.

939

²Equivalency of the linear SCC: 4.34 = 147,050 cells/mL and 4.19 = 143,631 cells/mL.

940

³Slope of linear regression of BW over experimental weeks.

941 **Table 8.** Meal, chewing and rumination behavior and proportion of intake during the day of dairy cows on treatments soybean meal
 942 (SBM) or canola meal (CM)

Item	Treatments		SEM	<i>P-value</i>		
	SBM	CM		Treatment	Week	Treatment × Week
Meal behavior						
Meal frequency, meals/d	4.6	5.6	0.26	0.01	0.04	0.97
Meal duration, min/meal	92.9	69.6	6.37	0.01	0.90	0.65
Meal time, min/d	400	369	41.8	0.66	<0.01	0.58
Largest meal moment, ¹ min	340	273	38.7	0.16	0.24	0.29
Largest meal duration, min	170.7	157.5	18.66	0.67	0.46	0.29
First meal duration, min/meal	136.7	134.9	11.43	0.92	0.62	0.24
Chewing behavior, min/d						
Eating	328	328	13.1	1.00	0.02	0.16
Rumination	430	462	26.7	0.49	<0.01	0.02
Chewing, ²	760	792	53.2	0.72	<0.01	0.24
Rumination behavior, min/d						
Standing rumination	115	63	16.2	0.14	<0.01	0.44
Lying rumination	313	400	13.8	<0.01	0.43	0.36
Proportion of daily intake, %						
0600-1200 h	37.7	40.9	1.14	0.05	<0.01	0.13
1200-1800 h	38.3	38.2	2.45	0.97	0.26	0.51
1800-0600 h	24.2	21.0	1.56	0.32	<0.01	0.01

943 ¹Minutes from first daily feeding at 0700 h.

944 ²Chewing = eating + rumination.

945 **Table 9.** Concentration of metabolites in plasma on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM) in wk 3, 5, and 7 of the
 946 experiment

Item	Treatments		SEM	<i>P-value</i>		
	SBM	CM		Treatment	Week	Treatment × Week
Glucose, mg/dL	67.9	64.6	1.67	0.16	0.56	0.30
PUN, ¹ mg/dL	17.8	17.5	0.21	0.13	0.02	0.93
BHB, mmol/L	0.93	0.89	0.042	0.46	0.78	0.41

947 ¹Plasma urea nitrogen.

948 **Table 10.** Concentration of metabolites in plasma and follicular fluid on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM) at the
 949 day of OPU sessions

Item	Treatments		SEM ¹	<i>P-value</i> Treatment
	SBM	CM		
<i>n</i>	14	18		
Glucose, mg/dL				
Plasma	74.0	73.6	5.64	1.00
Follicular fluid	64.7	68.6	4.12	0.51
Urea nitrogen, mg/dL				
Plasma	17.5	17.3	0.15	0.39
Follicular fluid	16.9	17.2	0.23	0.36

950 ¹The SEM values correspond to the means between treatments.

951 **Table 11.** Nitrogen partition and ruminal microbial yield on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM)¹

Item	Treatments		SEM	<i>P-value</i>		
	SBM	CM		Treatment	Week	Treatment × Week
N intake, g/d	405.9	447.2	20.34	0.29	0.03	0.43
Milk N, g/d	68.5	74.0	5.13	0.53	0.10	0.87
% of N intake	16.9	16.6	0.69	0.81	0.01	0.44
Urinary N, g/d	287.3	254.9	45.93	0.67	0.81	0.97
% of N intake	70.1	57.2	7.90	0.37	0.47	1.00
Urea N, g/d	179.6	163.7	29.73	0.69	0.62	0.84
% of total urinary N	67.4	71.0	3.86	0.51	0.99	0.83
Fecal N, g/d	123.2	151.8	17.34	0.34	<0.01	0.70
% of N intake	29.7	33.6	2.82	0.41	<0.01	0.65
Urinary excretion						
Urine volume, ² L/d	21.6	20.9	3.42	0.87	0.03	0.90
Allantoin, mmol/d	301.4	325.8	37.39	0.63	0.47	0.38
Uric acid, mmol/d	65.0	51.4	7.48	0.12	0.09	0.51
PD, ³ mmol/d	365.7	378.6	45.39	0.83	0.41	0.37
PD/creatinine × BW	1,952	1,986	225.2	0.92	0.01	0.52
PD/creatinine × BW ^{0.75}	408	412	40.2	0.94	<0.01	0.52
PD/DOMI, ⁴ mmol/kg	41.5	44.3	3.76	0.64	0.48	0.70
Fecal pH	6.6	6.4	0.13	0.38	<0.01	0.79
Urinary pH	8.1	7.8	0.05	<0.01	<0.01	<0.01

952 ¹N intake, milk protein N, urinary and fecal N as a proportion of intake and PD/DOMI ratio was analyzed considering the pen as the experimental unit.

953 ²Estimated from creatinine concentration in spot urine samples assuming an excretion of 29 mg of creatinine/kg of BW (Valadares et al., 1999).

954 ³Allantoin plus uric acid.

955 ⁴PD/DOMI was calculated as a measure of efficiency of ruminal microbial growth.

956 **Table 12.** Oocyte quality and activity of antioxidant enzymes on treatments soybean meal (SBM) or canola meal (CM)

Item	Treatments		SEM ¹	<i>P-value</i> Treatment
	SBM	CM		
<i>n</i>	8	11		
Oocytes ² (n)				
Total	6.0	4.6	1.18	0.42
Viable	0.4	0.7	0.25	0.28
Degenerated	3.4	2.0	0.98	0.23
Oocytes ³ (%)				
Viable	5.2	13.7	4.51	0.20
Degenerated	74.5	57.2	8.96	0.20
Antioxidant enzymes ⁴				
Glutathione	1.65	1.57	0.130	0.59
Catalase	15.52	15.51	4.184	0.99
Superoxide dismutase	0.0090	0.0093	0.00159	0.64

957 ¹The SEM values correspond to the means between treatments.

958 ²Oocytes viable number is the sum of grade 1 and grade 2 oocytes.

959 ³Proportion of viable oocytes is the number of viable oocytes divided by the total number of oocytes. Proportion of degenerated oocytes is the number of degenerated oocytes
 960 divided by the total number of oocytes.

961 ⁴U per mg of protein per mL of follicular fluid.

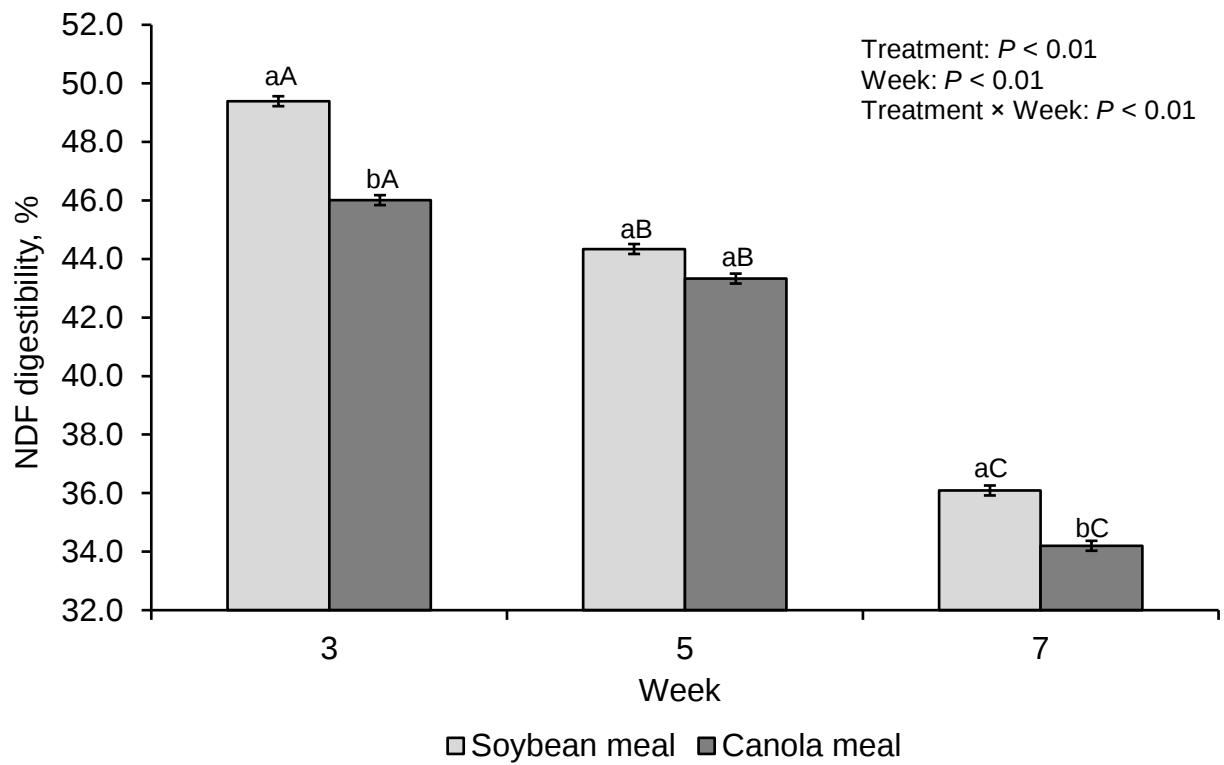
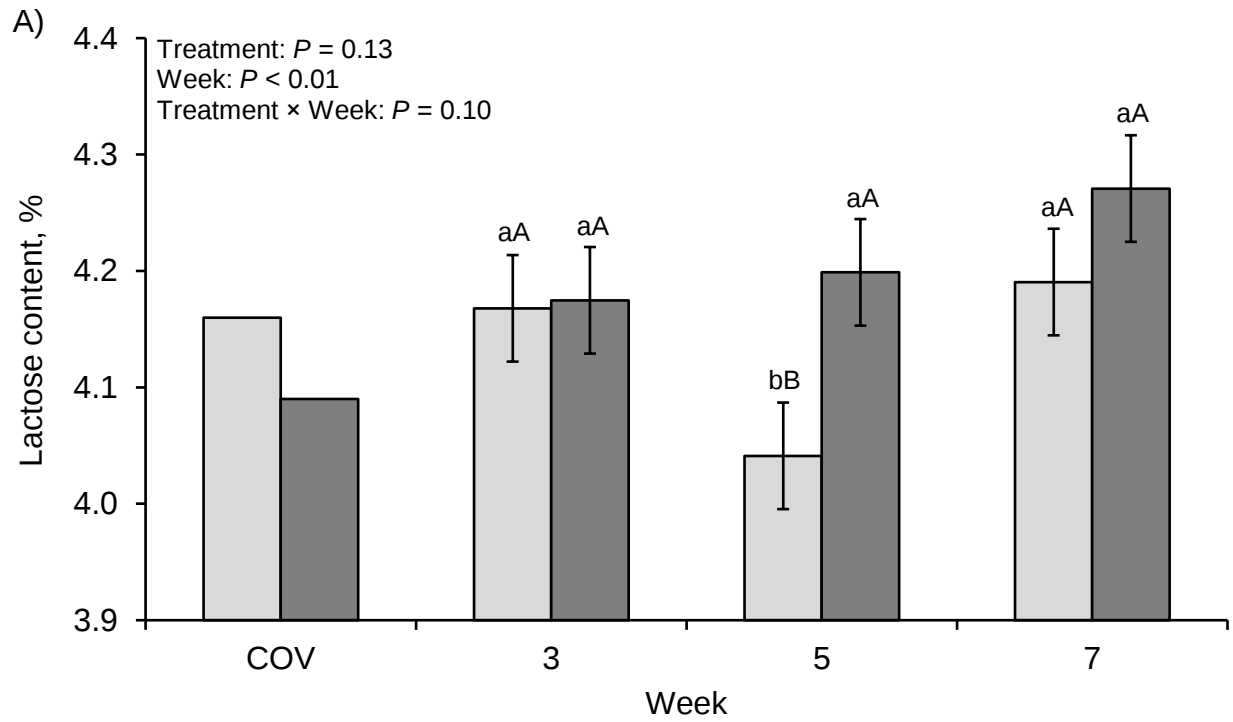
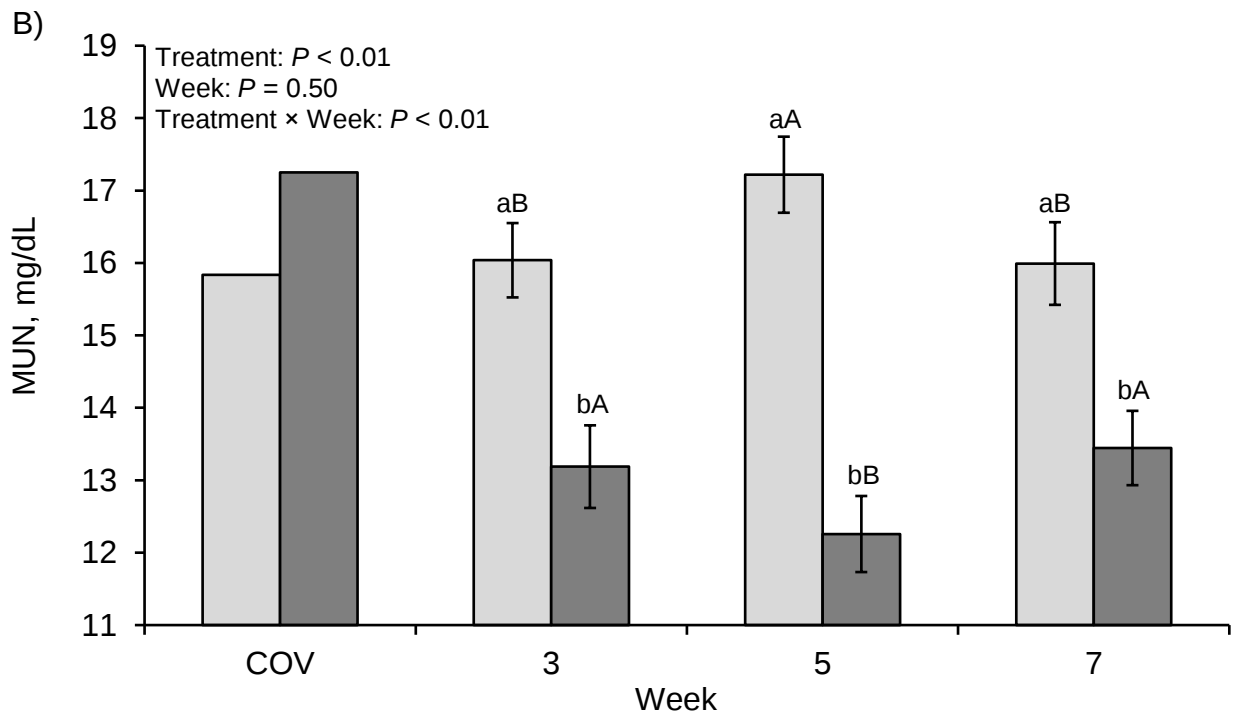


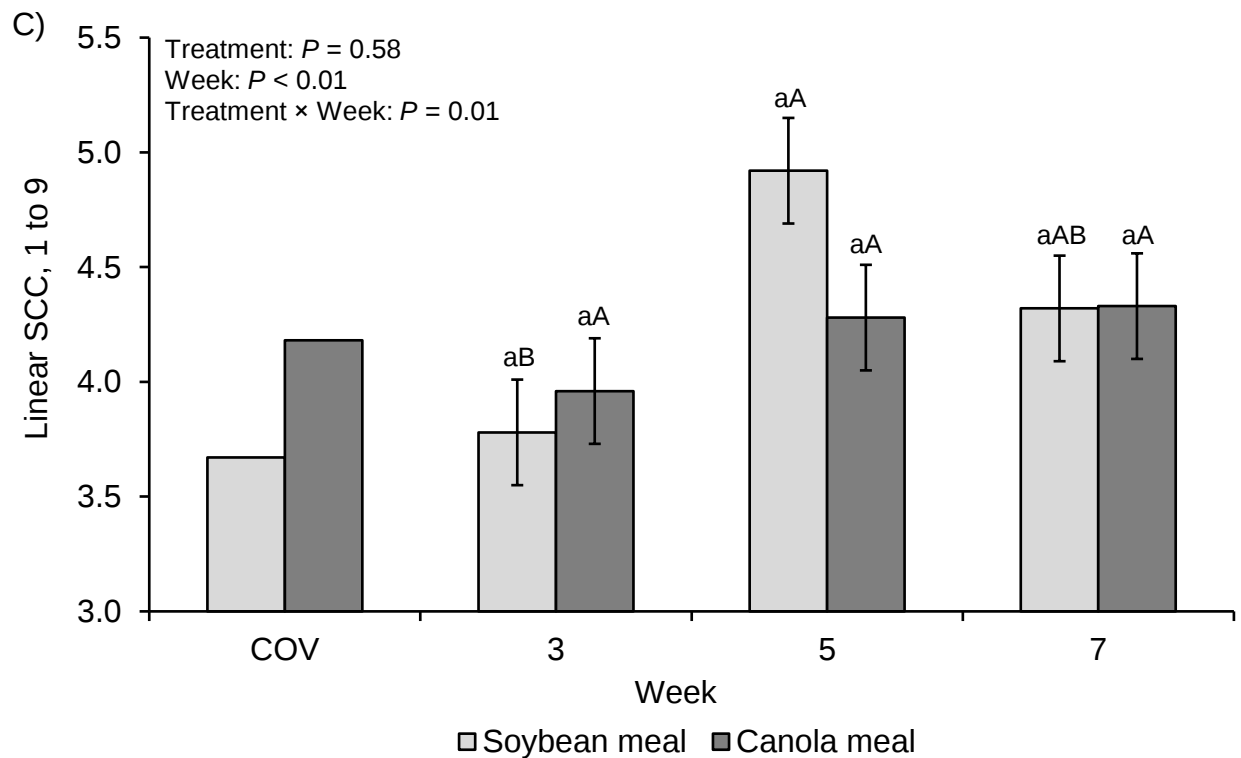
Figure 2. NDF digestibility on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black).
^{a,b}Means followed by different lowercase letters differ within week. ^{A,B}Means followed
 by different uppercase letters differ between weeks (treatment $\times$ week, $P < 0.01$). Error
 bars: standard error of the mean (SEM).



967



968



969

970 **Figure 3.** A) Milk lactose content (%), B) milk urea nitrogen (mg/dL), and C) linear SCC
 971 (1 to 9) on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black). ^{a,b}Means followed
 972 by different lowercase letters differ within week. ^{A,B}Means followed by different
 973 uppercase letters differ between weeks (treatment $\times$ week, $P \leq 0.10$). COV: covariate.
 974 Error bars: standard error of the mean (SEM).

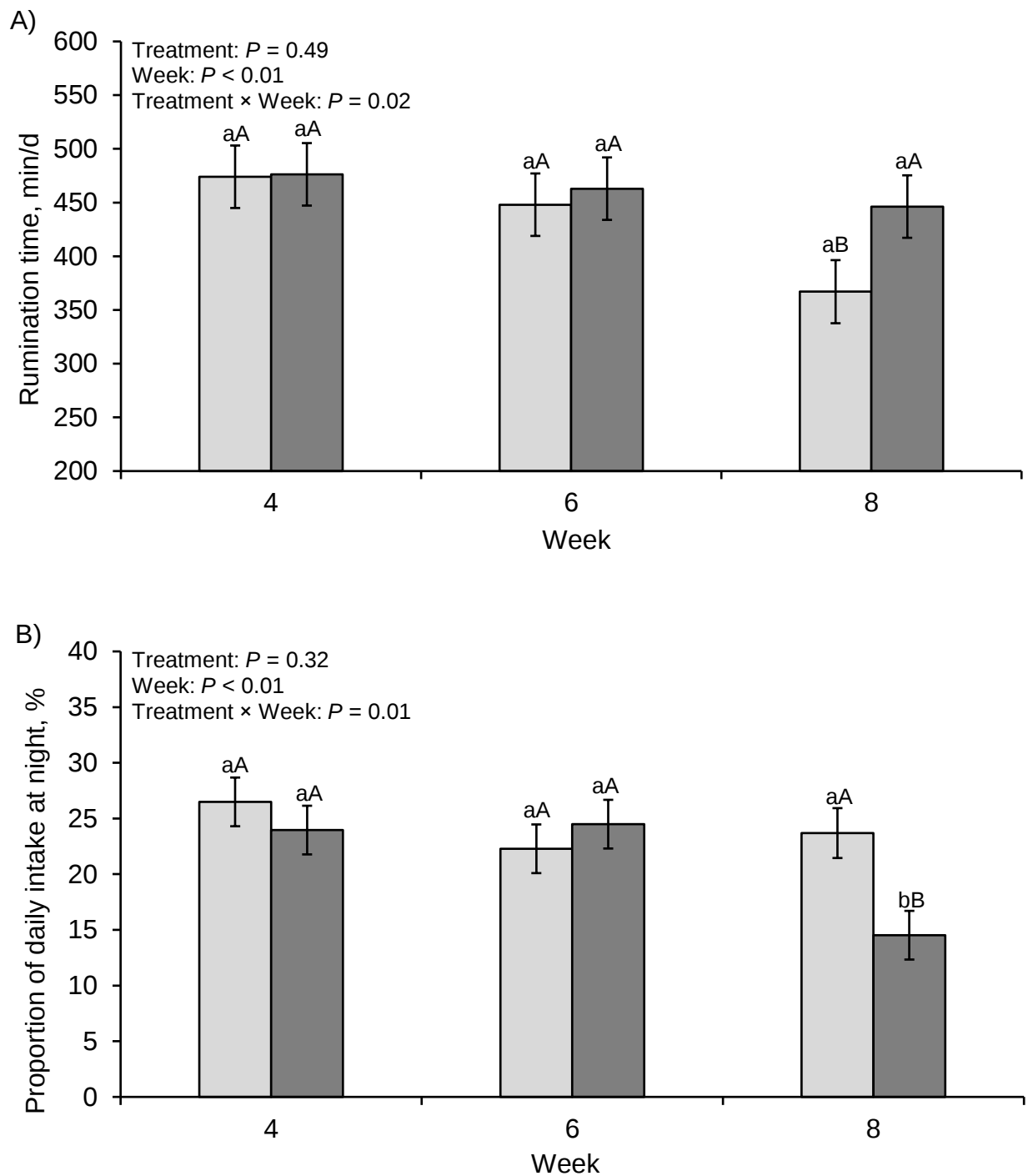
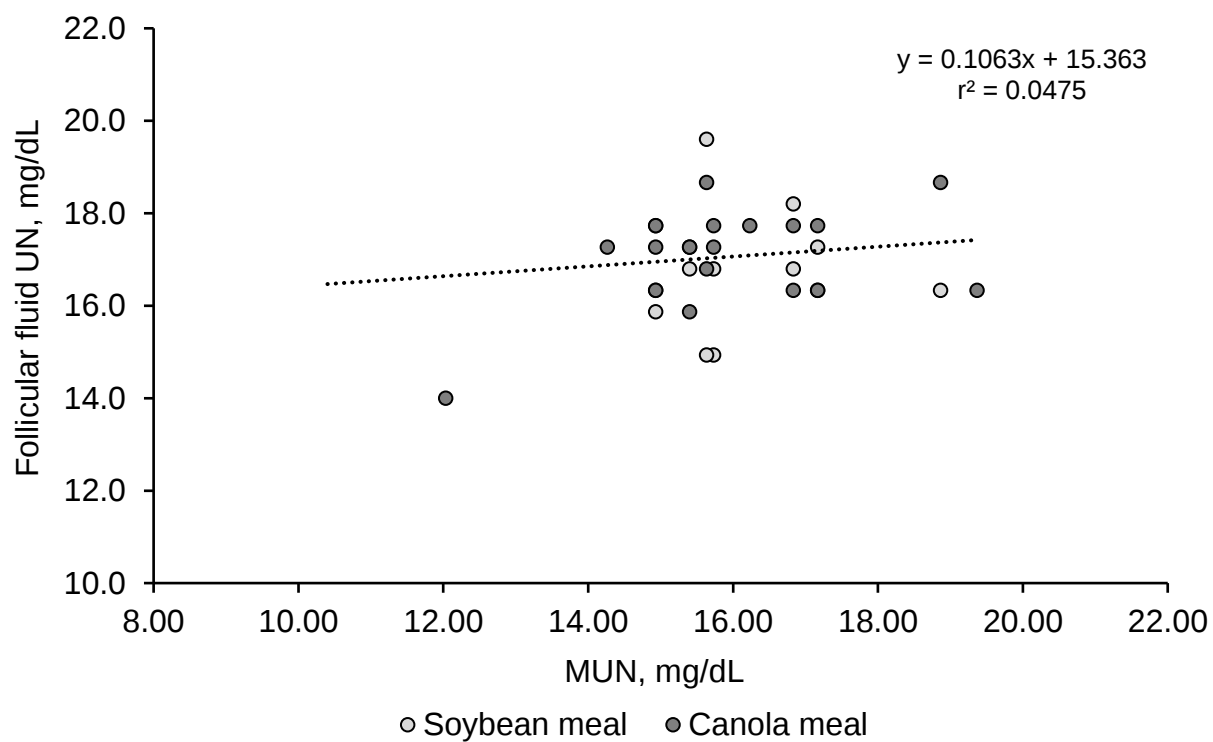
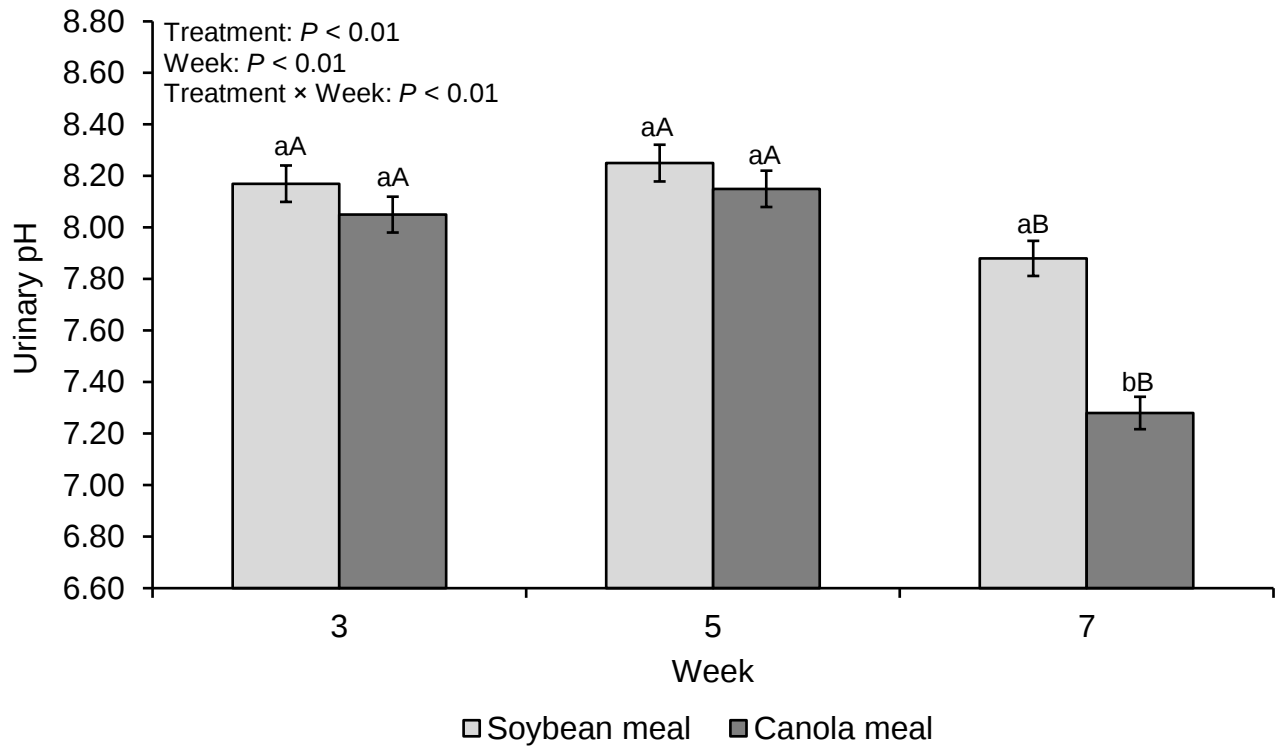


Figure 4. A) Rumination time (min/d) and B) proportion of daily intake at night (%) on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black). ^{a,b}Means followed by different lowercase letters differ within week. ^{A,B}Means followed by different uppercase letters differ between weeks (treatment $\times$ week, $P \leq 0.02$). Error bars: standard error of the mean (SEM).



982

983 **Figure 5.** Correlation of milk urea-N (MUN) and follicular fluid urea-N (follicular fluid
 984 UN) (mg/dL) on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black) at the day of
 985 OPU sessions.



986

987 **Figure 6.** Urinary pH on treatments soybean meal (gray) or canola meal (black).
988 ^{a,b}Means followed by different lowercase letters differ within week. ^{A,B}Means followed
989 by different uppercase letters differ between weeks (treatment $\times$ week, $P < 0.01$). Error
990 bars: standard error of the mean (SEM).