

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA DE MACRO E MICROMINERAIS EM
BOVINOS NELORE CONFINADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE FARELO DE
GLÚTEN DE MILHO**

WELLINGTON LUIZ DE PAULA ARAÚJO
ZOOTECNISTA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia
como parte das exigências para a
Defesa de Doutorado.

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA DE MACRO E MICROMINERAIS
EM BOVINOS NELORE CONFINADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE
FARELO DE GLÚTEN DE MILHO**

WELLINGTON LUIZ DE PAULA ARAÚJO

ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Coorientadores: Prof. Dr. Mário de Beni Arrigoni

Dr. José Cavalcante Souza Vieira

Tese apresentada ao Programa de
Pós- graduação em Zootecnia
como parte das exigências para a
Defesa de Doutorado.

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2022

A663a Araújo, Wellington Luiz de Paula
Abordagem metaloproteômica de macro e microminerais em
bovinos nelore confinados com diferentes níveis de farelo de glúten de
milho / Wellington Luiz de Paula Araújo. -- Botucatu, 2022
113 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Coorientador: Mário De Beni Arrigoni

1. Nutrição animal. 2. Metaloproteínas. 3. Espectrometria de
massas. 4. GFAAS e FAAS. 5. 2D-PAGE. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Wellington Luiz de Paula Araújo, nascido em 20 de março de 1991, na cidade de Viçosa-MG, filho de Vicente de Araújo e Maria Efigênia de Paula Araújo, ingressou no curso de Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sudeste de MG - Campus Rio Pomba em 28 de Fevereiro de 2011, finalizando a graduação em 20 de Dezembro de 2015. Foi bolsista de iniciação científica, desenvolvendo 3 projetos: Anatomia comparativa de espécies de *Brachiaria sp.*; Influência do tamanho de partículas na ingestibilidade, digestibilidade e ganho de peso de bovinos; Produção de pólen em abelhas africanizadas submetidas a diferentes suplementações energético-proteicos. Participou do Projeto Rondon –Operação Velho Monge e do Projeto de Extensão “Puro Leite”. Além disso, foi monitor em sete disciplinas e estagiário nos setores de produção da faculdade. É Mestre em Zootecnia, com ênfase em Nutrição e Alimentação Animal pelo programa de Pós-Graduação na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - Unesp – Botucatu (2016 -2018), onde foi orientador de 2 projetos de TCC e Estágios Supervisionados. Iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia em 01 de março de 2018 pelo mesmo programa, desenvolvendo pesquisa com exigências nutricionais de animais, qualidade da carne, fracionamento e caracterização de proteínas e metaloproteínas (eletroforese 2D-PAGE e espectrometria de massa), e quantificação de micro e macrominerais por espectrometria de absorção atômica. Também realizou Doutorado Sanduíche, desenvolvendo atividades relacionadas a proteômica/ metabolômica de bovinos, junto a University of Nebraska - Lincoln, Estados Unidos, pelo período de um ano. No período de Pós-Graduação, foi bolsista CAPES e também bolsista FAPESP.

Dedicatória

Dedico esta conquista à minha família, meus pais Vicente e Maria, minha irmã Uli e minha sobrinha Ana Julia.

Agradecimento

A Deus, por sempre me guiar, iluminar, dar forças para superar todas as barreiras e ser cada vez melhor.

Ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha pela oportunidade de orientação, pela amizade, por todos os ensinamentos, incentivo e disponibilidade de sempre.

Ao Prof. Dr. Mário de Beni Arrigoni, pela orientação, amizade e por junto a Prof^a. Dra. Cyntia Ludovico Martins e ao Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto por terem aberto as portas do confinamento experimental da faculdade para que o experimento fosse realizado.

A equipe do confinamento, Hugo Lennon Corrêa, Mateus Silva Ferreira, Bismarck Moreira Santiago e Tainá Eburnêo Martins, obrigado pela experiências, convivência e aprendizado.

A todos os estagiários e também aos integrantes da Empresa Júnior NUTRIR – UNESP, pela participação ao longo de todo o período experimental. Sem a ajuda e colaboração de vocês não teríamos concluído esse projeto com sucesso;

Ao Dr. José Cavalcante Souza Vieira, amigo e sempre disponível e pronto a ajudar. Obrigado pela orientação e ensinamentos.

A Cléo, ao Mateus e a Isabela, pelas conversas, por serem exemplos e estarem presentes sempre...

A Ana Bárbara Domingues Sartor, minha noiva, parceira e amiga em todas as horas, por me apoiar, acompanhar e sempre estar do meu lado. Esta conquista também é sua.

Aos meus pais, exemplos de humildade, vida e sabedoria. Sempre me dando todo o suporte em cada passo.

A University of Nebraska/Lincoln e todos que convivi e aprendi, Jiri Adamec, Camila Pereira Braga, Dana Adamec, André Mauric...

À Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal do Nível Superior – CAPES, pela concessão das bolsas de estudo (PROEX (Programa de Excelência Acadêmica), o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A CAPES-PrInt (PRINT - PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INTERNACIONALIZAÇÃO). Por fomentar o período de Doutorado Sanduiche na University of Nebraska/Lincoln.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo bolsa concedida e apoio financeiro por meio da reserva técnica de Bolsa Regular de Doutorado (Processo 2018/25969-8).

A empresa Nutron/Cargil representado por Dr. Pedro Veiga Paulino pela parceria em projeto de pesquisa com a UNESP.

A Unesp-Botucatu, em especial ao Departamento de Química e Bioquímica – IB, e a FMVZ por concederem a estrutura e equipamentos para realização das análises laboratoriais e experimentais.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação da FMVZ, Claudia Cristina e Ellen Cassimiro por todo apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e a excelente equipe de professores e funcionários.

À equipe do Laboratório de Bioanálítica e Metaloproteômica – LBM, José Cavalcante Souza Vieira, Leone Campos Rocha, Andrey Sávio de Almeida Assunção, Renata Aparecida Martins, Grasieli de Oliveira, Izabela da Cunha Bataglioli, Otávio Augusto de Freitas Apostólico e Maria Gabriela de Albuquerque Santiago.

E a todos os amigos que fiz na UNESP...

MUITO OBRIGADO!

Epígrafe

“O desejo é a própria essência do homem.”

(Baruch de Espinoza)

RESUMO GERAL

Embora o perfil proteômico do músculo *longissimus thoracis* tenha sido relatado em estudos no Brasil e em outros países, dados disponíveis na literatura sobre alterações no proteoma de bovinos, ainda são poucos, particularmente sobre mudanças no perfil das proteínas e na interação com mineral em bovinos de corte. Na raça Nelore essas dificuldades se tornam ainda maiores. **Artigo 1 (Capítulo II):** o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes níveis de Farelo de Glúten de Milho (DCGF – “*Dry Corn Gluten Feed*”) na dieta de terminação de bovinos Nelore, machos, não castrados, sobre características da qualidade da carne e do metaloproteoma do tecido muscular e da carne. **Artigo 2 (Capítulo III):** objetivou avaliar a inclusão de diferentes níveis de DCGF no perfil mineral e proteico (metaloproteômico) do tecido hepático de bovinos Nelore na terminação em confinamento e sobre a expressão de importantes proteínas no metabolismo animal. Para isto, foram utilizados 120 bovinos, machos não castrados, Nelore, com peso médio inicial de 361 kg, oriundos de pastagem, do mesmo rebanho. As dietas experimentais foram compostas de diferentes níveis de inclusão de DCGF (0%, 18%, 36% e 54%) em substituição ao milho grão. Após a coleta das amostras biológicas, foi obtido o proteoma por 2D PAGE, e utilizando o ImageMaster 2D Platinum 7.0, foi realizadas análises de expressão dos *spots* proteicos. A identificação das proteínas foi feita por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS/MS). Após isso, foram determinados os minerais por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS). Por fim, estudos de bioinformática através de softwares específicos, foram identificados os níveis funcionais, vias metabólicas e interações metal-proteína. Os resultados mostraram diferenças na expressão de proteínas do tecido muscular e da carne. Porém o Farelo de Glúten de Milho (DCGF) não se mostrou prejudicial à saúde hepática, sendo o ferro e o zinco os principais minerais do estudo, aparecendo em maiores frequências nos *spots* proteicos. A inclusão de DCGF nas dietas de terminação aumentou a ingestão de matéria seca, o ganho de peso diário, e o peso corporal final de bovinos Nelore. Diante disso, é indicado o uso do Farelo de Glúten de Milho seco como alternativa viável para inclusão na dieta quando se trata desses parâmetros, uma vez que não afetou negativamente o produto final, nem apresentou prejuízo à saúde animal.

Palavras-chave: tecido muscular e hepático, nutrição animal, metaloproteômica, perfil mineral-proteico, 2D-PAGE, GFAAS e FAAS, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Although the proteomic profile of the longissimus thoracis muscle has been reported in studies in Brazil and in other countries, the data available in the literature on alterations in the bovine proteome are still few, mainly on alterations in the protein profile and in the interaction with minerals in beef cattle. In the Nelore breed these difficulties become even greater. **Manuscript 1** (Chapter II): the goal of the present study was to evaluate the effects of different levels of Corn Gluten Flour (DCGF – “Dry Corn Gluten Feed”) in the finishing diet of uncastrated male Nellore cattle on beef quality and the metalloproteome of muscle tissue and meat. **Manuscript 2** (Chapter III): aimed to evaluate the inclusion of different levels of DCGF in the mineral and protein (metalloproteomic) profile of the liver tissue of Nellore cattle in feedlot finishing and in the expression of important proteins in animal metabolism. For this, 120 bovines, not castrated males, of the Nelore breed, with an average initial weight of 361 kg, coming from pasture, from the same herd, were used. The experimental diets were composed of different levels of inclusion of DCGF (0%, 18%, 36% and 54%) in replacement of corn grain. After the collection of biological samples, the proteome was obtained by 2D PAGE, and using ImageMaster 2D Platinum 7.0, analyzes of expression of protein spots. Protein identification was performed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). Then, the minerals were determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and graphite furnace (GFAAS). Finally, bioinformatics studies were identified using specific software, functional levels, metabolic pathways and metal-protein interactions. The results showed differences in the expression of muscle tissue and meat proteins. However, corn gluten meal (DCGF) was not shown to be harmful to liver health, with iron and zinc being the main minerals in the study, appearing more frequently in protein spots. The inclusion of DCGF in finishing diets increased dry matter intake, daily weight gain and final body weight of Nellore cattle. Therefore, the use of dry corn gluten meal is indicated as a viable alternative for inclusion in the diet when it comes to these parameters, since it did not negatively affect the final product, nor did it harm animal health.

Keywords: muscle and liver tissue, animal nutrition, metalloproteomics, mineral-protein profile, 2D-PAGE, GFAAS and FAAS, LC-MS/MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1: Fluxograma do processo de moagem úmida do milho, com destaque para a obtenção do Farelo de Glúten de Milho. Adaptado de: Fernandes, 2003. 21
- Figura 2: Fluxo de trabalho da estratégia proteômica 2D-PAGE adotada em bovinos.....29

CAPÍTULO II

- Figura 1: Fluxograma da metodologia do estudo.....40
- Figura 2. Diagrama do estudo molecular correlacionando com de qualidade de carne.....43
- Figure 3: Gel de poliacrilamida com *spots* proteicos de tecido muscular bovino identificados por LC-MS/MS.....48
- Figura 4: Gel de poliacrilamida com *spots* proteicos de carne bovina identificados por LC-MS/MS.....48

ANEXO

- Figura 5: Análise da interação proteína-proteína realizada pela String 11.0 de proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus lumborum thoracis*, na carne e proteínas presentes em ambos os tecidos de Bovinos Nelore.....56
- Figura 6: Incidência de *spots* no tecido muscular com cada mineral avaliado nos diferentes níveis de inclusão de DCGF.....73
- Figura 7: Incidência de *spots* na carne com cada mineral avaliado nos diferentes níveis de inclusão de DCGF.....73

CAPÍTULO III

- Figura 1: Fluxograma da metodologia de estudo.....88
- Figura 2: Gel de poliacrilamida com spots proteicos de tecido hepático de bovinos identificados por LC-MS/MS. 94*
- Figura 3: Incidência de spots no tecido hepático com cada mineral avaliado nos diferentes níveis de inclusão de DCGF. 107
- Figura 4: Análise da interação proteína-proteína realizada pela String 11.0 de proteínas diferencialmente expressas no tecido hepático de Bovinos Nelore. 108

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.....	39
--	----

ANEXO

Tabela 2: Ingestão de MS e performance de bovinos Nelore alimentados com diferentes níveis de DCFG.....	56
---	----

Tabela 3: Características de qualidade de carcaça e carne de touros Nelore alimentados com níveis crescentes de Farelo de Glúten de milho (DCGF) seco na dieta de terminação.....	56
---	----

Tabela 4: Presença de minerais em <i>spots</i> proteicos que apresentaram diferença de expressão no tecido muscular de bovinos alimentados com 0% (T1), 18% (T2), 36% (T3) e 54% (T4) de Farelo de Glúten de Milho (DCGF).....	58
--	----

Tabela 5: Presença de minerais em <i>spots</i> proteicos que apresentaram diferença de expressão na carne de bovinos alimentados com 0% (T1), 18% (T2), 36% (T3) e 54% (T4) de Farelo de Glúten de Milho (DCGF).....	61
--	----

Tabela 6: Identificação de proteínas com diferentes expressões no tecido muscular de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho (DCGF). A análise da expressão dos pontos foi realizada usando o Programa ImageMaster Platinum com a identificação de proteínas por LC-MS/MS. Positivo (+) os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de Farelo de Glúten de Milho.....	65
---	----

Tabela 7: Identificação de proteínas com diferentes expressões na carne de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho (DCGF). A análise da expressão dos pontos foi realizada usando o Programa ImageMaster Platinum com a identificação de proteínas por LC-MS/MS. Positivo (+) os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de Farelo de Glúten de Milho.....	67
---	----

Tabela 8: Concentração de zinco, manganês, cálcio, ferro, cobre e magnésio (ng mL ⁻¹) de acordo com cada <i>spots</i> protéicos das amostras do tecido muscular no período ante rigor mortis dos grupos (T1, T2, T3 e T4), nos quais foram analisados quanto a presença desses elementos. Os mesmos são representados na figura 3, e na tabela 4 quanto as proteínas identificadas.....	74
---	----

Tabela 9: Concentração de zinco, manganês, cálcio, ferro, cobre e magnésio (ng mL ⁻¹) de acordo com cada <i>spots</i> protéicos das amostras de carne (tecido muscular no período post rigor mortis) dos grupos (T1, T2, T3 e T4), nos quais foram analisados quanto a presença desses elementos. Os mesmos são representados na figura 4, e na tabela 5 quanto as proteínas identificadas.....	77
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.....	88
--	----

ANEXO

Tabela 2: Presença de minerais em <i>spots</i> proteicos que apresentaram diferença de expressão no tecido hepático de bovinos alimentados com 0%, 18%, 36% e 54% de Farelo de Glúten de milho (DCGF).....	101
--	-----

Tabela 3: Identificação de proteínas com diferentes expressões no tecido <i>hepático</i> de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho (DCGF). A análise da expressão dos pontos foi realizada usando o Programa ImageMaster Platinum com a identificação de proteínas por <i>LC-MS/MS</i> . Positivo (+) os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de Farelo de Glúten de Milho.....	102
--	-----

Tabela 4: Concentração de zinco, manganês, cálcio, ferro, cobre e magnésio (ng mL ⁻¹) de acordo com cada <i>spots</i> protéicos das amostras de fígado dos grupos (T1, T2, T3 e T4), nos quais foram analisados quanto a presença desses elementos. Os mesmos são representados na figura 2, e na tabela 2 quanto as proteínas identificadas.....	106
---	-----

Tabela 5: Ingestão de MS e performance de bovinos Nelore alimentados com diferentes níveis de DCFG.....	108
---	-----

Sumário

CAPÍTULO I.....	15
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 QUALIDADE DE CARNE	18
1.2 FARELO DE GLÚTEN DE MILHO (DCGF)	20
1.3. METALOPROTEÔMICA.....	23
1.3.1. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	24
1.3.2. Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS).....	25
1.3.3. Espectrometria de massas – MS.....	25
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO II	35
RESUMO	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1. Confinamento experimental.....	40
2.2. Abate e características de carcaça	41
2.3. Coleta de amostras do tecido muscular (<i>Longissimus thoracis</i>).....	41
2.4. Qualidade de carne.....	42
2.4.1. Força de cisalhamento	42
2.4.2. Área de olho de lombo e gordura de cobertura	42
2.4.3. Coloração instrumental da carne	42
2.5. Estudo metaloproteômico do tecido muscular.....	42
2.5.1. Procedimentos de extração e precipitação das proteínas.	44
2.5.2. Fracionamento do proteoma das amostras de músculo LT por 2D PAGE e tratamento de imagem	44
2.5.3. Determinação de minerais de spots proteicos do músculo LT.....	45
2.5.4. Caracterização dos spots proteicos por LC-MS/MS.....	45
2.5.5. Tratamento e análise de imagens	46
2.6. Análises estatísticas	46
3- RESULTADOS.....	47
4- DISCUSSÃO.....	49
5- CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	81
CAPÍTULO III	85
RESUMO	86
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	88

2.1. Confinamento experimental.....	88
2.2. Abate	90
2.3. Coleta de amostras do tecido hepático.....	90
2.4. Estudo metaloproteômico do tecido hepático.....	90
2.4.1. <i>Procedimentos de extração e precipitação das proteínas.</i>	<i>90</i>
2.4.2. <i>Eletroforese em gel bidimensional e tratamento de imagem</i>	<i>91</i>
2.4.3. <i>Determinação de minerais nas amostras de spots proteicos do tecido hepático.....</i>	<i>91</i>
2.4.4. <i>Caracterização dos spots proteicos por LC-MS/MS.....</i>	<i>92</i>
2.4.5. <i>Tratamento e análise de imagens</i>	<i>92</i>
2.5. Análises estatísticas	93
3. RESULTADOS.....	93
4. DISCUSSÃO.....	95
5. CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:	109
CAPÍTULO IV.....	112
IMPLICAÇÕES	113

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, sendo o maior exportador e segundo maior produtor de carne bovina (USDA, 2020), produzindo cerca de 9,9 milhões de toneladas ao ano (DEPEC, 2019), ficando em segundo lugar nas fontes de proteína animal produzidas no país, atrás somente da carne avícola. O consumo de carne bovina, segundo o Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos (2019), é estimado hoje em 31,5 kg/habitante/ano, representando uma parcela significativa como fonte proteica no país.

Dentre os alimentos, a carne vermelha é uma das fontes mais nutritivas usadas no consumo humano, sendo principalmente fonte de proteínas de alta qualidade, minerais, vitamina A e vitaminas do complexo B (ABERLE, 2001).

Considerado um alimento nobre, a carne sempre teve uma posição de destaque na mesa das famílias ocidentais, destacando-se entre os alimentos mais consumidos, apresentando alto teor e valor biológico de suas proteínas e quantidades significativas de vitaminas do complexo B e minerais como ferro e zinco, que atendem em grande parte às necessidades nutricionais humanas (BRASIL, 1988; HOLM & MOHL, 2000), além de fósforo, potássio, e magnésio (ROÇA, 2007). Sendo assim, dentre várias fontes alimentares existentes à disposição do homem, a carne é o alimento que sempre esteve presente durante toda evolução (RAMOS, 2008).

Com 21% de proteína em média, a carne bovina auxilia no suprimento das necessidades nutricionais de um humano, que se dá por 0,8g/kg de peso corporal, sendo necessária a ingestão de duas porções de carne diárias (125g/porção), se considerada como fonte proteica única para um adulto de aproximadamente 70 kg. Rica em aminoácidos, dentre eles pode-se destacar o triptofano, que auxilia na produção do hormônio do crescimento, na síntese proteica, estimula a secreção de insulina e regula mecanismos fisiológicos, sendo essencial para a produção do neurotransmissor serotonina (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004). Além disso, é capaz de fornecer também os outros oito aminoácidos essenciais de que o ser humano necessita, sendo eles: fenilalanina, valina, treonina, metionina, leucina, isoleucina, lisina e histidina.

Além disso, a carne transformou-se um alimento de grande consumo, podendo ser usada como indicador de desenvolvimento econômico. Observando que, com o crescimento econômico de um país, há também uma elevação no consumo de carnes e produtos cárneos. Nos EUA, o consumo de carnes, incluindo carne bovina, suína e de aves em 2006, foi estimado em 119,8 Kg/pessoa/ano (em equivalente carcaça), enquanto no Brasil este consumo é de 80,5 Kg/pessoa/ano (ANUALPEC, 2006).

Com o passar do tempo, vem aumentando a preocupação por produção de um alimento de melhor qualidade, tendo em vista, mudanças notórias no comportamento dos consumidores, havendo uma procura crescente por alimentos equilibrados do ponto de vista nutricional. O aumento da preocupação dos consumidores sobre os aspectos nutricionais dos alimentos resulta da constatação de que a dieta influencia diretamente na saúde (CARRANÇA, 2021), além de também levar em conta o modo como os animais são criados e abatidos. No futuro, a produção de carne vermelha sofrerá as alterações necessárias, impostas pelos consumidores e pelas entidades mundiais de saúde, para garantir um abastecimento de carne com qualidade e salubridade excelentes, mantendo um adequado binômio nutrição/saúde (LOPES, 2015).

Além disso, há outros dois fatores que interferem no consumo de carne: a preocupação com a saúde, como o aumento do colesterol por exemplo, e a preocupação de parte da população com o modo em que os animais são criados e abatidos

São poucos os estudos acerca da preferência do consumidor brasileiro, porem alguns aspectos são na compra de carne, por ordem de importância, segurança alimentar (onde a origem e a marca do produto são fundamentais), tipo e tamanho de corte, coloração, gordura de cobertura e maciez da carne. Portanto, o aspecto visual influencia muito. Geralmente o consumidor observa traços fenotípicos mais importantes como a cor da carne e tamanho do corte e, principalmente, a quantidade de marmoreio ou gordura intramuscular e gordura subcutânea, assim há maior possibilidade de predizer se a carne é macia e succulenta, (MAZZUCHETTI et al., 2004; CHARDULO et al. 2013; VEISETH-KENT, et al., 2018).

Mecanismos moleculares associados às possíveis diferenças fenotípicas na carne desses animais ainda são pouco avaliados. A informação proteômica gerada contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes às variações de características músculo esquelético bovino, como por exemplo, a variação do pH (POLETI, et al., 2018). Na literatura, é possível encontrar estudos sobre alterações moleculares associadas às características de qualidade de carne bovina como maciez e marmorização (SHEN *et al.*, 2012; OUALI *et al.*, 2013; BALDASSINI *et al.*, 2015). No entanto, mais estudos são necessários sobre essas importantes características de qualidade para indústria e consumidores.

A proteômica e/ou metalômica podem responder/esclarecer alguns mecanismos do organismo animal. A proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, como o nível de expressão, modificações pós-traducionais e interações, de modo a obter uma visão geral dos processos celulares (BINNECK, 2014). A metalômica, recente linha científica, permitiu a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos bioquímicos e fisiológicos. Assim, estudos metalômicos nos organismos vivos podem fornecer informações importantes sobre como

uma espécie metálica e/ou metalóide está distribuído e coordenado às proteínas, como também, sua essencialidade e/ou toxicidade, além de sua concentração individual, contribuindo assim no melhor entendimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das proteínas (GARCIA *et al.*, 2006). Inserido na metalômica, a “metaloproteômica”, estuda íons metálicos e/ou metalóides que estão complexados às proteínas e/ou enzimas (GARCIA *et al.*, 2006).

Nesse contexto a metaloproteômica permite a identificação/caracterização de proteínas biomarcadoras associadas aos macro e microminerais. O aumento ou diminuição de expressão dessas metaloproteínas e/ou *metal binding protein*, frente às diferentes estratégias nutricionais poderão contribuir para o melhor entendimento na composição do proteoma/metaloproteoma de bovinos.

1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 QUALIDADE DE CARNE

A qualidade da carne bovina é definida por diversos fatores, dentre eles, valor nutricional e aspectos sensoriais (ROTA *et al.*, 2004). O grupo genético, a categoria sexual (NOGALSKI *et al.*, 2018), e a dieta são frequentemente avaliados como influenciadores dessas características (NUERNBERG *et al.*, 2005), bem como na quantidade da gordura, no pH, na cor, e na presença de antioxidantes (REIS, 2017).

Os aspectos sensoriais, também conhecidos como características organolépticas, englobam atributos como cor, brilho, maciez, sabor, suculência, textura e odor e, mais além, aspectos relacionados à gordura, como cor, gordura de cobertura e marmoreio (FARMER & FARRELL, 2018). Consideram-se ainda fundamentais outros dois fatores para que a carne seja avaliada quanto à sua qualidade (LADEIRA *et al.*, 2019), sendo a sanidade definida como a carga mínima de contaminantes e patógenos exigidos por lei para carnes e embutidos, e a composição química, que refere-se aos parâmetros nutricionais envolvendo teores de proteína, vitaminas, minerais, e perfil de ácidos graxos, além da proporção de músculo e gordura. A composição química, bem como as características organolépticas, estão intimamente ligadas ao manejo nutricional ao qual os animais são submetidos, e relacionam-se também aos níveis de aceitabilidade do consumidor no momento da escolha do produto (FERREIRA *et al.*, 2019). Portanto, a qualidade da dieta interfere diretamente na qualidade da carne (BURGGRAAF *et al.*, 2020), e os estudos nessa área vem sendo constantemente explorados através de alternativas como o uso de coprodutos da indústria de milho (REIS *et al.*, 2019; ROEBER *et al.*, 2005) e aditivos alimentares (ORNAGHI *et al.*, 2020), (RABELO *et al.*, 2016).

Um dos principais indicadores de qualidade da carne avaliados na atualidade é o marmoreio, que representa a gordura intramuscular, encontrada no entremeio do corte cárneo. Existem diversas correlações entre o marmoreio e a palatabilidade da carne, tornando esta uma característica de importância econômica (PICARD & GAGAOUA et al., 2017), uma vez que influencia na escolha do consumidor (SMITH et al., 1988). Estudos anteriores associam diversos aspectos nutricionais à capacidade de deposição da gordura intramuscular, sendo o amido um importante nutriente utilizado pelo metabolismo lipogênico. Através da digestão, os ruminantes são capazes de transformar o amido que chega ao rúmen em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente ácido propiônico, também chamado de propionato, importante precursor da glicose. A glicose dá origem às moléculas de acetil-CoA, substrato da lipogênese. Sabe-se então que dietas contendo altos teores de amido tendem a aumentar o teor de marmoreio da carne (SMITH & GROUSE, 1984) e, nesse contexto, a inclusão de coprodutos como o farelo de glúten de milho podem potencialmente reduzir a gordura intramuscular, uma vez que possuem menores proporções de amido quando comparado ao milho.

Análises moleculares indicam a possibilidade da existência de biomarcadores da qualidade, que podem apresentar grande importância para a indústria da carne, a qual deve buscar satisfazer as expectativas e exigências dos consumidores visando agregar valor ao produto final. Nesse contexto, a proteômica, área de pesquisa que envolve a análise global de proteínas celulares, usando técnicas bioanalíticas como a eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e bioinformática, pode trazer resultados inovadores. Embora o perfil proteômico do músculo *longissimus thoracis* tenha sido relatado em estudos no Brasil (BALDASSINI et al., 2018; POLETI et al., 2018) e em outros países (SHEN et al., 2012), dados disponíveis na literatura sobre alterações no proteoma de bovinos, ainda são poucos, particularmente sobre mudanças no perfil de proteínas em bovinos de corte (RAMOS; KERLEY, 2014). Na raça Nelore essas dificuldades se tornam ainda maiores devido ao pequeno número de animais com esse fenótipo avaliado, além de pouco conhecimento sobre os parâmetros genéticos dessa característica na raça. Dessa forma, utilizar a proteômica como ferramenta para conhecer as proteínas e os processos bioquímicos envolvidos nos mecanismos que definem aspectos como a maciez e marmorização da carne podem auxiliar na complementação dos métodos quantitativos de melhoramento.

Estudos prévios com bovinos de corte terminados em confinamento, indicam que a inclusão do Farelo de Glúten de Milho na dieta pode aumentar a susceptibilidade de oxidação da carne com possíveis efeitos na estabilidade de cor, sabor, dentre outras características da carne, associadas a proteínas. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias de estudo utilizando ferramentas

1 proteômicas poderá contribuir significativamente na identificação e caracterização de proteínas
2 biomarcadoras associadas à características da carne.

3 Por fim, compostos e/ou formulações contendo minerais são de extrema importância quando
4 se avaliam características da carne. O fósforo, o potássio, o sódio e o magnésio são os minerais
5 presentes em maiores concentrações na carne bovina. Apesar do ferro não se encontrar entre os
6 minerais com maiores concentrações na carne, classifica-se como importante na carne bovina, pois
7 quando comparado com o obtido em alimentos de origem vegetal, o ferro de origem animal é
8 absorvido de 3 a 5 vezes mais rapidamente (LAWRIE, 2004). O zinco também encontra-se em
9 concentração considerável na carne bovina (3,5 mg 100 g⁻¹) satisfazendo 33% e 50% dos valores
0 diários, para homens e para mulheres, respectivamente (DOMENE, 2002). Diversos grupos
1 genéticos tiveram suas carnes avaliadas quanto ao teor de minerais, quando foram submetidos a
2 dietas com ou sem inclusão de gordura vegetal complexada com sais de cálcio e foram verificadas
3 diferenças significativas entre os teores de fósforo, magnésio e cálcio, enquanto os minerais
4 potássio e sódio não diferiram entre os grupos genéticos (JAEGER et al, 2004).

5 **1.2 FARELO DE GLÚTEN DE MILHO (DCGF)**

6 A grande extensão territorial e a variabilidade climática ao longo do ano fazem do Brasil um
7 país com sazonalidade produtiva de diversas culturas, o que leva a uma oscilação do preço dos
8 insumos utilizados na alimentação animal, principalmente de produtos como milho e soja. A
9 dinâmica da precificação desses produtos tem grande influência sobre os custos de produção da
0 carne bovina (VEIGA, 2017) e, por essa razão, diversos estudos buscam avaliar dietas alternativas,
1 que possibilitem a diminuição dos custos sem prejudicar a eficiência dos animais. Nesse contexto,
2 o uso de coprodutos vêm sendo amplamente difundidos na bovinocultura de corte.

3 O Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo, com 102 milhões de toneladas
4 produzidas na safra 2019/20, atrás dos Estados Unidos e da China, que produziram 346 e 260
5 milhões de toneladas respectivamente (USDA, 2020). Em razão da sua elevada produtividade e do
6 seu potencial de desenvolvimento de inúmeros novos produtos, o milho e seus produtos
7 secundários são amplamente empregados (STRAZZI, 2015).

8 Os produtos secundários são oriundos do processamento industrial, denominados
9 coprodutos, e são fontes de proteína, energia, fibra, vitaminas e minerais. O grão de milho é
0 processado e fermentado, originando amido e glicose para uso humano, e outros produtos como
1 farelo de gérmen, farelo de glúten de milho, e produtos da destilaria do milho (ELLIS, 1950).

A figura 1 representa o fluxograma do processamento do milho. A primeira parte do processo envolve a moagem, que pode ser seca ou úmida. Na moagem seca os grãos de milho são moídos integralmente, e posteriormente fermentados, gerando etanol e coprodutos oriundos do componente sólido da destilação. Na moagem úmida, conforme mostra a figura 1, o grão é inicialmente fracionado em seus componentes principais, como amido, proteína, fibra, e óleo, e o amido segue também para a produção de etanol (PAPAGEORGIOU et al., 2018; NICHOLS et al., 2006). A partir da moagem úmida, diversos produtos e coprodutos são gerados na indústria. O amido é considerado o produto primário, de maior importância comercial, e além de participar da indústria alcooleira, pode ser utilizado na indústria alimentícia, em suas formas processadas em glicose, maltodextrina e espessantes, utilizados para confeitaria, na indústria farmacêutica, produzindo aminoácidos e vitaminas, ou ainda na indústria têxtil, gerando embalagens e adesivos (MENEGETTI & DOMINGUES, 2008; PAPAGEORGIOU et al., 2018; NICHOLS et al., 2006).



Figura 1: Fluxograma do processo de moagem úmida do milho, com destaque para a obtenção do Farelo de Glúten de Milho. Adaptado de: Fernandes, 2003.

Ao chegar no tanque de maceração, o milho entra em contato com correntes contínuas de água sulfatada, que enfraquecem as ligações de enxofre entre o amido e a proteína, amolecendo o grão de milho. A água oriunda da maceração é separada da massa de grãos, e passa pelo processo de evaporação até atingir aproximadamente 50% de umidade. Um importante coproduto utilizado na alimentação animal e na agricultura é obtido através dessa água, chamado comercialmente de

Mazoferm® ou Milhocina® (MENEGETTI & DOMINGUES, 2008). Na fase seguinte, através de nova moagem, o gérmen é separado dos demais componentes, e posteriormente, após extração do óleo, o gérmen origina um outro coproduto, conhecido como gérmen desengordurado de milho ou torta de gérmen (MENEGETTI & DOMINGUES, 2008). A massa que sobra passa por mais um processo de moagem, no qual separam-se pericarpo e endosperma. O pericarpo é posteriormente misturado à água de maceração do milho e ao gérmen desengordurado, dando origem ao farelo de glúten 21 (MENEGETTI & DOMINGUES, 2008), utilizado no presente estudo.

Esse farelo é composto pela fibra em detergente neutro (FDN) do milho, glúten, o amido que não foi removido pela moagem, e os demais nutrientes da água de maceração e do gérmen desengordurado. O coproduto é comercializado sob o nome de Promill® ou Refinazil®, e consiste em $88,32 \pm 1,99\%$ de matéria seca, $23,33 \pm 2,47\%$ de proteína bruta, $3,81 \pm 0,96\%$ de extrato etéreo, $35,60 \pm 4,36\%$ de FDN (fibra em detergente neutro), $7,68 \pm 1,63\%$ de matéria mineral, e $15,67 \pm 4,62\%$ de amido na matéria seca. Existe ainda um outro coproduto utilizado na alimentação animal chamado de farelo de glúten de milho 60, oriundo do processo de separação do amido e do glúten presentes no endosperma do milho (MENEGETTI & DOMINGUES, 2008).

Existem alguns estudos avaliando o uso do farelo de glúten de milho, porém para vacas leiteiras. Boddugari et al. (2001) trabalharam em dietas com mistura de coprodutos do milho (farelo de glúten de milho, farelo de gérmen de milho, água de maceração e fontes de PNDR (proteína não degradável no rúmen)) que apresentavam teores de proteína bruta de 23%, FDN (fibra em detergente neutro) de 40% e extrato etéreo de 2,6% na matéria seca. Milho e farelo de soja foram os produtos substituídos pelo composto de coprodutos, em diferentes tratamentos, nos níveis de 0, 50, 75 e 100%. Foram encontrados resultados de redução no consumo de matéria seca (CMS) com a inclusão dos coprodutos, porém não houve diferença significativa na produção de leite. Weiss (2019) também avaliou o composto de coprodutos, assim como o tratamento com 100% de Boddugari et al., (2001) substituindo o concentrado controle pelos coprodutos, formando uma dieta com teor de FDN de 38% e amido de 21%, enquanto a dieta controle possuía teores de FDN e amido de 31%. Da mesma forma que Boddugari et al. (2001), foram encontradas reduções no CMS com a utilização dos coprodutos, porém com diferenças na produção de leite, reduzida em 2,3 kg no tratamento com coprodutos. Um outro estudo realizado por Mowrey et al. (1999) utilizou a substituição do milho e do farelo de soja (nas proporções de 25% e 50%) por mistura de coprodutos fibrosos (composto por farelo de glúten de milho 21, farelo de glúten de trigo e casca de soja) em dietas isoproteicas com teores de FDN crescentes à medida que aumentavam os coprodutos da dieta. Mowrey et al. (1991) não encontraram diferenças no CMS e na produção de

leite entre os tratamentos, porém foi verificada diferença significativa nos teores de gordura do leite, sendo maiores para os tratamentos com coprodutos.

Poucos são os estudos sobre o uso do farelo de glúten de milho 21 em dietas de bovinos de corte. Faltam estudos dessa natureza, e ainda análises que envolvam alterações na qualidade do produto final.

1.3.METALOPROTEÔMICA

A proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, como o nível de expressão, modificações pós-transducionais e interações, de modo a favorecer a visão geral dos processos celulares (BINNECK, 2014).

Diferente do genoma, o proteoma não é estático, podendo mudar com o desenvolvimento do organismo ou ser influenciado pelo ambiente externo. Definido como o conjunto de todas as proteínas existentes em um fenótipo molecular específico, que podem sofrer mudanças influenciadas pelo ambiente, portanto é possível obter-se mais informação do organismo estudando o extrato proteico (LANÇAS et al., 2003).

No campo da ciência da carne, a importância da proteômica é ilustrada por um grande número de artigos e análises sobre suas aplicações para caracterizar os mecanismos celulares e moleculares relacionados com a qualidade da carne, com o músculo esquelético no contexto da produção animal, ou com características biológicas e doenças dos animais (PICARD et al., 2010; D'ALESSANDO & ZOLLA, 2013; FRANCO et al., 2015).

Neste contexto, estudos proteômicos aplicados às características da carne bovina como maciez, pH, sabor, coloração, dentre outros, levaram nos últimos anos a um aumento substancial do conhecimento neste campo, confirmando o importante papel do metabolismo energético e da proteólise na conversão de músculo em carne. As descobertas cumulativas dão aos pesquisadores uma melhor compreensão das modificações post-mortem e do impacto no desenvolvimento da maciez da carne. O tipo de músculo e os efeitos da raça foram elucidados identificando vias biológicas que são específicas e independentes do tipo de músculo. Proteínas ligadas a funções biológicas específicas foram propostas como biomarcadores que poderiam ser aplicados no futuro para a previsão de rotina de maciez. Portanto, conhecimento e desenvolvimento de ferramentas de fenotipagem, fazendo uso desses biomarcadores, pode com o tempo ser usado por pecuaristas, criadores e indústrias do setor de carne bovina, seja em carcaças ou em animais vivos (PICARD; GAGAOUA, 2017).

O uso de técnicas como separação de proteínas pela técnica 2D PAGE e a caracterização Espectrometria de Massas (MS) representa uma estratégia de análise consolidada para avaliação

de alterações no proteoma (ZHAO et al., 2006; SUN et al., 2007; ZHANG et al., 2012). Sendo assim, as modulações nas dietas fornecidas aos animais podem alterar o proteoma do bovino, auxiliando em estratégias de suplementação alimentar e melhor entendimento de como esta prática pode afetar a produção animal (Figura 2).

1.3.1. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Embora os primeiros trabalhos utilizando a 2D PAGE são datados a partir de 1975, a 2D PAGE é muito utilizada no fracionamento de proteomas a partir de amostras complexas, atraindo os pesquisadores pelo seu alto poder de resolução, podendo fracionar, teoricamente, proteomas que apresentam até 10.000 *spots* por gel (O'FARREL, 1975; GARCIA et al., 2006; BALDASSINI et al., 2015).

Na 2D PAGE, a primeira dimensão do processo de fracionamento do proteoma, compreende a focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI) em fitas contendo géis com um determinado gradiente de pH. Em seguida, as fitas IEF são submetidas a um campo elétrico, provocando a migração das proteínas até uma faixa de pH referente ao seu ponto pI. Nessa faixa de pH, as proteínas ficarão com carga total neutra, interrompendo sua migração no gel da fita IEF (O'FARRELL, 1975, GARCIA et al., 2006). Na etapa seguinte (SDS-PAGE), as fitas IEF contendo as proteínas separadas em função dos respectivos pI, são tratadas com o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), o que confere carga negativa às estruturas das macromoléculas. As fitas IEF são transferidas em seguida, para o fronte de placas de vidro contendo gel de poliacrilamida, colocadas previamente no sistema de corrida eletroforético (cuba de vidro contendo tampão de corrida e fonte). Em seguida, aplica-se um campo elétrico ao sistema utilizando programação de tensão e corrente específica. Nessas condições, as proteínas por apresentarem cargas negativas, migram para o polo positivo, ocorrendo a separação das macromoléculas em função das suas respectivas massas moleculares. Posteriormente, os géis bidimensionais são tratados com solução corante (normalmente solução Coomassie blue coloidal) para revelação dos *spots* proteicos. Após lavagens sucessivas para remoção do excesso de corante, os géis são analisados quanto a repetibilidade e reprodutibilidade, número de *spots*, identificação da massa molecular e pI dos *spots* e expressão proteica, utilizando *softwares* específicos (GARCIA et al., 2006).

Essa técnica de separação é utilizada em estudos metaloproteômicos uma vez que é capaz de fracionar as proteínas e preservar a estrutura metaloproteica, possibilitando a posterior análise de mineirais por espectrometria de fluorescência de raio-x, como utilizado por MORAES et al. (2012),

e por espectrometria de absorção atômica, por VIEIRA et al., (2015). Sem a utilização da 2D-PAGE não seria possível mapear os possíveis minerais ligados às proteínas das amostras.

1.3.2. Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS)

A espectrometria de absorção atômica pode empregar como atomizadores chamas (FAAS) ou fornos de grafite (GFAAS), e a padronização interna pode ser aplicada em ambas as técnicas. A FAAS se baseia na aspiração e nebulização de uma solução, o aerossol gerado atingirá a chama onde ocorrerão os processos de atomização formando átomos gasosos no estado fundamental que absorvem parte da radiação emitida pela fonte, o restante da radiação é transmitida e direcionada para o sistema de seleção do comprimento de onda e, em seguida, ao detector. Pela relação logarítmica entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I_t) é calculada absorbância, a qual é proporcional à concentração (WELZ; SPERLING, 1999).

A GFAAS se baseia na injeção de uma alíquota fixa da amostra no interior de um tubo de grafite, a amostra é então submetida a um programa de aquecimento do atomizador constituído de quatro etapas: secagem, pirólise, atomização e limpeza. Na etapa de atomização a amostra é vaporizada formando a nuvem atômica contendo o analito, sendo que nesta etapa ocorre a absorção da radiação proveniente da fonte pelos átomos gasosos no estado fundamental (BUTCHER; SNEDDON, 1998). Ambas as técnicas são amplamente utilizadas na identificação de minerais em amostras biológicas.

1.3.3. Espectrometria de massas – MS

A espectrometria de massas tem se tornado uma ferramenta essencial na química de proteínas moderna, devido não apenas a sua sensibilidade, mas também ao conteúdo total de informações fornecido por esta técnica. Os espectrômetros de massas podem ser utilizados tanto para a simples determinação da massa molar de um polipeptídeo, quanto para a determinação da sequência de aminoácidos, identificação de novos biomarcadores, interações proteína-proteína e caracterização de modificações pós-traducionais (POTH et al., 2008; PICARIELLO et al., 2008).

Os espectrômetros de massas consistem em uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados. É um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando campos eletromagnéticos para isso.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) tem sido a técnica de escolha para separação, detecção e quantificação de uma série

de compostos e metabólitos, visto que é uma técnica com elevada sensibilidade e seletividade que permite atingir os níveis de concentração esperados.

Entre as técnicas de ionização a pressão atmosférica, a ESI é de longe a mais empregada em LC-MS e entre os motivos está a sua aplicabilidade. A ESI é compatível com moléculas de média a alta polaridade contendo grupos químicos passíveis de ionização, podendo ter massa molecular de até 100.000 Da. Desta forma, a ESI é empregada tanto para análise de pequenas quanto para grandes moléculas, como por exemplo as proteínas (HOLČAPEK; JIRÁSKO; LÍSA, 2012). Em um sistema de LC-MS, a fonte de ionização é a parte responsável por transferir a molécula a ser analisada da fase líquida para a fase gasosa, sendo que a molécula pode ou não já estar ionizada na fase líquida.

A ESI-MS tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas em estudos proteômicos, por apresentar alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra. Uma ampla variedade de amostras pode ser analisada quanto a presença de proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos (GROSS, 2011).

O processo electrospray pode ser descrito com relativa simplicidade. A produção de íons requer, essencialmente, dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas, quase a pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação da gota. Envolve a formação de um *spray* eletrolítico, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. É necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 kV) que esteja em contato com a solução contendo os eletrolíticos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. 50 a 100 µm) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 µL/min ou menores. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletrodo.

Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o eletrodo aumenta, provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha forma de cone e permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados (GROSS, 2011; GUERRERA & KLEINER, 2005). Esta versatilidade de técnicas MS, tem aumentado significativamente a gama de substâncias capazes de serem determinadas, possibilitando, por exemplo, que polipeptídeos possam ser analisados sem que haja sua decomposição (GOMEZ-ARIZA et al., 2004, GROSS et al., 2011; GUERRERA & KLEINER, 2005).

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Dentro do contexto da ciência animal, a composição nutricional está entre as mais estudadas. Isto não é surpreendente, diante da influência que as estratégias nutricionais têm sobre a rentabilidade da produção animal e sobre a composição e as características das proteínas de origem animal, particularmente e carne. Os trabalhos que são encontrados na literatura sobre o assunto, normalmente utilizam a proteômica como ferramenta para caracterizar o efeito de diferentes estratégias de alimentação na composição proteoma do músculo bovino de alto valor econômico, como o músculos longissimus (VEISETH-KENT, et al., 2018).

Algumas linhas de pesquisa têm surgido na literatura com diferentes termos e abordagens na última década, tomando como base o proteoma e o metaloproteoma de organismos vivos, destacando-se o “proteoma-proteômica”, “metaloma-metalômica/metaloproteômica”. Essas linhas de pesquisa buscam informações sobre as interações e conexões funcionais de espécies metálicas/metaloídes com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas do organismo e, portanto, a elucidação e o papel biológico dos íons metálicos ligados a essas biomoléculas (ESCOBAR; MIRANDA, 2001; GARCIA et al., 2006).

A elucidação das funções dos metais nos organismos tem proporcionado vários benefícios para a ciência. Principalmente os estudos das interações dos metais com as proteínas que vem cada vez mais tentando explicar as funções dos íons metálicos dentro do organismo, o papel biológico deles quando ligados às proteínas, as ativações ou inativações de enzimas entre outros, devido sua presença ou não. Alguns microelementos são conhecidos por serem essenciais como: Fe, Cu, Co, Mo, Zn, ou benéficos como: V, Cr, Ni, Se, B, ou por apresentarem toxicidade ao organismo, como: Hg, Cd e Pb (LOBINSKI et al., 2006).

Os biomarcadores da qualidade são de grande importância para a indústria da carne, a qual deve buscar satisfazer as expectativas e exigências dos consumidores visando agregar valor ao produto final. Para esses, a maciez e a suculência são os principais atributos de qualidade da carne (OUALI *et al.*, 2013). Nesse contexto, a proteômica e/ou metalômica, possibilita a análise global de proteínas celulares, metaloproteínas e/ou *metal binding protein* (proteínas metal ligante). Estudos sobre perfil metaloproteômico do músculo *Longissimus thoracis* foram relatados em estudos no Brasil (BALDASSINI et al., 2015; POLETI et al., 2018) e em outros países (SHEN et al., 2012). No entanto, dados disponíveis na literatura sobre alterações no proteoma/metaloproteoma de bovinos alimentados com subprodutos, ainda são poucos.

Mesmo que os íons metálicos constituam pequena porção do tecido corporal dos seres vivos (4%), estes são essenciais como componentes estruturais e em diversos processos vitais, com funções estruturais e funcionais (LIMA et al., 2010). Grande parte de todas as proteínas/enzimas requerem um íon metálico para serem capazes de realizarem suas funções. Esses desempenham papel funcional em numerosos processos bioquímicos e celulares. A interação metal/proteína determina suas propriedades químicas e atividades biológicas. As interações envolvem tanto a esfera de coordenação do íon metálico no sítio ativo da proteína (metaloproteína), quanto a ligação do metal em outros pontos de coordenações da macromolécula (*metal-binding protein*) (ROSATO; VALASATAVA; ANDREINI, 2016).

Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas são dependentes de um íon metálico para exercerem suas atividades biológicas. Muitos processos metabólicos, como conversão de energia, expressão gênica, processos catalíticos, entre outros, requerem a presença de um íon metálico específico. No aspecto funcional, por exemplo, podemos destacar o cobre e o zinco que atuam como catalisadores nos sistemas enzimáticos, por meio de ligações específicas em substratos, orientando e mediando reações de óxido-redução. No aspecto estrutural, por exemplo, pode-se destacar o complexo ferro-hemoglobina, o enxofre na tiamina e biotina, e o cálcio na formação dos ossos (GARCIA et al., 2006; LIMA et al., 2010; SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2011).

Na raça Nelore essas dificuldades se tornam ainda maiores devido ao pequeno número de animais com esse fenótipo avaliado, além de pouco conhecimento sobre os parâmetros genéticos dessa característica na raça (SANTANA et al., 2014). Dessa forma, utilizar a proteômica/metalômica como ferramentas para conhecer as proteínas e os processos bioquímicos envolvidos nos mecanismos que definem a maciez e marmorização da carne podem auxiliar na complementação dos métodos quantitativos de melhoramento.

Além dos dados moleculares, as pesquisas devem buscar avaliar características de importância econômica para o consumidor, como a coloração (aspecto visual), bem como maciez e suculência (CHARDULO et al., 2013). Em animais terminados em confinamento, a inclusão do Farelo de Glúten de Milho na dieta de terminação pode aumentar a susceptibilidade de oxidação com possíveis efeitos na estabilidade de cor, sabor, dentre outras características da carne, associadas a proteínas e minerais (Figura 2).

Assim, o desenvolvimento de novas estratégias de estudo utilizando ferramentas metaloproteômicas poderá contribuir significativamente na identificação e caracterização de proteínas biomarcadoras associadas a minerais e características da carne. E consequentemente, na

1 elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas que se conjugam com
2 minerais nos organismos vivos.

3 Com base no exposto, a presente pesquisa tem como objetivo investigar metaloproteínas e/ou
4 *metal binding protein* que tenham associação com características da carne como cor, força de
5 cisalhamento (maciez), pH ou marmorização em bovinos Nelore terminados em confinamento com
6 diferentes níveis de inclusão de subproduto (Figura 2).

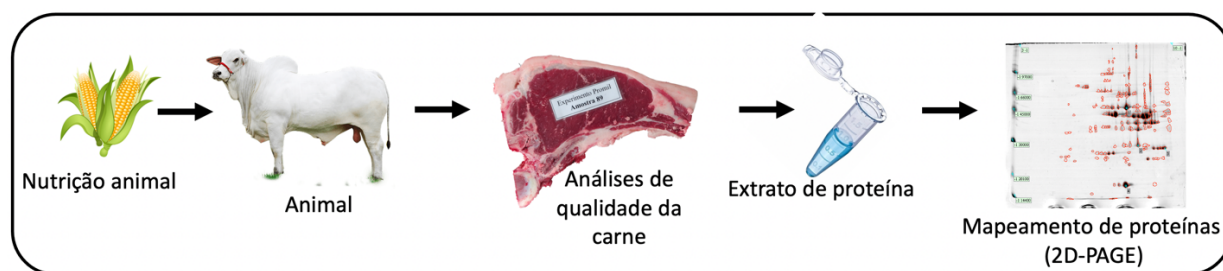


Figura 2: Fluxo de trabalho da estratégia proteômica 2D-PAGE adotada em bovinos.

7 Os resultados obtidos permitiram a redação de dois artigos: Capítulo II, intitulado -
8 **Metalproteômica aplicada na caracterização de *spots* proteicos associados a minerais em**
9 **Tecido Muscular (Ante e Pós *Rigor Mortis*) de Bovinos Nelore: Identificação De Possíveis**
0 **Biomarcadores.**

1 E Capítulo III, **Fracionamento metalproteômico do tecido hepático de Bovinos Nelore**
2 **terminados em confinamento.**

3 Estes serão submetidos a revista “**Food Chemistry**”, conforme as suas regras de publicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLE, E. D. Meat as food. In: Principles of Meat Science. [s.l.] Kendall/Hunt, 2001. p. 3.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO ESTADO DE GOIÁS/SEPLAN Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento Regional, Goiânia. Goiás. 2006.
- Baldassini, W. A., C. P. Braga, L. A. L. Chardulo, J. A. I. V. Silva, J. M. Malheiros, L. G. De Albuquerque, T. T. Fernandes, and P. D. M. Padilha. 2015. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). Food Chem. 169:65–72. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.131.
- BALDASSINI, W. A.; BONILHA, S. F. M.; BRANCO, R. H. ; VIEIRA, J. C. S. ; PADILHA, P. M. ; LANNA, D. P. D. . Proteomic investigation of liver from beef cattle (*Bos indicus*) divergently ranked on residual feed intake. MOLECULAR BIOLOGY REPORTS, v. 45, p. 2765-1773, 2018.
- BINNECK, E. As ômicas – Integrando a Bioinformação. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.32, p.28-37, 2014.
- Boddugari K, J GR, Stock R, Lewis M. Maximal replacement of forage and concentrate with a new wet corn milling product for lactating dairy cows. Journal of dairy science. 2001: p. 873-884.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 08 e 20 de 13 de dezembro de 1988. Estabelece os padrões para misturas minerais para bovinos. Brasília. 1988.
- Burggraaf VT, Craigie CR et al (2020) Effect of rearing diet and early post-weaning pasture quality on the life-time growth, meat quality, carcass traits and environmental impact of dairy-beef cattle. Livestock Science 239:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104031>.
- BUTCHER, D. J.; SNEDDON, J. A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry. New York: John Wiley, 1998. 250 p.
- CARRANÇA, T. Por que o consumo de carne bovina no Brasil deve voltar em 2021 ao patamar de décadas atrás. São Paulo: BBC News; 2021. [acesso 26 mar 2021]. Disponível em: [https://www.bbc.com/portuguese/brasil55664305#:~:text=Segundo%20dados%20da%20Conab%20\(Companhia,consumo%20j%C3%A1%20havia%20recuado%209%25](https://www.bbc.com/portuguese/brasil55664305#:~:text=Segundo%20dados%20da%20Conab%20(Companhia,consumo%20j%C3%A1%20havia%20recuado%209%25).
- Chardulo, L. A. L., A. C. Silveira, and F. Vianello. 2013. Analytical aspects for tropical meat quality assessment. In: G. P. P. Lima and F. Vianello, editors. Food Quality, Safety and Technology. Springer-Verlag Wien. p. 53–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1640-1>.
- D'Alessandro, A., Zolla, L., 2013. Meat science: from proteomics to integrated omics towards system biology. J. Proteomics 78, 558–577.
- DEPEC – DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS. Bradesco. Pecuária. 2019. Disponível em: . Acesso em: 11 out. 2021.
- Domene AMSA. Contribuição da carne bovina para uma alimentação saudável. 5º Congresso Brasileiro das Raças Zebuínas [online] 2002. [Acesso em 20 jul 2016]. Disponível em: <http://www.sic.org.br/PDF/Contribuicaodecarne.pdf>.

- Ellis NR, Bird HR. Byproducts as feed for livestock. *Yearbook of Agriculture*. 1950: p. 851-585.
- ESCOBAR, H.; MIRANDA, L. Depois do genoma, a corrida pelo proteoma. *O Estado de São Paulo*, 13/02/2001.
- Farmer LJ, Farrell DT (2018) Review: Beef-eating quality: A European journey. *Animal* 12:2424-2433. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001672>.
- Ferreira, M. S., Tomaz, L. A., Niehues, M. B., Ladeira, M. M., Curi, R. A., Chardulo, L. A., Baldassini, W.A., Martins, C. L., Arrigoni, M. B. & Neto, O. R. M. (2019). The inclusion of de-oiled wet distillers grains in feedlot diets reduces the expression of lipogenic genes and fat content in Longissimus muscle from F1 Angus-Nellore cattle. *PeerJ*, 7, e7699.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F.J., Lopez-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Parrado, M., Gallardo, J.M., Zapata, C., 2015. Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *J. Proteomics* 122, 73.
- GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15, 2006.
- GOMEZ-ARIZA, J. L.; GARCIA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; BERNAL, V.; VILLEGAS, M. J.; OLIVEIRA, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems, *Analytica Chimica Acta*, v. 524, p. 15-22, 2004.
- GROSS, J. Electrospray Ionization. In: Gross, J. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2.ed. *Springer*, p.560-620, 2011.
- GUERRERA, I. C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience Reports*, v. 25, p. 71-93, 2005.
- HOLČAPEK, Michal; JIRÁSKO, Robert; LÍSA, Miroslav. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1259, p. 3-15, 2012.
- Holm, L. & Mohl, M. (2000). The role of meat in everyday food culture: an analysis of an interview study in Copenhagen. *Appetite*, 34(3), 277-283.
- Jaeger SMPL, Dutra AR, Pereira JC, Oliveira ISC. Características da Carcaça de Bovinos de Quatro Grupos Genéticos Submetidos a Dietas com ou sem Adição de Gordura Protegida. *R Bras Zootec*. 2004;33(6):1876-87.(Supl. 1).
- Ladeira MM (2019) Performance, beef quality and expression of lipogenic genes in young bulls fed low-fat dried distillers grains. *Meat Science* 160. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107962>.
- LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, B. M. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v.6, p.60-66, 2003.
- Lawrie RA. *Ciência da carne*, 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. 384p.
- Lima, P. M., de CF Neves, R., Dos Santos, F. A., Pérez, C. A., Da Silva, M. O., Arruda, M. A., ... & Padilha, P. M. (2010). Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: preliminary results. *Talanta*, 82(3), 1052-1056.
- LOBINSKI, R.; MOULIN, C.; ORTEGA, R. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1591-1604, 2006.

- Lopes, A. F. (2015). Efeito de diferentes métodos de confecção no valor nutricional da carne de bovino: estudo experimental nas carnes Barrosã e Mertolenga.
- Mazzuchetti, Roselis Natalina; Batalha, Mário Otávio. O comportamento do consumidor em relação ao consumo e às estruturas de comercialização da carne bovina na região de Amerios/PR. **Revista Varia Scientia**, v. 4, p. 9-23, 2004.
- Meneghetti CDC, Domingues JL. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. *Revista eletrônica nutritime*. 2008: p. 512-536.
- Moraes, P. M.; Santos, F. A.; Padilha, C. C. F.; Vieira, J. C. S.; Zara, L. F.; Padilha, P. M.; A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research* 2012, 150, 195.
- Mowrey A, Ellersieck MR, Spain JN. Effect of fibrous by-products on production and ruminal fermentation in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 1999: p. 2709- 2715.
- Nichols NN, Dien BS, Bothast RJ, Cotta MA. The corn ethanol industry. In Minteer S. *Alcoholic fuels*.: Taylor & Francis; 2006.
- Nogalski Z, Pogorzelska-Przybyłek P, Sobczuk-Szul M, Nogalska A, ModzelewskaKapituła M, Purwin C (2018) Carcass characteristics and meat quality of bulls and xviii steers slaughtered at two different ages. *Italian Journal of Animal Science* 17:279– 288. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1383861>.
- Nuernberg K, Dannenberger D, Nuernberg G, Ender K, Voigt J, Scollan ND, Wood JD, Nute GR, Richardson RI. Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livest Prod Sci*. 2005; 94(1-2):137-47. doi:10.1016/j.livprodsci.2004.11.036.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.
- Ornaghi MG, Guerrero A, Vital ACP, Souza KA, Passetti RAC, Mottin C, Araújo Castilho R, Sañudo C, Prado IN (2020) Improvements in the quality of meat from beef cattle fed natural additives. *Meat Science* 163:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108059>.
- Ouali, A., M. Gagaoua, Y. Boudida, S. Becila, A. Boudjellal, C. H. Herrera-Mendez, and M. A. Sentandreu. 2013. Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci*. 95:854–870. doi:10.1016/j.meatsci.2013.05.010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.010>.
- Papageorgiou M, Skendi A. Introduction to cereal processing and by-products. In *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products*.: Woodhead Publishing; 2018. p. 1-25.
- Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T., Terlouw, C., 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Brief Funct. Genomics* 9, 259–278.
- PICARD, Brigitte; GAGAOUA, Mohammed. Proteomic investigations of beef tenderness. **Proteomics in food science**, p. 177-197, 2017.
- PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; MAMONE, G.; ROEPSTORFF; ADDEO, F. Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics*, v. 8, p. 3833-3847, 2008.

- Poleti, M. D., Moncau, C. T., Silva-Vignato, B., Rosa, A. F., Lobo, A. R., Cataldi, T. R., ... & de Carvalho Balieiro, J. C. (2018). Label-free quantitative proteomic analysis reveals muscle contraction and metabolism proteins linked to ultimate pH in bovine skeletal muscle. *Meat science*, 145, 209-219.
- POTH, A. G.; DEETH, H. C.; ALEWOOD, P. F.; HOLLAND, J. W. Analysis of the human casein phosphoproteome by 2-D electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS reveals new phosphoforms. *Journal of Proteome Research*, v. 7, p. 5017-5027, 2008.
- Rabelo CHS, Basso FC, McAllister TA, Lage JF, Gonçalves GS, Lara EC, Oliveira AA, Berchielli TT, Reis RA (2016) Influence of *Lactobacillus buchneri* as silage additive and forage: Concentrate ratio on the growth performance, fatty acid profile in longissimus muscle, and meat quality of beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 96:550–562. <https://doi.org/10.1139/cjas-2015-0161>.
- RAMOS MH, KERLEY MS (2014) Mitochondrial complex I protein differs among residual feed intake phenotype in beef cattle. *J Anim Sci* 91:3299–3304. <https://doi.org/10.2527/jas2012-5589>.
- Ramos, O. (2008). Efeito combinado da raça e do sistema de produção na qualidade nutricional da fração lipídica da carne de borrego e de cabrito. Dissertação para a obtenção do grau de mestre, apresentada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.
- Reis VA, Reis RA, Araújo TLDR, Lage JF, Teixeira PD, Gionbelli TRS, Lanna DP, Ladeira MM (2019) Performance, beef quality and expression of lipogenic genes in young bulls fed low-fat dried distillers grains. *Meat Science* 160. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107962>.
- Reis, R. C. D. (2017). Qualidade nutricional da carne de tourinhos nelore e ½ angus-nelore terminados em confinamento ou em pastagem com suplementação.
- ROÇA, R. O. Composição Química Da Carne - Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, 2007.
- Roeber DL, Gill RK, DiCostanzo A (2005) Meat quality responses to feeding distiller's grains to finishing Holstein steers. *Journal of Animal Science* 83:2455–2460. <https://doi.org/10.2527/2005.83102455x>.
- ROSATO A, VALASATAVA Y, ANDREINI C (2016) Minimal Functional Sites in Metalloproteins and Their Usage in Structural Bioinformatics. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17050671.
- ROSSI, L.; TIRAPGUI, J. Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 227-233, 2004.
- Rota EL, Osório MTM, Osório JCS, Oliveira NM, Barboza J, Kasinger S. Efeitos do cruzamento de carneiros da raça Texel com ovelhas Corriedale e Ideal sobre a qualidade da carne. *Rev Bras Agrociênc*. 2004;140(4):487-91.
- SANTANA, M. H. A. et al. Genetic parameter estimates for feed efficiency and dry matter intake and their association with growth and carcass traits in Nellore cattle. **Livestock Science**, v. 167, p. 80–85, set. 2014.
- SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PEREZ, C. A.; DA SILVA, M.A.O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R., PADILHA, p. M. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results.. *Mikrochimica Acta* , v. 173, p. 43-49, 2011.

- Shen, Y. N., S. H. Kim, D. H. Yoon, H. G. Lee, H. S. Kang, and K. S. Seo. 2012. Proteome analysis of bovine Longissimus dorsi muscle associated with the marbling score. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 25:1083–1088. doi:10.5713/ajas.2012.12127.
- Silva, F. A., B. Cavecci, W. A. Baldassini, P. M. Lima, P. M. Moraes, P. S. Roldan, C. C. F. Padilha, and P. M. Padilha. 2013. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Food Meas. Charact.* 7. doi:10.1007/s11694-013-9151-6.
- Smith G, Savel J, King G, Carpenter Z (1988) Laboratory manual for meat science. American Press.
- Smith SB, Grouse AD (1984) Relative Contributions of Acetate , Lactate and Glucose to Lipogenesis in Bovine Intramuscular and Subcutaneous Adipose Tissue. *The Journal of Nutrition* 114:792–800.
- STRAZZI, S. Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. **Revista Visão Agrícola–USP/ESALQ**, n. 13, p. 146-150, 2015.
- Sun, Y.; An, S.; Henrich, V.C.; Sun, X.; Song, Q. Proteomic identification of PKC-mediated expression of 20E-induced protein in *Drosophila melanogaster*. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 4478 4488.
- United State Departament of Agriculture. AGRICULTURAL STATISTICS: GRAIN AND FEED. 2020.
- VEIGA, A.G.C. Comportamento ingestivo de bovinos confinados alimentados com grãos úmidos de destilaria. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. São Paulo. 2017. DISPONÍVEL EM: veiga_agc_me_botfca.pdf (408.2Kb) [ACESSO EM: 03/09/2020].
- Veiseth-Kent, E., de Almeida, A. M., Picard, B., & Hollung, K. (2018). Proteomics in Skeletal Muscle Research. In *Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology* (pp. 195 217). Springer, Cham.
- Vieira, J. C. S.; Cavecci, B.; Queiroz, J. V.; Braga, C. P.; Padilha, C. C. F.; Leite, A. L.; Figueiredo, W. S.; Buzalaf, M. A. R.; Zara, L. F.; Padilha, P. M. Archives of environmental contamination and toxicology 2015, 69, 422.
- Weiss WP. Effects of feeding diets composed of corn silage and a corn milling product with and without supplemental lysine and methionine to dairy cows. *Journal of dairy science.* 2019: p. 2075 2084.
- WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic absorption spectrometry. 3rd ed. Weinheim: Wiley/VCH, 1999. 941 p.
- Zhang, G.E.; Zhang, W.; Qui, X.; Baohua, X. Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.156, p.201-210, 2015.
- Zhao, X. F.; He, H. J.; Dong, D. J.; Wang, J. X. Identification of differentially expressed proteins during larval molting of *Helicoverpa armigera*. *Journal of proteome research.* , v.5, p.164–169, 2006.

CAPÍTULO II

METALOPROTEÔMICA APLICADA NA CARACTERIZAÇÃO DE *SPOTS* PROTEICOS ASSOCIADOS A MINERAIS EM TECIDO MUSCULAR (ANTES E PÓS *RIGOR MORTIS*) DE BOVINOS NELORE: IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES

RESUMO

Apresentando alto teor biológico de proteínas e minerais, a carne bovina é considerada um alimento nobre, tendo o Brasil uma posição de destaque entre os maiores produtores/consumidores mundiais deste alimento. A preocupação com a eficiência e a produção de um alimento de melhor qualidade vem aumentando, sendo a fase de terminação em confinamento uma estratégia do setor. A fim de minimizar custos, é constante a busca por dietas alternativas, incluindo diferentes subprodutos da indústria, como o Farelo de Glúten de Milho. Nos estudos de qualidade da carne em bovinos, a metaloproteômica apresenta-se como estratégia importante na identificação de biomarcadores de minerais associados às proteínas, contribuindo na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes níveis de Farelo de Glúten de Milho (DCGF – “*Dry Corn Gluten Feed*”) na dieta de terminação de bovinos Nelore, machos, não castrados, sobre características da qualidade da carne e do metaloproteoma do tecido muscular e da carne. As dietas experimentais foram compostas de diferentes níveis de inclusão de DCGF (0%, 18%, 36% e 54%) em substituição ao milho grão. Após a coleta das amostras biológicas, foi obtido o proteoma por 2D PAGE, realizadas análises de expressão dos *spots* proteicos, e identificação das proteínas por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS/MS). Após isso, foram determinados os minerais por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS). Por fim, estudos de bioinformática através de softwares específicos foram utilizados para identificar os níveis funcionais, vias metabólicas e interações metal-proteína. Os resultados mostraram diferenças na expressão de proteínas do tecido muscular e da carne, porém sem alteração de coloração e maciez nas análises de qualidade. Os minerais avaliados mostraram comportamento semelhante nos diferentes tratamentos, exceto o cobre e o magnésio que se tornaram mais expressivos nos *spots* conforme aumentou-se o nível de inclusão do subproduto na dieta. Maiores inclusões de DCGF (54%) aumentaram ligeiramente a gordura de cobertura do músculo *Longissimus thoracis* (LT). A inclusão de DCGF nas dietas de terminação aumentou a ingestão de matéria seca, o ganho de peso diário, e o peso corporal final de bovinos Nelore, indicando que o uso do Farelo de Glúten de Milho seco é uma alternativa viável para inclusão na dieta quando se trata desses parâmetros, uma vez que não afetou negativamente o produto final.

Palavras-chave: qualidade de carne, metaloproteômica, proteômica, 2D-PAGE, GFAAS, LC-MS/MS.

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente geração de subprodutos advindos da extensa produção de milho no Brasil, existe um grande interesse na utilização do DCGF em confinamentos brasileiros, como estratégia de redução de custos. Além disso, a maioria dos animais confinados no país são da raça Nelore, que se apresentam como mais suscetíveis à acidose segundo Pacheco et al. (2012), o que torna necessário encontrar dietas alternativas que possibilitem ganhos consideráveis, sem prejuízos à saúde animal.

O DCGF é um subproduto gerado na indústria de moagem do milho, processo no qual o grão de milho tem seus componentes (amido, fibra, germe) separados (HAM et al., 1995), sendo atraente para a nutrição de ruminantes por ser rico em proteínas (24,5%) e fibras (43% FDN), mas com baixos teores de amido (12,7%) e gordura (5,04%). A maior parte da proteína do DCGF é degradada no ambiente ruminal, e essa fração proteica tem características semelhantes às do farelo de soja (FIRKINS et al., 1985). Por ser um subproduto seco, o DCGF tem maior vida útil quando armazenado, o que o torna mais viável para transporte de longa distância e clima tropical.

Estudos indicaram que o pH ruminal tende a ser mais alto em animais alimentados com DCGF em comparação com animais alimentados com milho (FIRKINS et al. 1985; KAMPMAN e LOERCH 1989; KREHBIEL et al. 1995). Este pode ser um importante caminho para dietas de menores desafios metabólicos, uma vez que a acidose ruminal aguda indica um estado prejudicial ao animal, definido pela diminuição do pH sanguíneo e do bicarbonato. Quando o pH ruminal é inferior a 5,0, os animais apresentam depressão, perda de apetite, redução da ruminação, diarreia e desidratação. O metabolismo microbiano e a digestão dos alimentos também são afetados, podendo levar a outros processos inflamatórios no organismo. Sendo assim, em dietas com alto teor de concentrado, parte do milho pode ser substituída por este subproduto e, como consequência, reduzir a concentração de amido no ambiente ruminal proporcionando menor incidência de acidose, principalmente a subclínica (KREHBIEL et al., 1995).

Além da preocupação com a dieta dos animais, uma grande preocupação é o que chega ao prato do consumidor. Com o intuito de entender melhor os mecanismos subjacentes à maciez da carne bovina e fornecendo dados substanciais em termos de potenciais biomarcadores de proteína associados às vias de maciez e sua previsão, a proteômica surgiu como uma estratégia bem definida que, por meio da caracterização detalhada de todo o proteoma do músculo esquelético bovino, possibilita entender melhor os mecanismos por trás

1 das características da carne (GAGAOUA, BONNET, & PICARD, 2020; PICARD &
2 GAGAOUA, 2017; WU et al., 2015). Esses biomarcadores pertencem a vias biológicas
3 diferentes, mas interconectadas, que refletem reações de estresse e estresse oxidativo,
4 metabolismo energético, miofibrila e estrutura muscular, apoptose, transporte, sinalização e
5 proteólise (GAGAOUA, HUGHES, et al., 2020; OUALI et al., 2013; PICARD e GAGAOUA,
6 2020).

7 Neste contexto, PICARD & GAGAOUA (2020) durante os últimos anos, fizeram um
8 progresso significativo na busca para identificar biomarcadores confiáveis de maciez da carne
9 bovina. Os biomarcadores da qualidade são de grande importância para a indústria da carne,
10 a qual deve buscar satisfazer as expectativas e exigências dos consumidores visando agregar
11 valor ao produto final. Para esses, a maciez e a suculência são os principais atributos de
12 qualidade da carne (OUALI et al., 2013).

13 Ligado a isso, estudos relacionados com as funções dos minerais nos organismos
14 proporcionaram a introdução na ciência de uma nova área científica, a metalômica (GARCIA
15 et al., 2006). Nas últimas décadas, diversos estudos metalômicos permitiram um melhor
16 entendimento dessas funções, bem como o papel biológico dos minerais quando ligados à
17 proteínas, e as ativações ou inativações de enzimas devido a presença ou não de um mineral
18 específico (LIMA et. al., 2010; MORAES et al., 2012; BALDASSINI et al., 2015).

19 Sabe-se que mais de 30% de todas as proteínas utilizam-se de um ou mais minerais para
20 desempenhar sua função (CARAPELLI et al., 2020). São chamadas holoproteínas ou
21 proteínas conjugadas aquelas que possuem componentes químicos ligados aos seus
22 aminoácidos, no presente estudo dando ênfase ao grupo das metaloproteínas. Segundo
23 Crichton (2008), há cerca de 25 elementos na tabela periódica que são requeridos em sistemas
24 biológicos. Dentre eles, alguns são encontrados em concentrações significativas na carne de
25 bovinos, conforme relatou MATOS et al. (2009). São eles: cálcio, cobre, ferro, magnésio,
26 manganês, e zinco, direcionando a pesquisa em questão, que visou mapear a presença desses
27 seis minerais ligados à proteínas existentes no tecido muscular e na carne de bovinos,
28 buscando entendimento dos processos metabólicos aos quais se relacionam, e como diferenças
29 na dieta podem gerar alterações no seu perfil.

30 Na literatura, não existem estudos que investiguem as possíveis alterações no perfil
31 proteômico/metaloproteômico da carne de zebuínos terminados com dietas contendo DCGF.

32 Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes níveis de
33 DCGF na dieta de terminação de bovinos Nelore sobre características da qualidade da carne
34 e no metaloproteoma do tecido muscular e da carne. Considerando tecido muscular as

amostras coletadas no momento do abate (*ante rigor mortis*) e carne as amostras coletadas 24 horas após o abate (*post rigor mortis*).

Sendo os objetivos específicos:

1. Avaliar o impacto da dieta ofertada na qualidade da carne (uso de Farelo de Glúten de Milho em diferentes níveis (%) de inclusão);
2. Identificar possíveis proteínas biomarcadoras relacionadas com a dieta e fatores da qualidade da carne;
3. Estudar o impacto das diferentes dietas ofertadas no metaloma do tecido muscular e da carne;
4. Mapear os minerais cálcio e magnésio (macrominerais) e cobre, ferro, manganês e zinco (microminerais) nas proteínas que apresentarem diferença de expressão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com os animais seguiram os padrões éticos de pesquisa (PROTOCOLO - CEUA 0203/2018), estabelecidos pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Campus de Botucatu.

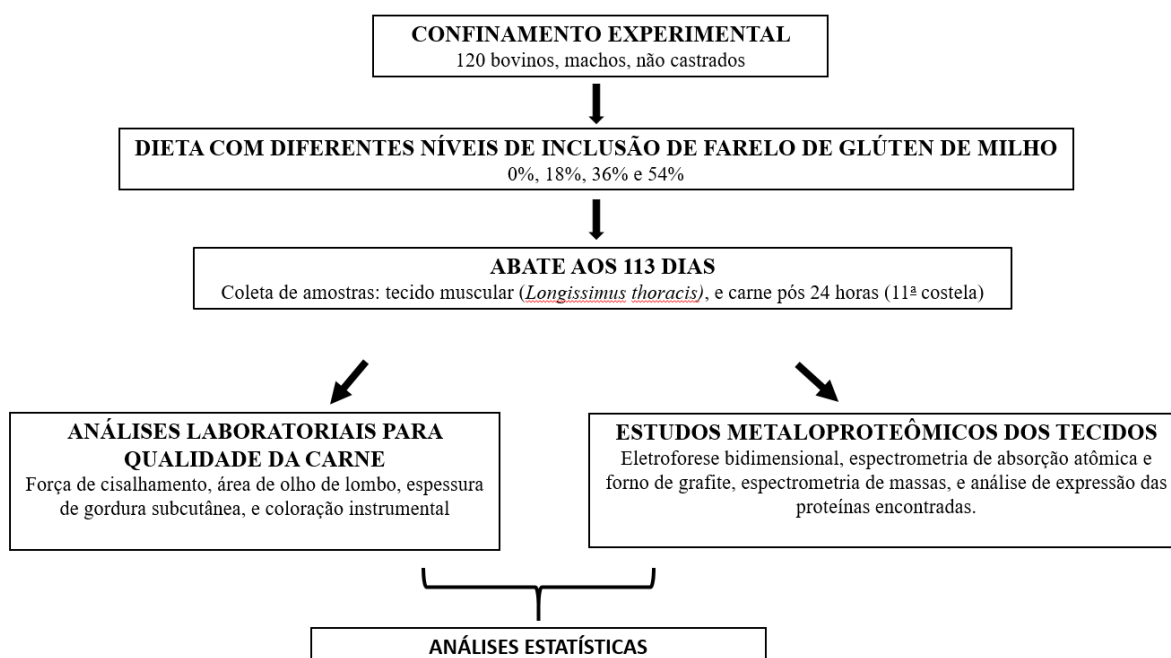


Figura 1: Fluxograma da metodologia do estudo.

2.1. Confinamento experimental

O estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Botucatu, no confinamento experimental do Departamento de Melhoramento de Nutrição Animal, entre os meses de Agosto a Dezembro de 2018. Foram utilizados 120 bovinos, machos não castrados, Nelore, com peso médio inicial de 361 kg, oriundos de pastagem, do mesmo rebanho. Os animais foram mantidos em baias com piso de concreto equipadas com bebedouro tipo concha com dimensionamento de 5 x 6 metros e área de cocho de 3,75 m, tendo uma lotação de cinco animais por baia.

Os animais foram alocados aleatoriamente nos tratamentos com diferentes níveis de Farelo de Glúten de Milho (0; 18%; 36% e 54% da MS) em dietas contendo cerca de 86,78% de concentrado e 13,22% de volumoso (Tabela 1). Os tratamentos foram fornecidos duas vezes ao dia em horários fixos, no período da manhã (10h) e da tarde (16h). No total, cada tratamento foi distribuído aleatoriamente em 5 baias e semanalmente foi coletado amostras dos ingredientes do concentrado e do feno. Para determinação do consumo de matéria seca e eficiência alimentar a unidade experimental será a baia. Os animais foram pesados no início e ao fim do período do experimento, depois de jejum alimentar e hídrico de 16 horas. As pesagens intermediárias foram conduzidas sem jejum. Para obtenção do consumo diário de matéria seca, a dieta ofertada e as sobras foram pesadas, e amostras destes, coletadas, para determinação do teor de matéria seca.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingredientes e composição da dieta (%MS)	Níveis de DCGF (% MS)			
	0	18	36	54
Bagaço da cana-de-açúcar	13.22	13.23	13.2	13.24
Milho moído	71.34	59.95	47.38	29.34
Farelo de soja	11.89	5.4	0	0
Farelo de Glúten de Milho	0	18	36	54
Núcleo de vitaminas e minerais ¹	3.42	3.42	3.42	3.42
Cloreto de Potássio	1.3	0	0	0
Matéria seca (% da dieta)	84.24	84.16	84.1	83.92
Proteína Bruta (PB)	13.08	13.3	13.98	16.97
Extrato Etéreo (EE)	3.3	3.63	3.92	4.07

Fibra em detergente neutro (FDN)	18.62	24.69	30.75	37.09
Carboidratos não fibrosos (CNF) ²	62.06	54.92	47.29	36.89
Amido	46.05	40.72	34.71	25.52
Cinzas	2.93	3.46	4.05	4.99
ELg (Mcal / kg MS) ³	1.3	1.25	1.32	1.32

¹Núcleo de vitaminas e minerais contendo: 19,5% de Ca; 1,9% S; 1,5% Mg; 4,5% Na; 1,6% P; 1715 ppm Zn; 1285 ppm Mn; 428 ppm Cu; 25 ppm I; 5,7 ppm Se; 8,5 ppm Co; 286 ppm Fe; 86.000 UI Vit A; 115.000 UI Vit D3; 128.000 UI Vit E; 0,39% de uréia; 945 ppm de monensina sódica.

²Estimado pela equação CNF = 100 - (% PB +% EE +% cinza +% FDN).

³Energia líquida para valores de ganho, calculados a partir de dados de desempenho usando equações de requisitos de energia para manutenção e ganho de peso de acordo com Zinn e Shen (1998).

2.2. Abate e características de carcaça

O abate dos animais foi realizado em frigorífico comercial, sob procedimentos normais de inspeção federal, sendo precedido de jejum de sólidos e líquidos dos animais por no mínimo 16 horas. As carcaças foram identificadas, lavadas, divididas em duas metades, sendo estas pesadas individualmente e levadas à câmara fria, por aproximadamente 24 horas, à temperatura de 1° C. A área do músculo LT e espessuras de gordura subcutânea no lombo e na garupa foram medidas. As mensurações nas carcaças foram: área de olho de lombo e espessura de gordura subcutânea, sendo os últimos mensurados após o resfriamento.

2.3. Coleta de amostras do tecido muscular (*Longissimus thoracis*)

Para análise qualitativa da carne, foi retirada parte do LT a partir da 11ª costela 24 horas após o abate (*post rigor mortis*). Esta foi dividida em 8 sub-amostras (1 a 7) de 30 mm de espessura cada, embalada à vácuo, congelada e transportada para determinação das características de qualidade de carne. Precisamente entre as 12ª e 13ª costelas, foram mensuradas a área de olho de lombo (AOL), gordura de cobertura e cor. Também foram determinadas a força de cisalhamento, perdas por cocção e índice de fragmentação miofibrilar da carne não maturada (dia 0).

Amostras do músculo LT utilizadas no estudo metaloproteômico foram coletadas imediatamente ao abate (*ante rigor mortis* - na carcaça quente), e *post rigor mortis* (carne) congeladas em nitrogênio líquido e transportadas para o laboratório de metalômica (item 1.6). Posteriormente, as amostras foram mantidas congeladas em freezer a -80° C até a utilização nos experimentos de quantificação dos minerais e metaloproteômicos.

2.4. Qualidade de carne

2.4.1. Força de cisalhamento

Para a realização do ensaio foi adotado o procedimento padronizado e proposto por Wheeler et al. (1996) e Shackelford et al. (1999). Brevemente, as amostras foram assadas até atingirem temperatura interna de 71°C. Na determinação da força de cisalhamento (FC) foi utilizado o equipamento *SALTER Warner-Bratzler Shear Force* (G-R Manufacturing), mecânico com capacidade de 25 kg e velocidade de seccionamento de 20 cm/minuto. O *shearing* foi realizado em cilindros de ½ polegada, retirados da região central da amostra em sentido longitudinal às fibras musculares. Foram feitas de seis a oito medidas por amostra a fim de se obter maior precisão nos resultados obtidos que foram expressos, neste ensaio, em quilogramas (kg).

2.4.2. Área de olho de lombo e gordura de cobertura

Para a determinação da AOL e espessura de gordura subcutânea (EGS) foram utilizadas as amostras avaliadas quanto à força de cisalhamento. A AOL foi determinada pelo método do quadrante de pontos (cm²), e a EGS foi medida com paquímetro e expressa em milímetros (mm).

2.4.3. Coloração instrumental da carne

A coloração da carne (L^* - luminosidade; a^* - coloração vermelho; b^* - coloração amarelo) foi mensurada a partir do sistema *CIE* lab utilizando-se um colorímetro KONICA MINOLTA - CR 400 (*Konica Minolta Sensing, Inc., Tokyo, Japan*). A unidade foi calibrada utilizando-se uma placa para o padrão preto e branco e assim foi determinada a média de três medidas tomadas em diferentes regiões do LT, sempre com ao menos 30 min de exposição da amostra sob refrigeração de 2 a 5°C - *blooming time*. O índice colorimétrico *Chroma* (quantidade de cor ou saturação de cor) foi calculado pela equação $[(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0.5}$ a matriz (coloração real) a partir da fórmula $[\tan^{-1} (b^*/a)]$ (CAÑEQUE et al., 2004; PFLANZER & FELÍCIO, 2011).

2.5. Estudo metaloproteômico do tecido muscular

Estudos metaloproteômicos utilizando eletroforese bidimensional (2D-PAGE), espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS) e

cromatografia líquida–espectrometria de massa (LC-MS/MS) foram conduzidos para fracionar o metaloproteoma das amostras de músculo LT e caracterizar os *spots* proteicos associados aos minerais e sua possível associação com as características do tecido muscular LT.

Com base nos resultados das características de qualidade de carne, os animais dos tratamentos controle *versus* Farelo de Glúten de Milho (18, 36 e 54%) foram selecionados para a abordagem metaloproteômica (Figura 2). Para isso, *pool* de amostras do músculo LT dos animais que receberam essas dietas foram utilizadas no estudo metaloproteoma.

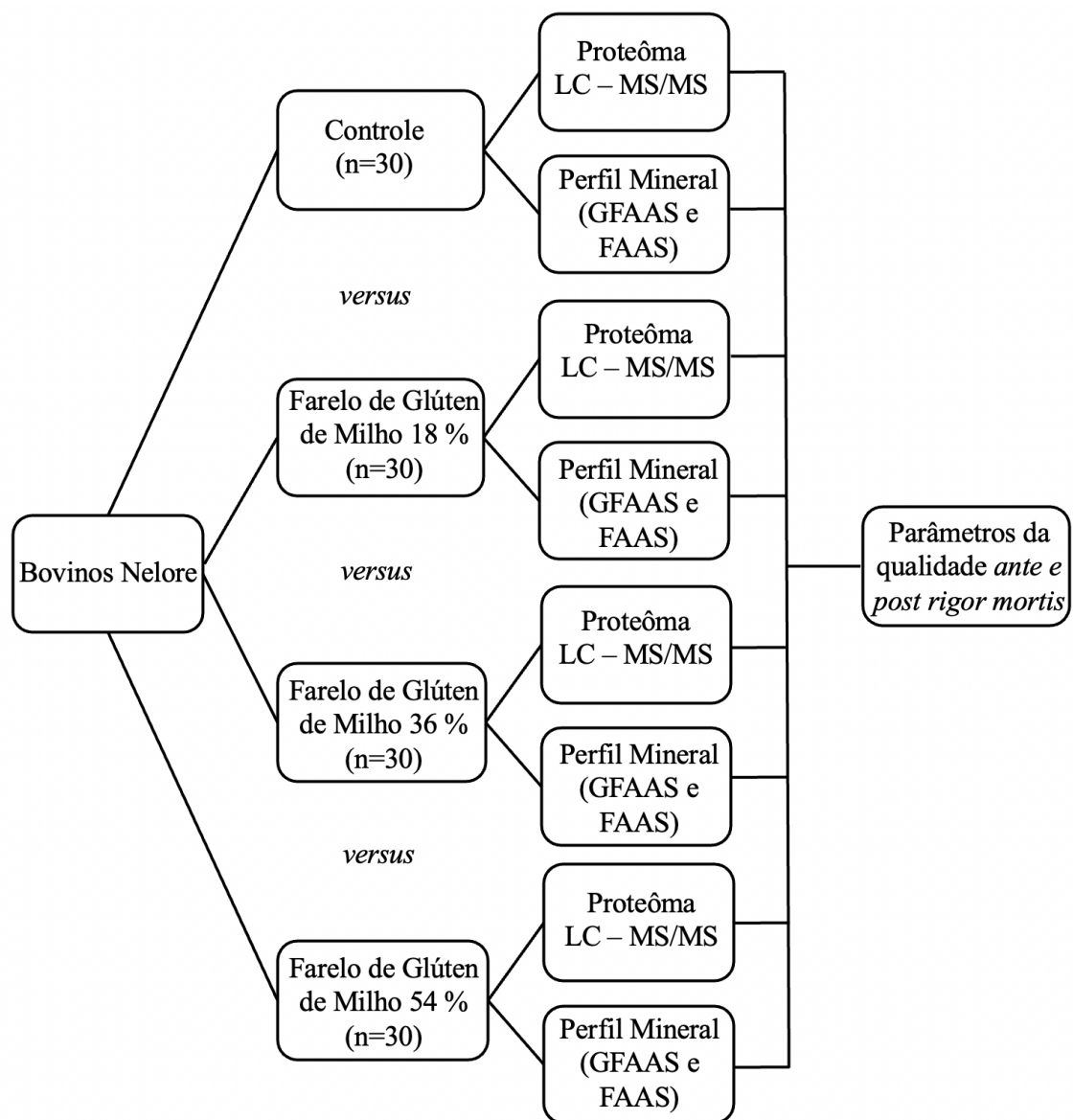


Figura 2. Diagrama do estudo molecular correlacionando com de qualidade de carne.

2.5.1. Procedimentos de extração e precipitação das proteínas.

Para processo de extração das proteínas, 250 mg de amostras de tecidos foram pesados e transferidos para *vials* de 2 mL. Posteriormente, adicionou-se em cada *vial* 500 μ L de água ultrapura, usando um OMNI Bead Ruptor e esferas de cerâmica de 2,8 mm (OMNI International, Kennesaw, GA, EUA) (velocidade = 3, ciclos = 2, tempo = 60 s); entre os ciclos, as amostras foram mantidas em gelo por 5 min. O processo de extração usando água ultrapura foi usado para maximizar a extração de proteínas solúveis em água. Os *vials* foram centrifugados a 14000 rpm, 4°C por 60 min. A precipitação da fração proteica foi feita adicionando-se 400 μ L de acetona gelada 80% (v/v) a 100 μ L extrato proteico e mantendo-se a mistura em repousado por 2h em geladeira a 10°C.

Após a verificação de precipitado, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm, 4°C por 5 min para separação dos *pellets* proteicos. Após esse processo, os *pellets* proteicos foram submetidos a três lavagens com 200 μ L de etanol 80%.

Parte dos *pellets* foram solubilizado com NaOH a 0,50 mol L⁻¹ para a quantificação de proteína total utilizando o método de Biureto (ITZHAKI; GILL, 1964), e outra parte foi armazenada em freezer à -80°C para os experimentos metaloproteômicos.

2.5.2. Fracionamento do proteoma das amostras de músculo LT por 2D PAGE e tratamento de imagem

Para a focalização isoeletrica (IEF), primeira etapa da 2D PAGE, que consiste na separação por ponto isoeletrico (pI), alíquotas dos extratos proteicos foram diluídas em solução contendo ureia a 7 mol L⁻¹, tiourea a 2 mol L⁻¹, CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% e 2,8 mg de DTT, de forma que a concentração de proteína total ficasse igual a 1,50 μ g μ L⁻¹ (MORAES et al., 2012). Posteriormente, alíquotas 250 μ L de extrato proteico contendo 1,50 μ g μ L⁻¹ de proteína total foram aplicadas em quatro fitas IEF de 13 cm, (gradiente de pH 3-10). As fitas IEF foram cobertas com óleo mineral, transferidas para caixa de hidratação e incubadas por 12 horas em IPGBox a 20 °C. Após serem devidamente hidratadas, as fitas foram transferidas para o sistema de focalização isoeletrica (MORAES et al, 2012, BALDASSINI et al., 2015). O tempo de corrida foi de 4,5 horas.

Para a segunda dimensão, as tiras foram colocadas em gel de poliacrilamida (12,5%, p / v), ao lado de cada fita foi colocado um papel filtro com 8 μ L de padrão de proteínas com massa molecular conhecida (β -fosforilase 97,0 kDa, albumina 66,0 kDa, ovoalbumina 45,0 kDa, anidrase carbônica 30,0 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa e α -lactoalbumina 14,4 kDa). O

1 sistema foi selado com agarose 0,5 % (m/v) para garantir o contato do gel com a fita na corrida
2 eletroforética (LIMA et. al., 2010; MORAES et al, 2012, BALDASSINI et al., 2018). O tempo
3 de corrida foi de 2,50 horas.

4 Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas com coloração D e coradas com Coomassie
5 coloidal (LIMA et. al., 2010; MORAES et al, 2012). Os géis foram escaneados com
6 ImageScanner III (GE Healthcare) e os *spots* foram detectadas e avaliados quanto a expressão
7 utilizando o software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare) (BRAGA et al., 2017).

8 2.5.3. Determinação de minerais de *spots* proteicos do músculo LT

9 As determinações de cálcio e magnésio (macrominerais) e de cobre, ferro, manganês e
10 zinco (microminerais) foram feitas utilizando espectrometria de absorção atômica com chama
11 (FAAS) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), após
12 mineralização ácida das amostras, conforme descrito por Moraes et al., 2013, Braga et al., 2015,
13 Vieira et al., 2017, Bittarello et al., 2019.

14 Após o tratamento de imagens, foram selecionados os *spots* (utilizando quadruplicata dos
15 géis de tecido muscular e carne para essa análise), recortados com auxílio da ponta de uma
16 ponteira e digeridos com para a eliminação da fração orgânica.

17 Os *spots* foram transferidos para balões de digestão de 5mL. Para cada balão de digestão
18 foram transferidas alíquotas de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, os frascos foram então
19 colocados em um bloco digestor e aquecidos a aproximadamente 250 ° C e adicionado 250 µL
20 de peróxido de hidrogênio a até que os extratos claros fossem observados. Após essa etapa, as
21 amostras foram avolumadas para 5 mL com água ultrapura. Na sequência foram feitas as
22 determinações de minerais cálcio e magnésio (macrominerais) e de cobre, ferro, manganês e
23 zinco (microminerais).

24 2.5.4. Caracterização dos *spots* proteicos por LC-MS/MS

25 Os *spots* proteicos diferencialmente expressos (entre tratamentos) foram extraídos dos géis
26 com auxílio de bisturi, recortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para
27 microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v) e submetidos às seguintes etapas: remoção
28 do corante, redução e alquilação das proteínas e digestão triptica utilizando solução de tripsina
29 10 ng mL⁻¹ (BRAGA et al., 2015). As sequências peptídicas foram caracterizadas por
30 espectrometria de massas em sequência acoplada à cromatografia líquida (LC- MS/MS). A
31 identificação das proteínas foi feita por meio de pesquisa na base de dados UniProt
32 (www.uniprot.org) para o genoma *Bos taurus*. Após a identificação das proteínas, uma análise

das interações funcionais previstas e conhecidas entre as proteínas identificadas e outras proteínas *B. taurus* foi realizada usando o software STRING 11.0. Nessas análises três níveis foram investigados.

2.5.5. Tratamento e análise de imagens

Os géis dos grupos experimentais (0% vs 18%, 36% e 54%), foram escaneados e as imagens analisadas usando o ImageMaster 2D Platinum 7.0 (BRAGA et al., 2017; BALDASSINI et al., 2018) com algumas adaptações. Em resumo, os pontos equivalentes (correspondência) foram identificados, e a edição automática e manual foi realizada para remover os pontos falsos. Sempre utilizando dois géis por amostra, obtidos de um mesmo processo eletroforético. Os parâmetros utilizados para a detecção dos *spots* foram: *smooth* (fixa o número de vezes que o programa homogeneiza a região selecionada antes de seguir a detecção) – 3; *saliency* (medida que se baseia na curvatura do *spot*, filtra *spots* reais) – 25; e *min area* (elimina regiões menores que as indicadas) – 5. A correlação obtida entre os géis foi feita pela equivalência entre os *spots* dos dois géis (matching), onde os *spots* foram comparados quanto à sua distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico (pI) e massa molar (Mm). A análise comparativa de todos os pontos com base no volume normalizado (% V) permitiu a detecção de pontos diferencialmente expressos entre os grupos experimentais (0% vs 18%, 36% e 54%).

Na análise de expressão dos *spots*, calculou-se a média e o desvio padrão correspondentes ao parâmetro vol% (volume normalizado) de cada *spot* e estabeleceu-se um valor de 95% para que a mudança na expressão fosse considerada relevante.

2.6. Análises estatísticas

Os resultados (características de carcaça e carne) foram analisados usando o software SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, Estados Unidos, 2011). O teste de normalidade dos dados foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk pelo procedimento PROC UNIVARIATE. Os dados que não mostraram uma distribuição normal foram transformados usando PROC RANK. Em seguida, os dados foram analisados por contrastes ortogonais (controle vs DCGF, linear e quadrático) utilizando o procedimento PROC MIXED, onde a caneta foi a unidade experimental, a inclusão de DCGF foi o efeito fixo e o bloco, efeito aleatório, seguindo o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + P_j + e_{ij}$$

Onde: μ = média geral, B_i = efeito de bloco aleatório, P_j = efeito dos níveis de DCGF (0, 18, 36 e 54% de base de MS) e e_{ij} = erro experimental.

Efeito significativo foi considerado quando $P \leq 0,05$, e tendências quando $0,05 < P < 0,10$.

3- RESULTADOS

Os resultados do estudo foram favoráveis ao uso do Farelo de Glúten de Milho em substituição ao milho, uma vez que características da qualidade da carne não sofreram alterações significativas, e os dados principais de desempenho foram positivos para o subproduto, o que torna viável utilizá-lo como estratégia de redução dos custos, possivelmente favorecendo também questões de saúde animal, mostrando-se uma dieta mais segura à nível ruminal.

As análises de qualidade da carne em laboratório não apresentaram diferenças significativas para nenhuma das características avaliadas, conforme mostra a Tabela 3.

Com relação à ingestão, os animais alimentados com DCGF em diferentes níveis de inclusão (18, 36, e 54%) apresentaram maior IMS quando comparados ao grupo controle ($P = 0,018$). A inclusão do subproduto causou efeito quadrático na IMS ($P = 0,021$), sendo que os animais que receberam dieta contendo 18% de DCGF consumiram 13,3% a mais do que o grupo controle (Tabela 2).

O GMD aumentou linearmente ($P = 0,043$), porém, o grupo que recebeu dieta contendo 36% de DCGF apresentou maior GMD durante o período experimental. Em média, a inclusão do subproduto aumentou o GMD em 10,5%, quando comparada à dieta controle. Os animais que receberam o DCGF na dieta apresentaram maior PCF ($P = 0,012$), independente do nível de inclusão. Também foi observado efeito quadrático para o PCF ($P = 0,039$), e os animais alimentados com 36% de DCGF nas dietas experimentais chegaram ao final do experimento com maior PCF (aumento de 4,1% em relação ao grupo controle).

A figura 3 (tecido muscular) e a figura 4 (carne) mostram a localização no gel de cada um dos *spots* proteicos descritos quanto a expressão proteica nas tabelas 6 e 7 (ANEXO); e quanto a presença de minerais nas tabelas 4 e 5 (ANEXO). Todos os *spots* com expressão significativa ($P < 0,05$) foram avaliados e caracterizados quanto à presença de proteínas. As figuras mostram que, apesar de se tratar do mesmo tecido em diferentes fases (*ante e post rigor mortis*), a presença de *spots* proteicos é diferente entre eles.

Os *spots* diferencialmente expressos foram caracterizados a partir de espectrometria de massa, após a identificação foi padronizada considerando o maior Score proteico, pI e massa molecular (MM) mais próximos dos resultados teóricos e experimentais.

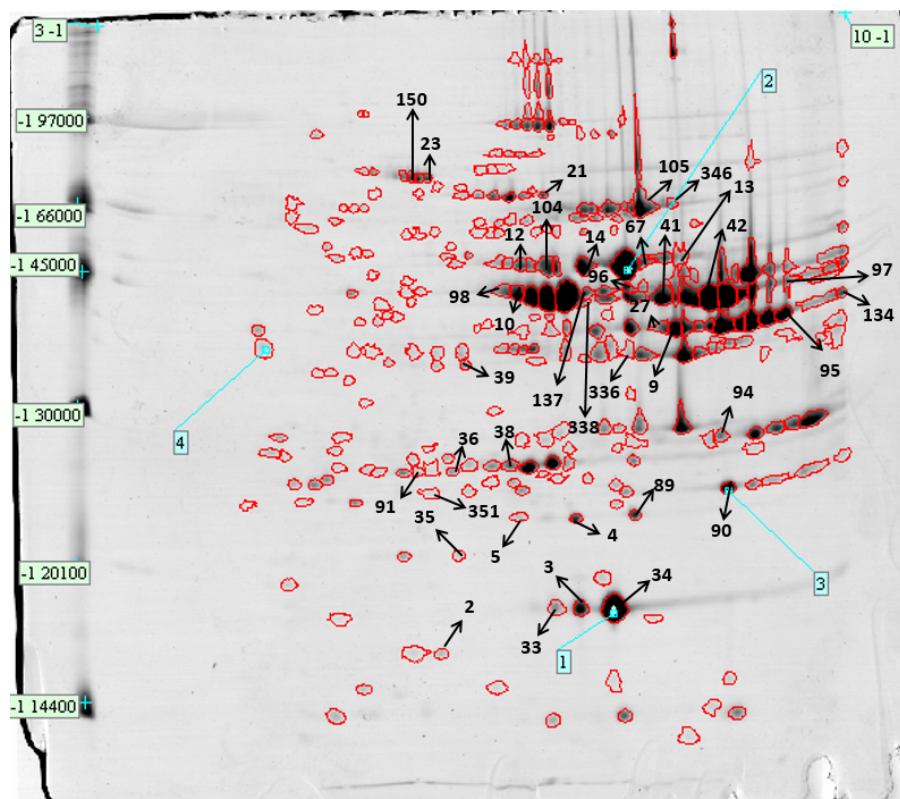


Figure 3: Gel de poliacrilamida com *spots* proteicos de tecido muscular bovino identificados por LC-MS/MS.

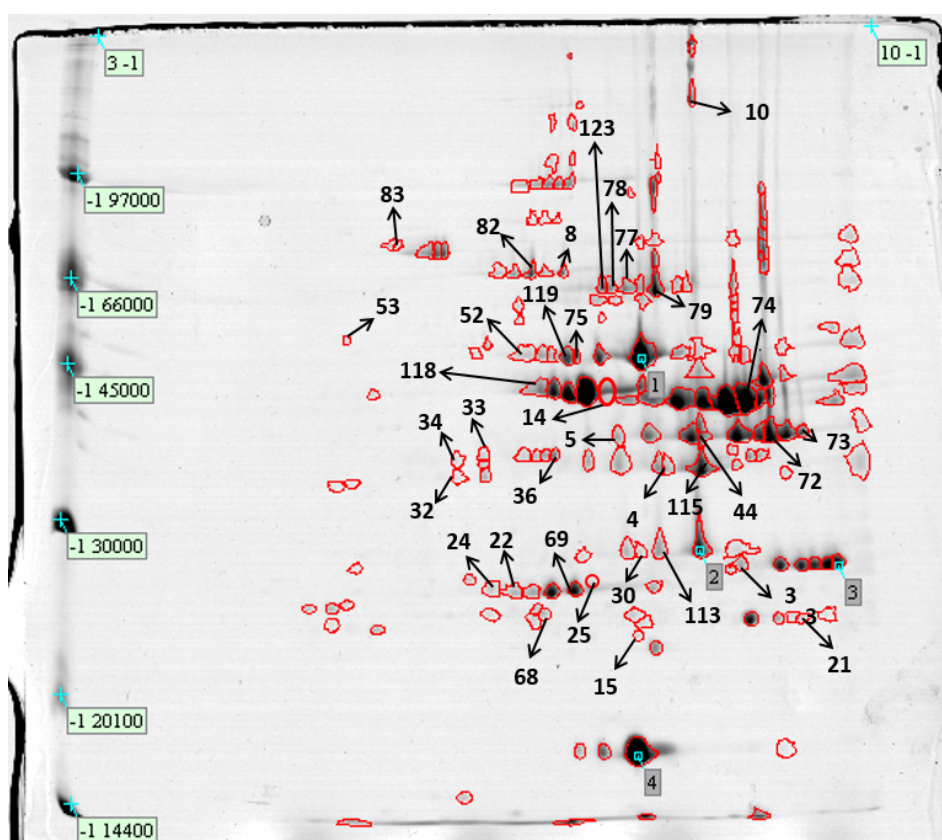


Figura 4: Gel de poliacrilamida com *spots* proteicos de carne bovina identificados por LC-MS/MS.

Nas tabelas 4 e 5 são apresentados os resultados relacionados com os tratamentos quanto a presença de minerais nos *spots* proteicos. Os minerais foram investigados nos *spots* proteicos com diferença de expressão nos diferentes tratamentos.

Dentre os minerais determinados, tem-se o Ca (Cálcio) e Mg (Magnésio) – macrominerais – e Zn (Zinco), Cu (Cobre), Fe (Ferro) e Mn (Manganês) - microminerais. O ferro foi determinado na maioria dos *spots* proteicos, com destaque para *spots* contendo Mioglobina no tecido muscular (*spots* 3, 4, 33, 34, e 35).

É possível observar a crescente presença de cobre nos *spots* conforme aumenta-se o nível de inclusão de DCGF, bem como de magnésio, ambas para amostras de tecido muscular. O manganês apareceu de forma efetiva nas amostras de carne, mas se mostrou pouco expressivo em amostras de tecido muscular. Os demais minerais não apresentaram diferenças importantes quando comparados os tratamentos, conforme mostram as figuras 6 e 7.

As tabelas 6 e 7, apresentam as proteínas com diferença de expressões *ante e post rigor* (tecido muscular e carne) do LT de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho Seco. As proteínas foram identificadas por LC-MS/MS. Nos dados que apresentam expressões positiva (+), os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de DCGF.

Para observar a interação proteína-proteína, as proteínas encontradas no músculo LT e na carne foram avaliadas utilizando o software STRING 11.0, para as espécies *Bos Taurus* (Figura 5). Os dados mostram a interação entre as proteínas encontradas de diferentes grupos metabólicos, evidenciando quais grupos de proteínas foram encontrados somente em um dos tecido, e quais grupos são comuns ao tecido muscular e a carne. As linhas representam associações proteína-proteína as associações devem ser específicas e significativas, ou seja, as proteínas contribuem conjuntamente para uma função compartilhada; isso não significa necessariamente que eles estejam fisicamente vinculadas uma a outra.

4- DISCUSSÃO

Para os dados de desempenho, a ingestão de matéria seca foi maior para os tratamentos com inclusão de DCGF, o que corrobora com o estudo de Macken et al. (2004) Scoot et al. (2003), que encontrou maiores valores de ingestão conforme aumentou a inclusão deste subproduto nas dietas de bovinos confinados em substituição ao milho. No presente estudo, a

FDN dos tratamentos é maior nos tratamentos que contém DCGF, podendo ter favorecido a ingestão, por ser de alta digestibilidade, aliado ainda com a redução do teor de amido.

O ganho de peso dos animais se comportou da mesma forma que a ingestão de matéria seca, apresentando melhores resultados com o uso do subproduto, levando por consequência a um peso corporal final maior. Os resultados mostraram-se favoráveis ao nível de 36% de inclusão.

A tabela 3 mostra algumas características da qualidade de carne encontradas em laboratório, nas quais não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para nenhum dos componentes avaliados. Segundo o que foi proposto nos objetivos específicos do presente estudo, a associação das proteínas encontradas no LT bovino com características como maciez e coloração é possível somente como estudo da funcionalidade das proteínas para essas características, mas a diferença de expressão das proteínas entre os tratamentos não resultou em diferença significativa nas avaliações de qualidade da carne. Isso indica que a inclusão de Farelo de Glúten de Milho em substituição à dietas com alto teor de amido não alterou os parâmetros de qualidade da carne, podendo ser uma alternativa para minimizar os custos da dieta total, sem alterar o produto final.

Há poucos dados comparando o uso de Farelo de Glúten de Milho como fonte de proteína e energia para terminação de animais zebuínos e as características resultantes da carcaça. Quando comparado aos estudos americanos em que subprodutos do milho foram avaliados em dietas confinadas, os resultados encontrados nesse estudo condizem os de Stelzleni et al. (2016), que utilizaram grãos de milho de destilaria (25% na MS) nas dietas de terminação e também não relataram impacto nas características da carcaça relacionadas à qualidade.

As chamadas HSPs, como a HSPB1 e a HSPA1A são recrutadas de maneira variável para impedir o início da apoptose, impedindo que as células se danifiquem, desempenhando um grande papel nas alterações musculares post mortem. Elas possuem papéis essenciais no músculo esquelético post mortem uma vez que contribuem para a conformação adequada de proteínas e preservação de suas propriedades e funções biológicas. Elas agem como acompanhantes moleculares durante a montagem de proteínas, dobragem, desdobramentos e redobramento de proteínas danificadas, mantendo assim a homeostase celular (LOMIWES et al., 2014). Estudos proteômicos do músculo esquelético identificaram várias HSPs que são alteradas no post mortem do músculo bovino (PULFORD et al., 2008; JIA et al., 2009). Seu aumento logo após o abate pode ser explicado devido à sua resposta aos sinais de estresse

1 celular. A associação negativa de HSPB1 e maciez da carne foi relatada em estudos com
2 expressão de genes e proteínas (KIM et al., 2008; MALHEIROS et al., 2019).

3 A enolase 1 (ENO1) e 3 (ENO3) são duas isoformas que catalisam a conversão de 2-
4 fosfoglicerato fosfoenolpiruvato durante a glicólise. A ENO1 é onipresente no citoplasma
5 celular, enquanto o ENO3 está presente principalmente no músculo esquelético. Sua
6 correlação com a maciez da carne em isoformas específicas como ENO3 foram
7 correlacionadas com carnes macias. Em estudos anteriores como Jia et al., (2006), mostrou-
8 se um aumento de ENO3 precoce post mortem. Após um período de envelhecimento mais
9 longo (mais de 21 dias), foi observado um aumento de fragmentos de ENO3 (LAVILLE et
10 al., 2009), indicando a desaceleração do processo glicolítico. Além disso, esta proteína tem
11 sido relatada como correlação positiva com a luminosidade (GAGAOUA et al., 2015) e tom
12 de vermelhidão na carne (JOSEPH et al., 2012). De acordo com Rosa et al. (2018), a expressão
13 do ENO3 foi regulamentada em carnes macias da raça Nelore. O estudo feito por Malheiros
14 et al. (2019), fornece uma base para o conhecimento da contribuição das enzimas do
15 metabolismo glicolítico, onde uma diminuição nos danos oxidativos das enzimas glicolíticas
16 favorece a maciez da carne.

17 A enzima PKM, envolvida na catálise da reação de transferência de um grupo fosfato
18 de fosfoenolpiruvato para ATP usando uma molécula de piruvato, é encontrado na forma de
19 quatro isoenzimas entre as quais duas, PKM1 e PKM2, predominam no músculo esquelético.

20 Enzimas como ENO3, GAPDH, PGAM2, e a TPI1, encontradas no presente estudo, são
21 importantes para o metabolismo glicolítico. A exemplo disso, a GAPDH apresenta-se como
22 uma enzima chave na glicólise que converte 3-fosfato de gliceraldeído (G3P) em fosfato de
23 3-fosfo-D-glicerol.

24 Durante a conversão de músculo em carne, o músculo é submetido a várias espécies
25 reativas de oxigênio (ROS), capazes de atingir as frações lipídica e protéica (Brand, 2010).
26 Entre os agentes de proteção revelados por estudos proteômicos de carne bovina, foram
27 descobertas as peroxiredoxinas (PRDX1, 2, 3 e 6), superóxido dismutase (SOD), e DJ-1
28 (codificado pelo PARK7) (JIA et al., 2009; GUILLEMIN et al., 2012; POLATI et al., 2012;
29 GRABEZ et al., 2015). Entre eles, o SOD1 foi correlacionado positivamente com o WBSF
30 no músculo semitendinoso (GUILLEMIN et al., 2012). A SOD é um antioxidante que permite
31 uma rápida desmutação de O_2^- para O_2 e H_2O_2 . Em um estudo de Grabez et al., (2015) a
32 superóxido dismutase (Cu-Zn) mostrou-se mais abundante em carne caracterizada como dura.
33 Os autores sugerem que o estresse oxidativo mais forte pode causar acúmulo de ROS em
34 carnes duras e reduzir as células de proteção por Cu / Zn-SOD.

1 As proteínas peroxiredoxin 1 (PRDX1), 2 (PRDX2) e DJ-1 (PARK7) são agentes
2 protetores contra as ROS, possuindo um papel importante na degradação do peróxido (H₂O₂)
3 produzido durante o metabolismo. Um aumento no dano oxidativo dessas proteínas de
4 resposta ao estresse, pode proporcionar um aumento na proteólise miofibrilar, o que permite
5 o desenvolvimento de fenótipo de carne tenra (MALHEIROS et al., 2019). Esta proteína
6 altamente conservada (PARK7) tem a capacidade de oxidar e translocar para mitocôndrias
7 em resposta ao estresse oxidativo, desempenhando um papel de sensor e protetor contra
8 toxicidade do estresse oxidativo e da fragmentação mitocondrial limitante (THOMAS et al.,
9 2011).

10 A proteína conhecida por ALDH, além de seu papel na glicólise (JIA et al., 2006), foi
11 relatada como protetora das células contra o estresse oxidativo através da oxidação de
12 citotóxicos derivados de aldeído (OHTA et al., 2004). No geral, as proteínas identificadas
13 como envolvidas na estresse oxidativo foram propostas como biomarcadores negativos de
14 maciez (GUILLEMIN et al., 2012). No entanto, atualmente é difícil tirar conclusões sobre seu
15 real papel no músculo *post mortem* e, portanto, são necessárias mais investigações para
16 esclarecer a relação exata com a máxima maciez da carne.

17 Outra importante enzima do metabolismo oxidativo é a Creatina quinase tipo M (CKM)
18 tendo um papel fundamental no metabolismo anaeróbico após o abate, atuando como
19 antioxidante ao eliminar os radicais livres. A CKM foi relatada como reguladora da maciez
20 da carne bovina (ZAPATA et al., 2009).

21 Dentre as possíveis proteínas biomarcadoras para características da carne, podemos
22 citar ENO 1, ENO3, MDH1, GAPDH, LDHA, PKM e PGM1 como participantes do
23 metabolismo energético, mais especificamente dentro do metabolismo glicolítico; ALDH2 e
24 CKM como partes do metabolismo energético, mais especificamente do metabolismo
25 oxidativo; PARK7, PRDX-1, SOD1, CA3 como marcadoras de estresse oxidativo; e a MB
26 como parte do transporte e sinalização.

27 PARK7, PRDX-1, SOD1, CA3 como dito são proteínas ligadas ao estresse oxidativo,
28 e apresentaram menor expressão no T3 E T4 nesse estudo, o que indica que a menor proporção
29 de milho na dieta e consequentemente menor proporção de amido quando comparadas ao T1
30 e T2 resultaram em menor expressão dessas proteínas.

31 As demais proteínas discutidas possuem papéis importantes no tecido muscular e
32 correlação com as características da qualidade da carne, porém a diferença de expressão entre
33 tratamentos não foi determinante para alterar essas características. São necessários mais
34 estudos proteômicos à respeito do tecido muscular de bovinos Nelore confinados, bem como

1 mais estudos proteômicos à respeito de diferentes níveis de inclusão do Farelo de Glúten de
2 Milho para animais confinados.

3 As interações proteína-proteína, reforçam que as proteínas raramente agem sozinhas,
4 portanto, o estudo das redes de proteínas é essencial para uma ampla gama de processos
5 celulares e formam uma rede de grande complexidade. O mapa de interação foi gerado a partir
6 do banco de dados STRING (Figura 5). De acordo com os resultados deste estudo, apesar de
7 interligadas diretamente, as proteínas são pertencentes a diferentes vias metabólicas, como
8 proteínas envolvidas na regulação da contração muscular, proteínas de choque térmico,
9 proteínas oxidativas, proteínas glicolíticas, e do metabolismo de nucleotídeos.

10 Os eventos que compõe o *ante* e o *post-rigor mortis*, como por exemplo o pH, a
11 temperatura, a glicólise, estímulos elétricos e outros, são conhecidos por induzir alterações
12 em algumas moléculas. Exemplo disso são as proteínas (proteases) do sarcoplasma que são
13 desnaturadas durante temperaturas ao longo do processo de *rigor* e podem influenciar nas
14 características da carne (MARSH et al. 1987; PIKE et al. 1993; KIM et al., 2014). Diante
15 disso, encontramos proteínas que se mostraram expressas apenas no tecido muscular e outras
16 apenas na carne, mostrando que a transformação do músculo em carne influencia diretamente
17 nas proteínas e suas características (Figura 5).

18 Com relação às metaloproteínas, Garcia et al. (2006) descreveu a natureza das
19 interações como fracas entre íons monovalente como o K^+ e o Na^+ , moderadas com íons
20 alcalino-terrosos como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , e fortes com os metais de transição como o Cu^{2+} ,
21 Fe^{2+} , e o Mn^{2+} , sendo encontrados em maior quantidades ligadas à essas estruturas.

22 Podendo ser associado ao transporte de oxigênio, a Mioglobina (MB) foi encontrada em
23 alguns *spots* que continham o Ferro (Fe). Este foi encontrado na maioria dos *spots* proteicos,
24 mineral essencial para a formação da hemoglobina e do hormônio tireoidiano, e os sintomas
25 de toxicidade ou deficiência são raramente observados em bovinos. Também apresenta-se
26 como um mineral importante na reprodução. Além disso, a suplementação de Fe reduziu o
27 número de células apoptóticas (GAO et al., 2007). Normalmente, o Fe não é suplementado ao
28 gado, já que muitos dos alimentos consumidos fornecem uma dieta já adequada para este
29 mineral. Deve-se ter cuidado se houver excesso de Fe consumido, pois pode causar efeitos
30 antagônicos com outros minerais, como Cu, Mn, Se e Zn (VAN EMON et al., 2020).

31 O ferro atua como um componente principal da hemoglobina, que contém quatro
32 átomos de Fe (Suttle, 2010). A hemoglobina atua como o principal transportador de oxigênio
33 para os tecidos do sangue. O ferro também participa de vários outros processos, incluindo
34 imunidade, metabolismo energético e produção de sangue (Wysocka et al., 2020).

1 Podendo ser associado com a enzimas antioxidantes e metabolismo de carboidratos, o
2 zinco é amplamente reconhecido por sua importância no desempenho reprodutivo e
3 produtivo. O zinco tem muitas funções no corpo, incluindo a síntese de proteínas, a síntese de
4 ácidos nucleicos, o metabolismo de carboidratos, um dos principais constituintes de várias
5 metaloenzimas, e desempenha um papel em várias reações bioquímicas (VAN EMON et al.,
6 2020). A deficiência severa de Zn pode levar a feridas de cicatrização lenta e pode levar à
7 infecções secundárias. Além disso, a deficiência de Zn pode causar problemas nas articulações
8 (Miller, 1970).

9 Sugerindo que o Zn desempenha um papel importante na síntese de antioxidantes, ele
10 também pode impactar negativamente na ação do sistema imunológico quando reduzidas suas
11 concentrações.

12 Estudos anteriores relatam uma maior absorção dos elementos cobre e magnésio em
13 dietas ricas em proteínas (Fairweather-Tait e Hurrell, 1996). Isso pode ser entendido sob a
14 ótica animal como uma relação entre disponibilidade dos minerais de acordo com a dieta que
15 recebem. No experimento em questão, as dietas foram equiparadas quanto a energia, mas
16 possuem diferenças no teor de proteína bruta, significativa principalmente na comparação
17 entre o tratamento controle (sem inclusão de DCGF) e o tratamento com 54% de inclusão
18 (13,08% de PB *versus* 16,97% de PB na MS). Como demonstrado nos resultados, o
19 aparecimento de cobre e magnésio foi crescente (figura 6) conforme eram aumentados os
20 níveis de inclusão de DCGF, possivelmente associados à melhor absorção desses elementos
21 nas dietas com maiores teores de proteína, favorecendo sua deposição no tecido muscular.

22 O cálcio parece ter íntima relação com características organolépticas da carne bovina,
23 especialmente com a maciez (CARAPELLI et al., 2020), relatada como um importante fator
24 de impacto sobre o consumidor. O Ca participa ativamente das quebras proteolíticas como
25 cofator da enzima calpaína, que participa da transformação do músculo em carne, o que
26 justifica sua presença em parte significativa dos *spots* avaliados.

5- CONCLUSÃO

1 O perfil metaloproteômico do tecido muscular é uma ferramenta importante para
2 estudos relacionados à características da carne e seu entendimento. Os minerais e proteínas
3 encontrados podem ser correlacionados com importantes papéis no organismo de acordo com
4 suas funções biológicas. Os diferentes níveis de inclusão de de Farelo de Glúten de Milho
5 Seco (DCGF) na dieta acarretou em diferentes expressões de proteínas do tecido muscular,
6 porém não alterou características importantes da carne (não deixando de desempenhar suas
7 funções), sendo uma substituição interessante à outros ingredientes de alto custo, como milho
8 e soja, reduzindo custos com a dieta e mantendo os padrões de qualidade da carne.

ANEXO

TECIDO MUSCULAR

CARNE

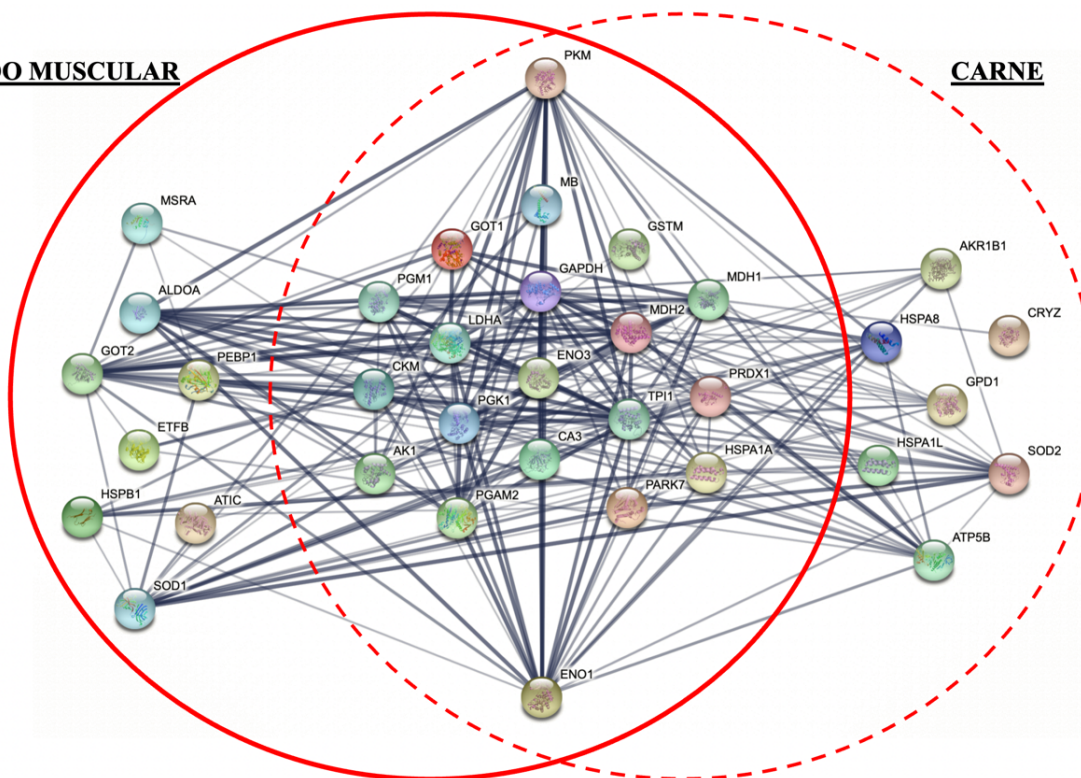


Figura 5: Análise da interação proteína-proteína realizada pela String 11.0 de proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus lumborum thoracis*, na carne e proteínas presentes em ambos os tecidos de Bovinos Nelore.

Tabela 2: Ingestão de MS e performance de bovinos Nelore alimentados com diferentes níveis de DCGF.

Item ²	Níveis de DCGF, %MS				EPM ¹	C vs DCGF	P-valor ³	
	0	18	36	54			Linear	Quadrático
IMS, kg	9.57	10.85	10.42	10.12	0.345	0.018	0.331	0.021
GPD, kg	1.51	1.66	1.7	1.65	0.047	0.01	0.043	0.06
PCF, kg	531.6	548	553.4	548.9	11.45	0.012	0.039	0.086

¹Erro padrão da média

²IMS = Ingestão de Matéria Seca, GPD = Ganho de Peso Diário, PCF = Peso Corporal Final

³C vs DCGF = controle vs Farelo de Glúten de milho, L = linear, Q = quadrático

Tabela 3: Características de qualidade de carcaça e carne de touros Nelore alimentados com níveis crescentes de Farelo de Glúten de milho (DCGF) seco na dieta de terminação.

Item ²	Níveis de DCGF, % MS				SEM ¹	P-valor ³		
	0	18	36	54		C vs DCGF	L	Q
AOL, cm ²	67.24	69.25	68.37	68.15	2.589	0.511	0.816	0.529

EGS, mm	3.29	3.72	3.68	3.91	0.314	0.203	0.210	0.757
pH	5.56	5.65	5.56	5.56	0.216	0.303	0.545	0.102
L*	36.15	34.34	36.18	36.18	0.247	0.526	0.624	0.289
a*	18.69	17.89	18.54	18.92	0.304	0.647	0.489	0.172
b*	8.69	8.03	8.48	8.81	0.342	0.708	0.496	0.203
Chroma	20.59	19.63	20.39	20.88	0.328	0.665	0.465	0.174
Hue	24.24	23.89	24.39	24.83	0.339	0.709	0.239	0.412
Evp, %	23.75	25.57	24.92	24.33	1.366	0.308	0.808	0.236
PG, %	4.18	4.45	4.84	4.50	0.207	0.309	0.435	0.280
PC, %	27.94	30.01	29.76	28.83	0.246	0.292	0.735	0.214
WBSF, N	62.14	60.09	65.11	62.56	0.234	0.949	0.635	0.992

¹Erro padrão da média

²AOL = Área de olho de lombo e EGS = Espessura de gordura, L* = luminosidade, a* = vermelho, b* = amarelo, Evp = perda de evaporação, DL = perda de gotejamento, CL = perdas de cocção, WBSF = Força de cisalhamento

³C vs DCGF = controle vs Farelo de Glúten de milho, L = linear, Q = quadrático

Tabela 4: Presença de minerais em *spots* proteicos que apresentaram diferença de expressão no tecido muscular de bovinos alimentados com 0% (T1), 18% (T2), 36% (T3) e 54% (T4) de Farelo de Glúten de Milho (DCGF).

<i>Spot</i> ID	Proteína ID	ABV	Proteína	Farelo de Glúten de Milho (DCGF)			
				0%	18%	36%	54%
2	P00442	SOD1	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	Ca, Fe, Mg	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Fe, Cu	Zn, Cu
3	P02192	MB	Mioglobina	Fe, Mg	Fe, Mg	-	Zn, Mg
4	P02192	MB	Mioglobina	Ca, Mg	Fe, Mg	Zn, Mn, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Cu, Mg
5	Q5E946	PARK7	homólogo da proteína 7 da doença de Parkinson	Zn, Cu, Mg	Fe, Mg	Fe, Mg	Zn, Fe
5	P13696	PEBP1	Proteína 1 de ligação à fosfatidiletanolamina				
9	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Zn	Mn, Fe, Mg	Fe, Cu, Mg	Zn, Mg
9	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
9	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3				
10	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	Zn, Fe	Zn	Zn, Mg	Zn, Mg
12	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	Zn, Cu	Zn, Fe, Mg	Fe	Zn, Fe
12	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M				
13	Q3T0P6	PGK1	Fosfoglicerato quinase 1	Zn	Zn, Fe, Cu, Mg	Fe, Cu, Mg	Zn, Fe, Cu, Mg
13	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase				
13	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
14	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	Fe, Mg	Mn, Ca, Fe, Mg	Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Mn, Mg
14	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase				
14	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M				
21	Q08DP0	PGM1	Fosfoglucomutase-1	Fe, Mg	Zn, Fe	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Mg
21	Q0VCK0	ATIC	Proteína de biossíntese de purina bifuncional PURH				

23	Q27975	HSPA1A	Choque térmico 70 kDa proteína 1A	Zn, Mg	Fe	Fe, Cu, Mg	Zn, Fe, Cu, Mg
27	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Fe, Mg	Zn, Mg	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg
27	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato				
27	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
33	P02192	MB	Mioglobina	Zn, Ca, Mg	Fe, Cu, Mg	Mg	Zn, Fe, Cu, Mg
34	P02192	MB	Mioglobina	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Mg	Mg	Zn, Ca, Cu, Mg
35	P02192	MB	Mioglobina	Zn, Mg	Zn, Fe, Cu, Mg	Cu, Mg	Zn, Fe, Cu, Mg
36	Q3T149	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Cu, Mg	Zn, Mg	Fe, Cu, Mg
36	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase				
38	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase				
38	Q3T149	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	Zn, Fe	Zn, Fe, Cu, Mg	Ca, Fe, Mg	Zn, Fe, Mg
38	Q9N0V4	GSTM1	Glutationa S-transferase Mu 1				
38	P54149	MSRA	Peptídeo mitocondrial metionina sulfóxido redutase				
39	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	Zn, Fe, Cu	Fe, Mg	Mg	Ca, Fe, Mg
41	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	Fe		Zn, Cu, Mg	Zn, Fe, Mg
41	P33097	GOT1	Aspartato aminotransferase, citoplasmática		Fe, Mg		
42	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Fe, Cu	Zn, Ca, Cu, Mg	Zn, Ca, Mg
67	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	Zn, Fe, Mg	Zn, Ca, Fe	Zn, Cu, Mg	Zn, Fe, Cu
67	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase				
89	P13696	PEBP1	Proteína 1 de ligação à fosfatidiletanolamina	Zn, Ca, Fe	Zn, Fe, Mg	Zn, Ca, Cu, Mg	Zn, Ca, Cu, Mg
90	P00570	AK1	Adenilato quinase isoenzima 1	Zn, Fe, Mg	Ca, Fe	Zn, Ca, Fe, Mg	Fe, Mg

90	Q5E947	PRDX1	Peroxirredoxina-1				
91	Q3T149	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	Fe	Fe	Cu	Fe, Cu, Mg
94	Q32KV0	PGAM2	Fosfoglicerato mutase 2		Fe	Fe, Cu, Mg	Fe, Cu, Mg
94	Q2TBV3	ETFB	Subunidade beta de flavoproteína de transferência de elétrons	Zn, Ca, Mg			
95	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Fe	Zn, Fe, Cu	Zn, Mg	Zn, Cu
95	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial				
96	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn, Fe, Mg	-	Ca, Fe, Cu, Mg
97	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	Zn, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg	Ca, Fe, Mg	Zn, Fe, Cu
97	P12344	GOT2	Aspartato aminotransferase, mitocondrial				
98	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	Zn	Zn, Cu, Mg	Zn, Fe, Mg	Zn, Cu, Mg
104	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase				
104	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	Zn, Ca, Fe	Zn, Fe, Mg	-	Zn, Mg
104	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M				
105	A5D984	PKM	Piruvato quinase	-	Zn, Cu	Zn	Zn, Ca, Mg
134	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Zn, Fe	Zn, Ca, Cu, Mg	Mn, Ca, Fe, Mg	-
134	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
137	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg	Fe	Zn, Fe, Cu, Mg
137	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato				
150	Q27975	HSPA1A	Choque térmico 70 kDa proteína 1A	Ca, Fe, Mg	Zn, Fe, Mg	Zn, Mg	Fe, Cu, Mg
336	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Fe, Mg	Fe, Mg	Zn, Mg	Zn, Fe, Cu, Mg
336	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
338	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	Zn, Fe, Mg	Fe, Mg	Mn, Fe, Mg	-

338	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M				
346	A5D984	PKM	Piruvato quinase	Zn, Fe, Cu	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Fe, Mg	Cu
351	Q5E946	PARK7	homólogo da proteína 7 da doença de Parkinson	Fe	Zn, Fe	Ca, Fe	Zn, Fe, Mg

Tabela 5: Presença de minerais em *spots* proteicos que apresentaram diferença de expressão na carne de bovinos alimentados com 0% (T1), 18% (T2), 36% (T3) e 54% (T4) de Farelo de Glúten de Milho (DCGF).

<u>Spot ID</u>	<u>Proteína ID</u>	<u>ABV</u>	<u>Proteína</u>	<u>Farelo de Glúten de Milho (DCGF)</u>			
				0%	18%	36%	54%
3	Q32KV0	PGAM2	Fosfoglicerato mutase 2	Mn, Ca, Mg	Zn, Mn, Ca, Fe, Mg	Mn, Fe, Mg	Zn, Mg
4	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Fe, Mg	Mg	Zn, Mg	Mg
	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
5	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Mg	Mn, Fe, Mg	Mg	Zn, Ca, Fe, Mg
8	Q08DP0	PGM1	Fosfoglucomutase-1	Zn, Mn, Fe, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg	Cu, Mg
10	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Zn, Fe, Mg	Ca, Fe, Mg	Mg	Zn, Mn, Ca, Fe, Mg
	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
	Q3T0P6	PGK1	Fosfoglicerato quinase 1				
14	P33097	GOT1	Aspartato aminotransferase, citoplasmática	Ca, Fe	Mn, Ca, Mg	Zn, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg
	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M				
15	P00570	AK1	Adenilato quinase isoenzima 1	Zn, Fe, Mg	Zn, Mn, Mg	Zn, Fe, Mg	Zn, Mn, Mg
	P41976	SOD2	Superóxido dismutase [Mn], mitocondrial				
21	Q5E947	PRDX1	Peroxirredoxina-1	-	Mn, Fe, Mg	Zn, Fe, Mg	Zn, Mn, Ca, Mg

22	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	Ca, Fe, Mg	Zn, Mn, Mg	Mn, Mg	Zn, Mg
	Q9N0V4	GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1				
24	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	Zn, Ca, Cu, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg	Mn, Fe, Mg	Mn, Fe, Mg
25	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	Fe, Mg	Mn, Mg	Zn, Fe, Mg	Mn, Mg
	P02192	MB	Mioglobina				
30	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3	Zn, Mn	Zn, Mn, Fe, Mg	Fe, Mg	Mg
32	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	Mg	Mn, Fe, Mg	Mn, Mg	Mn, Fe, Mg
33	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	Fe, Cu, Mg	Fe, Mg	Zn, Cu, Mg	Fe, Mg
	P16116	AKR1B1	Aldo-ceto redutase família 1 membro B1				
34	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg
36	Q5EA88	GPD1	Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)], citoplasmático	Zn, Mn, Mg	Zn, Mn, Mg	Zn, Mg	Zn, Mn, Mg
44	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Mn, Ca, Fe, Mg	Zn, Mn, Ca, Mg	Mn, Fe, Mg	Mn, Ca, Fe, Mg
	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase				
52	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	Zn, Mn, Fe, Mg	Zn, Mg	Zn, Mg	Mn, Mg
53	P00829	ATP5F1B	Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial	Fe, Cu	Zn, Fe, Mg	Mg	Fe

68	Q5E946	PARK7	homólogo da proteína 7 da doença de Parkinson	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Mn, Mg	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg
69	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	Mn, Fe, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg	Mn, Fe, Mg	Zn, Ca, Mg
72	Q9N0V4	GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1				
	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial	Fe, Mg	Mg	Mn, Fe, Mg	Ca, Mg
	O97764	CRYZ	Zeta-cristalino				
73	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial	-	Zn, Mn, Fe, Mg	Mn, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg
74	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Ca, Mg	Zn, Mg	Mn, Mg	Zn, Ca, Mg
75	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	Fe, Mg	Zn, Mn, Mg	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Mn, Mg
	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase				
77	A5D984	PKM	Piruvato quinase	Fe, Cu, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg	Zn, Mg	Zn, Mg
78	A5D984	PKM	Piruvato quinase	Zn, Mn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Mg	Zn, Mn, Mg	Zn, Mn, Mg
79	A5D984	PKM	Piruvato quinase	Mn, Fe, Mg	Mn, Mg	Mn, Fe, Mg	Mn, Mg
82	Q08DP0	PGM1	Fosfoglucomutase-1	Zn, Fe, Mg	Zn, Mg	Fe, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg
83	P19120	HSPA8	Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa	Fe, Cu			
	P34933	HSPA2	Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico				

	P0CB32	HSPA1L	Choque térmico 70 kDa proteína 1-like		Zn, Mn, Ca, Mg	Mg	Mg
	Q27975	HSPA1A	Proteína de choque térmico 70 kDa 1 ^a				
	Q27965	HSPA1B	Choque térmico 70 kDa proteína 1B				
	Q0VCX2	HSPA5	Chaperona do retículo endoplasmático BiP				
113	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3				
	Q3T0P6	PGK1	Fosfoglicerato quinase 1	Cu	Mg	-	Mg
	Q32KV0	PGAM2	Fosfoglicerato mutase 2				
	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M				
115	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase		Mn, Fe, Mg	Mn, Fe, Mg	
	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3	Zn, Mn, Ca, Fe, Mg			-
	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase				
118	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M		Mn, Fe, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg	Mn, Fe, Mg
	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase				
119	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase		Zn, Mn, Mg	Zn, Mn, Fe, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg
	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase				
123	A5D984	PKM	Piruvato quinase	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn, Mg	Zn, Mg

Tabela 6: Identificação de proteínas com diferentes expressões no tecido muscular de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho (DCGF). A análise da expressão dos pontos foi realizada usando o Programa ImageMaster Platinum com a identificação de proteínas por LC-MS/MS. Positivo (+) os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de Farelo de Glúten de Milho.

<u>Spot ID</u> ^a	<u>Protein ID</u> ^b	<u>ABV</u> ^c	<u>Proteína</u>	<u>Score</u> ^d	<u>pI/Mw experimental (Da)</u>	<u>pI/Mw teórico (Da)</u>	<u>Cobertura (%)</u>	<u>Diferença de Expressão 18%</u>	<u>Diferença de Expressão 36%</u>	<u>Diferença de Expressão 54%</u>
2	P00442	SOD1	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	311	6.009270/15.897	5.85/15.683	6.58	+1,13861	Ø	Ø
3	P02192	MB	Mioglobina	6322	7.355736/17.481	6.90/17.078	64.94	- 1,14362	Ø	Ø
4	P02192	MB	Mioglobina	413	7.323291/21.495	6.90/17.078	18.83	+1,13389	Ø	+1,40031
5	Q5E946	PARK7	homólogo da proteína 7 da doença de Parkinson	4606	6.820394/21.676	6.84/20.035	72.49	+1,10126	Ø	Ø
5	P13696	PEBP1	Proteína 1 de ligação à fosfatidiletanolamina	949		6.96/20.986	32.62			
9	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	68885	8.320973/34.852	8.51/35.868	51.05	+1,08094	Ø	Ø
9	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	1477		8.12/36.598	46.99			
9	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3	618		7.71/29.370	45.38			
10	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	12521	6.836616/39.408	6.63/42.989	45.67	-1,48928	Ø	+1,76212
12	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	8398	6.852839/42.527	7.60/47.096	52.76	-1,33722	Ø	Ø
12	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	5277		6.63/42.989	33.07			
13	Q3T0P6	PGK1	Fosfoglicerato quinase 1	8645	8.361530/42.947	8.48/44.538	56.59	-2,89437	Ø	Ø
13	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	6679		8.51/35.868	26.73			
13	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	1432		8.12/36.598	21.08			
14	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	20950	7.444959/42.215	7.60/47.096	59.68	-1,19517	-1,29433	-1,28042
14	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	9026		6.37/47.326	25.35			
14	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	773		6.63/42.989	36.75			
21	Q08DP0	PGM1	Fosfoglucomutase-1	3026	7.088065/60.581	6.36/61.589	50	+1,53783	Ø	Ø
21	Q0VCK0	ATIC	Proteína de biossíntese de purina bifuncional PURH	270		6.39/64.483	18.58			
23	Q27975	HSPA1A	Choque térmico 70 kDa proteína 1A	2936	5.984936/69.388	5.67/70.259	38.69	+1,80777	+1,57242	-
27	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	18968	8.215527/34.852	8.51/35.868	34.83	-	Ø	-
27	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	7951		8.45/39.436	71.15			
27	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	487		8.12/36.598	21.08			

33	P02192	MB	Mioglobina	2939	7.273769/17.697	6.90/17.078	41.56	Ø	+1,81267	+1,84323
34	P02192	MB	Mioglobina	27234	7.819015/17.343	6.90/17.078	84.42	Ø	+1,44279	+1,3748
35	P02192	MB	Mioglobina	7278	6.335624/20.100	6.90/17.078	48.05	Ø	+2,24744	+2,11816
36	Q3T149	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	9095	6.279496/24.983	5.98/22.393	47.76	Ø	+1,5256	Ø
36	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	2525		6.45/26.690	42.57			
38	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	16013	6.824742/25.199	6.45/26.690	72.69	Ø	-2,3609	Ø
38	Q3T149	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	1080		5.98/22.393	44.28			
38	Q9N0V4	GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1	400		6.91/25.635	19.72			
38	P54149	MSRA	Peptídeo mitocondrial metionina sulfóxido redutase	363		7.15/25.818	20.6			
39	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	3261	6.383734/33.391	6.16/36.438	45	Ø	+1,40433	Ø
41	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	9461	8.235968/40.326	8.45/39.436	81.32	Ø	+1,1419	Ø
41	P33097	GOT1	Aspartato aminotransferase, citoplasmática	559		7.09/46.399	44.79			
42	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	8672	8.701031/40.224	8.45/39.436	77.47	Ø	+1,22956	Ø
67	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	4766	8.051546/45.219	7.60/47.096	46.08	Ø	+1,53181	+4,32195
67	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	2883		6.63/42.989	11.98			
89	P13696	PEBP1	Proteína 1 de ligação à fosfatidiletanolamina	8898	7.9073/21.676	6.96/20.986	48.66	Ø	Ø	-1,32405
90	P00570	AK1	Adenilato quinase isoenzima 1	9551	8.864426/22.938	8.40/21.664	77.32	Ø	Ø	-1,53688
90	Q5E947	PRDX1	Peroxirredoxina-1	142		8.59/22.210	5.53			
91	Q3T149	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	438	5.871379/24.582	5.98/22.393	36.82	Ø	-	+1,53747
94	Q32KV0	PGAM2	Fosfoglicerato mutase 2	2618	8.783314/26.068	8.99/28.685	30.83	Ø	Ø	-1,70231
94	Q2TBV3	ETFB	Subunidade beta de flavoproteína de transferência de elétrons	416		8.25/27.699	19.61			
95	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	73110	9.42410/36.071	8.51/35.868	45.95	Ø	Ø	+2,28433
95	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial	921		8.82/35.668	36.09			
96	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	4966	7.858633/39.505	8.51/35.868	18.02	Ø	Ø	+2,47041
97	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	4623	9.399768/39.022	8.45/39.436	47.8	Ø	Ø	+4,50886
97	P12344	GOT2	Aspartato aminotransferase, mitocondrial	258		9.19/47.514	16.05			
98	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	3677	6.706837/39.408	6.63/42.989	38.58	Ø	Ø	-1,71036
104	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	12262	7.096176/42.215	7.60/47.096	55.07	Ø	Ø	-1,35163
104	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	4604		6.37/47.326	27.65			
104	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	3148		6.63/42.989	45.41			

105	A5D984	PKM	Piruvato quinase	2871	8.004635/54.773	7.96/57.949	41.05	Ø	Ø	-1,25599
134	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	30747	9.967555/37.151	8.51/35.868	31.83	Ø	Ø	-
134	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	430		8.12/36.598	15.06			
137	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	10483	7.453071/39.022	6.63/42.989	46.72	Ø	Ø	-
137	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	1175		8.45/39.436	33.79			
150	Q27975	HSPA1A	Choque térmico 70 kDa proteína 1A	582	5.838934/68.327	5.67/70.259	12.32	Ø	Ø	+1,69401
336	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	8989	7.866744/32.295	8.51/35.868	22.52	+1,19168	-	-
336	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	947		8.12/36.598	16.57			
338	A6QLL8	ALDOA	Aldolase de frutose-bifosfato	672	7.514318/39.512	8.45/39.436	21.7	Ø	-	-
338	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	321		6.63/42.989	21.26			
346	A5D984	PKM	Piruvato quinase	2105	8.356243/61.969	7.96/57.949	22.98	Ø	-	Ø
351	Q5E946	PARK7	homólogo da proteína 7 da doença de Parkinson	3437	6.103093/23.572	6.84/20.035	62.96	Ø	-	-

Tabela 7: Identificação de proteínas com diferentes expressões na carne de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho (DCGF). A análise da expressão dos pontos foi realizada usando o Programa ImageMaster Platinum com a identificação de proteínas por LC-MS/MS. Positivo (+) os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de Farelo de Glúten de Milho.

<u>Spot ID</u>	<u>Protein a ID</u>	<u>ABV</u>	<u>Proteína</u>	<u>Score</u>	<u>PI/Mw experimental</u>	<u>PI/Mw teórico</u>	<u>Cobertura (%)</u>	<u>Diferença de Expressão 018%</u>	<u>Diferença de Expressão 036%</u>	<u>Diferença de Expressão 054%</u>
3	Q32KV0	PGAM2	Fosfoglicerato mutase 2	3228.593	9.015116/29.422	8.99/ 28.685	26.88	+1,7429	Ø	Ø
4	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	9579.692	8.24186/ 36.430	8.51/ 35.868	23.42	+2,03265	Ø	Ø

	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	4103.902		8.12/ 36.598	44.28			
5	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	16133.71	7.786047/39.255	8.51/ 35.868	23.42	+1,4498	∅	∅
8	Q08DP0	PGM1	Fosfoglucomutase-1	1339.007	7.232558/71.120	6.36/ 61.589	29.18	+1,24278	∅	∅
10	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	28580.23	8.445349/124.909	8.51/ 35.868	31.83	-1,649	∅	∅
	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	3125.846		8.12/ 36.598	43.37			
	Q3T0P6	PGK1	Fosfoglicerato quinase 1	1802.063		8.48/ 44.538	42.69			
14	P33097	GOT1	Aspartato aminotransferase, citoplasmática	1901.688	7.663953/42.571	7.09/ 46.399	30.02	-	-	-
	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	576.1295		6.63/ 42.989	21.52			
15	P00570	AK1	Adenilato quinase isoenzima 1	322.0235	8.022093/24.083	8.40/ 21.664	17.01	-	∅	∅
	P41976	SOD2	Superóxido dismutase [Mn], mitocondrial	284.8001		8.70/ 24.638	9.46			
21	Q5E947	PRDX1	Peroxirredoxina-1	751.7419	9.462791/26.542	8.59/ 22.210	14.57	-	∅	∅
22	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	16745.01	6.727907/26.234	6.45/ 26.690	71.49	-	∅	∅
	Q9N0V4	GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1	413.871		6.91/ 25.635	7.8			
24	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	9863.284	6.605814/26.697	6.45/ 26.690	65.46	-	∅	∅
25	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	3515.02	7.54186/ 27.541	6.45/ 26.690	28.51	-	∅	∅
	P02192	MB	Mioglobina	2683.425		6.90/ 17.078	17.53			

30	Q3SZX 4	CA3	Anidrase carbônica 3	1609.23 4	8.038372/ 29.826	7.71/ 29.370	25.77	-	∅	∅
32	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	5808.99	6.288372/ 34.537	6.16/ 36.438	25.75	-	∅	∅
33	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	4020.97 2	6.483721/ 35.967	6.16/ 36.438	25.75	-	-1,21199	∅
	P16116	AKR1B1	Aldo-ceto redutase família 1 membro B1	1805.75 5		5.89/ 35.919	30.48			
34	Q3T145	MDH1	Malato desidrogenase, citoplasmática	2146.18 7	6.32093/ 35.509	6.16/ 36.438	21.86	-	∅	∅
36	Q5EA88	GPD1	Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)], citoplasmático	1935.84 2	7.2/ 37.057	6.42/ 37.648	34.96	+2,22514	∅	∅
44	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	54264.7 7	8.624419/ 39.761	8.51/ 35.868	43.84	-	∅	-
	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	1282.10 8		8.12/ 36.598	31.63			
52	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	1848.85 8	6.866279/ 49.200	7.60/ 47.096	23.27	-	∅	∅
53	P00829	ATP5F1 B	Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial	883.844 8	5.181395/ 53.793	5.15/ 56.284	10.98	-	∅	-1,42253
68	Q5E946	PARK7	homólogo da proteína 7 da doença de Parkinson	8346.84 9	7.036322/ 25.169	6.84/ 20.035	74.07	∅	-1,18257	∅
69	Q5E956	TPI1	Triosefosfato isomerase	28821.9	7.346198/ 27.022	6.45/ 26.690	92.77	∅	-1,15088	∅
	Q9N0V 4	GSTM1	Glutathiona S-transferase Mu 1	593.785 9		6.91/ 25.635	19.72			
72	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial	1751.50 8	9.165721/ 39.259	8.82/ 35.668	48.24	∅	-1,51687	∅
	O97764	CRYZ	Zeta-cristalino	346.144 3		8.28/ 35.383	23.94			

73	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial	7081.38	9.475596/ 40.703	8.82/ 35.668	60.95	∅	-1,6557	∅
74	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	12081.75	8.990919/ 41.947	8.51/ 35.868	31.83	∅	+1,25818	∅
75	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	5834.641	7.338252/ 45.813	7.60/ 47.096	52.76	∅	-1,352	∅
	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	3198.185		6.37/ 47.326	16.59			
77	A5D984	PKM	Piruvato quinase	3910.357	7.807037/ 62.777	7.96/ 57.949	51.98	∅	-1,36117	∅
78	A5D984	PKM	Piruvato quinase	4217.913	7.656073/ 64.367	7.96/ 57.949	43.69	∅	-1,52142	-1,67791
79	A5D984	PKM	Piruvato quinase	4675.108	8.101022/ 63.679	7.96/ 57.949	47.83	∅	-1,44771	∅
82	Q08DP0	PGM1	Fosfoglucomutase-1	7020.496	6.869467/ 67.193	6.36/ 61.589	49.82	∅	-1,77107	∅
83	P19120	HSPA8	Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa	11207.23	5.677639/ 77.775	5.37/ 71.241	39.08	∅	-2,06076	∅
	P34933	HSPA2	Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico	8132.687		5.43/ 69.740	16.82			
	P0CB32	HSPA1L	Choque térmico 70 kDa proteína 1-like	7258.088		5.89/ 70.389	8.74			
	Q27975	HSPA1A	Choque térmico 70 kDa proteína 1A	6553.17		5.67/ 70.259	8.11			
	Q27965	HSPA1B	Choque térmico 70 kDa proteína 1B	6553.17		5.67/ 70.228	8.11			
	Q0VCX2	HSPA5	Chaperona do retículo endoplasmático BiP	4438.588		5.07/ 72.400	5.19			
113	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3	18607.84	8.180477/ 29.764	7.71/ 29.370	51.54	∅	-1,16987	∅

	Q3T0P6	PGK1	Fosfoglicerato quinase 1	1179.234		8.48/ 44.538	30.7			
	Q32KV0	PGAM2	Fosfoglicerato mutase 2	615.6025		8.99/ 28.685	15.42			
	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	194.9325		6.63/ 42.989	13.65			
115	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	7216.329	8.593644/ 35.439	8.12/ 36.598	44.28	∅	∅	-1,62195
	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3	4684.081		7.71/ 29.370	41.92			
	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	3087.262		8.51/ 35.868	18.02			
118	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	14814.69	6.925085/ 42.884	6.63/ 42.989	48.82	∅	∅	-1,66857
	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1658.072		6.63/ 42.989	18.02			
119	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	13778.97	7.227015/ 47.312	7.60/ 47.096	55.76	∅	∅	-1,19226
	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	6038.344		6.37/ 47.326	23.5			
123	A5D984	PKM	Piruvato quinase	5019.597	7.552781/ 63.225	7.96/ 57.949	46.89	∅	∅	-1,40265

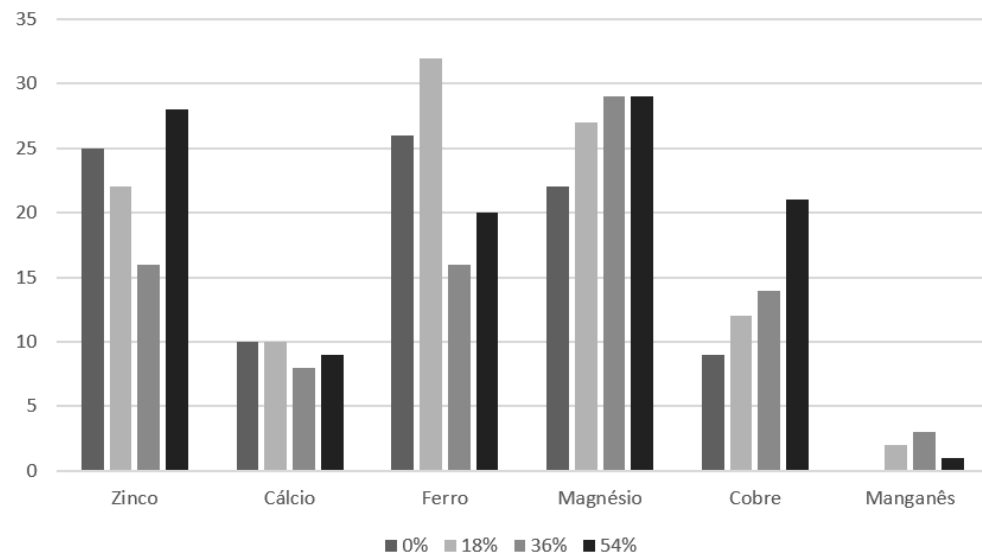


Figura 6: Incidência de *spots* no tecido muscular com cada mineral avaliado nos diferentes níveis de inclusão de DCGF.

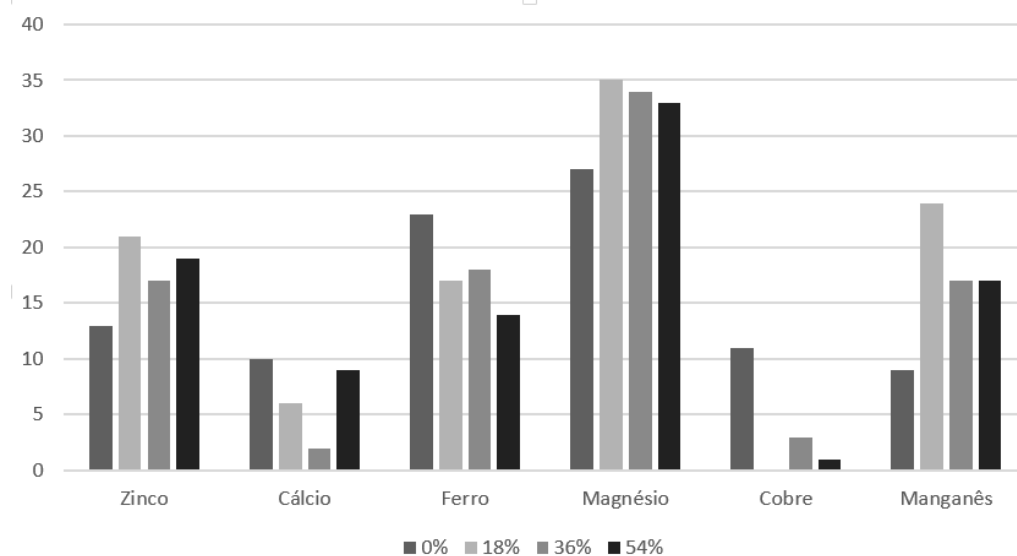


Figura 7: Incidência de *spots* na carne com cada mineral avaliado nos diferentes níveis de inclusão de DCGF.

Tabela 8: Concentração de zinco, manganês, cálcio, ferro, cobre e magnésio (ng mL⁻¹) de acordo com cada spots protéicos das amostras do tecido muscular no período ante rigor mortis dos grupos (T1, T2, T3 e T4), nos quais foram analisados quanto a presença desses elementos. Os mesmos são representados na figura 3, e na tabela 4 quanto as proteínas identificadas.

<i>Spot</i> ID	Zinco (Zn) (ng mL ⁻¹)	Manganês (Mn) (ng mL ⁻¹)	Cálcio (Ca) (ng mL ⁻¹)	Ferro (Fe) (ng mL ⁻¹)	Cobre (Cu) (ng mL ⁻¹)	Magnésio (Mg) (ng mL ⁻¹)
2 T1 M	-	-	0.051	4.288	-	0.008
2 T2 M	0.789	-	0.051	2.748	2.684	0.004
2 T3 M	0.952	-	-	0.975	5.924	-
2 T4 M	1.316	-	-	-	0.368	-
3 T1 M	-	-	-	2.053	-	0.008
3 T2 M	-	-	-	1.763	-	0.006
3 T4 M	1.087	-	-	-	-	0.014
4 T1 M	-	-	0.016	-	-	0.005
4 T2 M	-	-	-	0.959	-	0.002
4 T3 M	0.502	3.059	-	3.925	2.391	0.013
4 T4 M	1.178	-	0.051	-	2.492	0.004
5 T1 M	1.282	-	-	-	2.770	0.001
5 T2 M	-	-	-	1.986	-	0.009
5 T3 M	-	-	-	1.327	-	0.018
5 T4 M	1.178	-	-	0.498	-	-
9 T1 M	0.336	-	-	-	-	-
9 T2 M	-	0.121	-	2.271	-	0.008
9 T3 M	-	-	-	0.809	2.268	0.039
9 T4 M	0.067	-	-	-	-	0.013
10 T1 M	0.363	-	-	1.524	-	-
10 T2 M	0.274	-	-	-	-	-
10 T3 M	0.059	-	-	-	-	0.032
10 T4 M	1.056	-	-	-	-	0.004
12 T1 M	0.837	-	-	-	0.037	-
12 T2 M	1.244	-	-	0.695	-	0.009
12 T3 M	-	-	-	1.799	-	-
12 T4 M	1.267	-	-	0.073	-	-
13 T1 M	2.287	-	-	-	-	-
13 T2 M	1.293	-	-	1.089	4.782	0.001
13 T3 M	-	-	-	0.358	3.090	0.003
13 T4 M	0.912	-	-	1.011	1.756	0.007
14 T1 M	-	-	-	7.731	-	0.007
14 T2 M	-	0.037	0.051	1.996	-	0.003
14 T3 M	-	-	0.139	3.054	0.390	0.111
14 T4 M	0.714	2.975	-	-	-	0.144
21 T1 M	-	-	-	1.457	-	0.003
21 T2 M	1.279	-	-	2.214	-	-
21 T3 M	0.230	-	-	3.334	2.460	0.008
21 T4 M	0.312	-	0.597	-	-	0.141
23 T1 M	0.587	-	-	-	-	0.003
23 T2 M	-	-	-	0.384	-	-
23 T3 M	-	-	-	0.659	0.704	0.008
23 T4 M	0.867	-	-	0.783	3.042	0.003
27 T1 M	1.271	-	-	0.565	0.320	0.001
27 T2 M	0.086	-	-	1.504	-	0.011
27 T3 M	1.101	-	-	-	-	0.080
27 T4 M	0.779	-	0.068	0.389	3.293	0.001

33 T1 M	1.306	-	0.324	-	-	0.007
33 T2 M	-	-	-	1.053	0.368	0.001
33 T3 M	-	-	-	-	-	0.042
33 T4 M	1.161	-	-	0.819	2.556	0.004
34 T1 M	1.326	-	-	1.032	2.754	0.005
34 T2 M	0.626	-	0.095	-	-	0.008
34 T3 M	-	-	-	-	-	0.055
34 T4 M	0.007	-	0.350	-	0.592	0.139
35 T1 M	1.276	-	-	-	-	0.002
35 T2 M	1.245	-	-	1.151	4.034	0.013
35 T3 M	-	-	-	-	0.913	0.005
35 T4 M	0.778	-	-	0.114	0.016	0.002
36 T1 M	1.214	-	0.130	1.623	0.587	0.003
36 T2 M	1.292	-	0.227	-	1.201	0.012
36 T3 M	0.255	-	-	-	-	0.105
36 T4 M	-	-	-	0.643	1.436	0.006
37 T3 M	1.196	1.501	-	6.118	-	0.093
38 T1 M	0.235	-	-	1.872	-	-
38 T2 M	0.882	-	-	1.270	2.113	0.007
38 T3 M	-	-	1.284	1.270	-	0.731
38 T4 M	1.298	-	-	0.254	-	0.006
39 T1 M	1.308	-	-	1.524	1.654	-
39 T2 M	-	-	-	3.993	-	0.002
39 T3 M	-	-	-	-	-	0.022
39 T4 M	-	-	0.068	4.972	-	0.113
41 T1 M	-	-	-	2.665	-	-
41 T2 M	-	-	-	1.265	-	0.038
41 T3 M	0.710	-	-	-	2.732	0.013
41 T4 M	0.576	-	-	8.203	-	0.026
42 T1 M	1.276	-	0.209	2.017	1.676	0.022
42 T2 M	-	-	-	6.072	0.384	-
42 T3 M	1.095	-	0.051	-	0.699	0.014
42 T4 M	1.293	-	0.033	-	-	0.012
67 T1 M	0.598	-	-	0.042	-	0.001
67 T2 M	0.545	-	0.368	5.247	-	-
67 T3 M	1.037	-	-	-	0.726	0.005
67 T4 M	0.752	-	-	3.246	4.050	-
89 T1M	0.345	-	0.104	0.161	-	-
89 T2 M	0.354	-	-	5.227	-	0.026
89 T3 M	1.134	-	0.104	-	0.891	0.139
89 T4 M	1.200	-	0.077	-	1.163	0.079
90 T1 M	1.407	-	-	0.337	-	0.002
90 T2 M	-	-	0.386	3.707	-	-
90 T3 M	0.117	-	0.350	2.639	-	0.277
90 T4 M	-	-	-	0.819	-	0.008
91 T1 M	-	-	-	1.493	-	-
91 T2 M	-	-	-	2.048	-	-
91 T3 M	-	-	-	-	0.262	-
91 T4 M	-	-	-	2.473	1.318	0.007
94 T1 M	0.217	-	0.051	-	-	0.004
94 T2 M	-	-	-	4.926	-	-
94 T3 M	-	-	-	2.390	1.217	0.068
94 T4 M	-	-	-	1.281	1.793	0.006
95 T1 M	-	-	-	0.451	-	-

95 T2 M	0.901	-	-	0.280	2.119	-
95 T3 M	0.685	-	-	-	-	0.199
95 T4 M	0.781	-	-	-	0.726	-
96 T1 M	0.352	-	0.315	0.690	-	0.012
96 T2 M	0.364	-	-	1.867	-	0.008
96 T4 M	-	-	0.033	1.296	1.414	0.005
97 T1 M	0.480	-	-	-	-	0.006
97 T2 M	1.242	-	0.174	0.555	2.215	0.002
97 T3 M	-	-	0.245	2.038	-	0.076
97 T4 M	1.134	-	-	0.166	2.908	-
98 T1 M	0.527	-	-	-	-	-
98 T2 M	1.215	-	-	-	0.491	0.006
98 T3 M	0.685	-	-	1.156	-	0.007
98 T4 M	1.057	-	-	-	0.768	0.002
104 T1 M	1.277	-	0.289	3.303	-	-
104 T2 M	1.063	-	-	0.036	-	0.088
104 T4 M	0.438	-	-	-	-	0.003
105 T2 M	0.098	-	-	-	2.754	-
105 T3 M	1.219	-	-	-	-	-
105 T4 M	0.077	-	0.183	-	-	0.023
106 T1 M	0.198	-	-	3.080	-	-
134 T1 M	0.195	-	-	0.296	-	-
134 T2 M	1.218	-	0.095	-	0.144	0.007
134 T3 M	-	0.399	0.104	4.584	-	0.162
137 T1 M	1.203	-	-	0.581	0.027	0.009
137 T2 M	0.054	-	0.209	0.736	-	0.007
137 T3 M	-	-	-	5.527	-	-
137 T4 M	0.688	-	-	0.482	0.112	0.008
150 T1 M	-	-	0.139	6.761	-	0.026
150 T2 M	0.117	-	-	3.842	-	0.005
150 T3 M	0.404	-	-	-	-	0.017
150 T4 M	-	-	-	0.088	1.126	0.017
336 T1 M	-	-	-	7.793	-	0.019
336 T2 M	-	-	-	7.233	-	0.084
336 T3 M	0.423	-	-	-	-	0.032
336 T4 M	0.877	-	-	1.633	2.722	0.003
338 T1 M	0.074	-	-	1.654	-	0.008
338 T2 M	-	-	-	2.774	-	0.037
338 T3 M	-	0.009	-	4.309	-	0.106
346 T1 M	0.415	-	-	2.831	0.160	-
346 T2 M	0.568	-	0.280	0.669	4.189	0.008
346 T3 M	-	-	-	0.389	-	0.026
346 T4 M	-	-	-	-	1.067	-
351 T1 M	-	-	-	3.505	-	-
351 T2 M	0.438	-	-	2.525	-	-
351 T3 M	-	-	0.315	3.863	-	-
351 T4 M	0.882	-	-	1.924	-	0.006

Tabela 9: Concentração de zinco, manganês, cálcio, ferro, cobre e magnésio (ng mL⁻¹) de acordo com cada spots protéicos das amostras de carne (tecido muscular no período post rigor mortis) dos grupos (T1, T2, T3 e T4), nos quais foram analisados quanto a presença desses elementos. Os mesmos são representados na figura 4, e na tabela 5 quanto as proteínas identificadas.

<i>Spot</i> ID	Zinco (Zn) (ng mL ⁻¹)	Manganês (Mn) (ng mL ⁻¹)	Cálcio (Ca) (ng mL ⁻¹)	Ferro (Fe) (ng mL ⁻¹)	Cobre (Cu) (ng mL ⁻¹)	Magnésio (Mg) (ng mL ⁻¹)
3 T1 C	-	1.242	0.086	-	-	0.066
3 T2 C	0.019	7.026	0.121	2.935	-	0.005
3 T3 C	-	1.075	-	2.784	-	0.105
3 T4 C	0.106	-	-	-	-	0.075
4 T1 C	-	-	-	1.105	-	0.029
4 T2 C	-	-	-	-	-	0.119
4 T3 C	0.800	-	-	-	-	0.071
4 T4 C	-	-	-	-	-	0.437
5 T1 C	-	-	-	-	-	0.102
5 T2 C	-	2.428	-	1.146	-	0.158
5 T3 C	-	-	-	-	-	0.069
5 T4 C	0.667	-	0.121	3.412	-	0.016
8 T1 C	0.213	2.364	-	6.533	-	0.040
8 T2 C	0.190	1.724	-	4.122	-	0.057
8 T3 C	1.111	-	0.007	3.749	-	0.004
8 T4 C	-	-	-	-	0.528	0.200
10 T1 C	0.286	-	-	0.570	-	0.007
10 T2 C	-	-	0.121	3.220	-	0.144
10 T3 C	-	-	-	-	-	0.369
10 T4 C	0.474	6.136	0.210	1.426	-	0.574
14 T1 C	-	-	0.033	6.010	-	-
14 T2 C	-	1.650	0.007	-	-	0.023
14 T3 C	4.371	-	-	-	-	0.081
14 T4 C	1.027	1.437	-	4.511	-	0.044
15 T1 C	0.953	-	-	6.564	-	0.090
15 T2 C	0.927	1.882	-	-	-	0.072
15 T3 C	0.089	-	-	6.450	-	0.025
15 T4 C	0.836	0.195	-	-	-	0.089
21 T2 C	-	1.437	-	5.833	-	0.086
21 T3 C	0.069	-	-	1.390	-	0.059
21 T4 C	0.472	1.594	0.641	-	-	0.275
22 T1 C	-	-	0.280	3.941	-	0.010
22 T2 C	1.001	2.938	-	-	-	0.079
22 T3 C	-	0.380	-	-	-	0.248
22 T4 C	0.124	-	-	-	-	0.116

24 T1 C	1.029	-	0.447	-	0.267	0.313
24 T2 C	1.393	0.556	-	7.342	-	0.016
24 T3 C	-	1.047	-	5.315	-	0.121
24 T4 C	-	0.908	-	7.015	-	0.095
25 T1 C	-	-	-	1.353	-	0.018
25 T2 C	-	9.908	-	-	-	0.206
25 T3 C	0.484	-	-	11.469	-	0.016
25 T4 C	-	0.649	-	-	-	0.067
30 T1 C	1.131	-	-	-	-	0.121
30 T2 C	0.320	3.281	-	6.077	-	0.033
30 T3 C	-	-	-	5.190	-	0.060
30 T4 C	-	-	-	-	-	0.253
32 T1 C	-	-	-	-	-	0.022
32 T2 C	-	3.624	-	5.325	-	0.089
32 T3 C	-	2.373	-	-	-	0.085
32 T4 C	-	0.260	-	1.374	-	0.105
33 T1 C	-	-	-	0.726	0.288	0.019
33 T2 C	-	-	-	2.795	-	0.056
33 T3 C	4.205	-	-	-	0.080	0.069
33 T4 C	-	-	-	6.658	-	0.074
34 T1 C	0.724	-	0.430	1.167	1.142	0.245
34 T2 C	1.287	3.661	-	4.812	-	0.024
34 T3 C	1.774	1.835	-	6.020	-	0.059
34 T4 C	1.372	1.835	-	8.498	-	0.039
36 T1 C	1.107	0.473	-	-	-	0.126
36 T2 C	0.963	0.788	-	-	-	0.125
36 T3 C	0.605	-	-	-	-	0.087
36 T4 C	0.929	0.695	-	-	-	0.119
37 T1 C	-	2.141	-	-	-	0.217
44 T1 C	-	1.659	0.077	8.021	-	0.172
44 T2 C	0.052	12.568	1.654	-	-	0.957
44 T3 C	-	1.288	-	3.142	-	0.098
44 T4 C	-	3.077	0.051	5.361	-	0.155
52 T1 C	0.978	1.186	-	6.398	-	0.088
52 T2 C	0.921	-	-	-	-	0.162
52 T3 C	0.291	-	-	-	-	0.182
52 T4 C	-	1.251	-	-	-	0.036
53 T1 C	-	-	-	1.021	0.907	-
53 T2 C	0.803	-	-	1.913	-	0.052
53 T3 C	-	-	-	-	-	0.294
53 T4 C	-	-	-	3.879	-	-
68 T1 C	0.185	-	-	2.069	0.304	0.040

68 T2 C	1.115	5.487	-	-	-	0.059
68 T3 C	0.318	-	-	1.882	0.763	0.045
68 T4 C	1.687	-	1.759	4.677	-	0.076
69 T1 C	-	0.167	-	2.608	-	0.083
69 T2 C	0.911	2.595	-	5.491	-	0.006
69 T3 C	-	0.148	-	1.550	-	0.083
69 T4 C	0.792	-	0.285	-	-	0.102
72 T1 C	-	-	-	0.695	-	0.053
72 T2 C	-	-	-	-	-	0.172
72 T3 C	-	0.111	-	7.130	-	0.182
72 T4 C	-	-	4.278	-	-	0.788
73 T2 C	1.516	0.593	-	4.138	-	0.052
73 T3 C	-	0.881	-	-	-	0.018
73 T4 C	1.415	1.696	-	6.316	-	0.080
74 T1 C	-	-	0.157	-	-	0.101
74 T2 C	0.903	-	-	-	-	0.105
74 T3 C	-	0.445	-	-	-	0.087
74 T4C	0.472	-	0.579	-	-	0.621
75 T1 C	-	-	-	2.250	-	0.112
75 T2 C	0.990	1.261	-	-	-	0.046
75 T3 C	0.414	-	-	3.723	0.160	0.581
75 T4 C	0.906	0.074	-	-	-	0.115
77 T1 C	-	-	-	1.167	0.881	0.024
77 T2 C	0.736	2.475	-	5.657	-	0.072
77 T3 C	0.740	-	-	-	-	0.284
77 T4 C	0.871	-	-	-	-	0.062
78 T1 C	0.360	1.103	0.095	0.296	0.886	0.115
78 T2 C	0.564	-	-	-	-	0.100
78 T3 C	0.417	1.400	-	-	-	0.142
78 T4 C	1.108	0.426	-	-	-	0.177
79 T1 C	-	0.575	-	6.715	-	0.096
79 T2 C	-	1.919	-	-	-	0.096
79 T3 C	-	1.826	-	6.098	-	0.131
79 T4 C	-	11.827	-	-	-	0.071
82 T1 C	0.345	-	-	6.964	-	0.147
82 T2 C	0.776	-	-	-	-	0.074
82 T3 C	-	-	-	3.360	-	0.207
82 T4 C	0.114	1.279	-	5.460	-	0.078
83 T1 C	-	-	-	0.674	2.284	-
83 T2 C	1.335	9.009	0.086	-	-	0.531
83 T3 C	-	-	-	-	-	0.099
83 T4 C	-	-	-	-	-	0.081

113 T1 C	-	-	-	-	0.656	0.018
113 T2 C	-	-	-	-	-	0.136
113 T4 C	-	-	-	-	-	0.133
115 T1 C	0.356	5.209	0.104	6.258	-	0.085
115 T2 C	-	9.472	-	8.047	-	0.323
115 T3 C	-	2.067	-	5.180	-	0.029
118 T1 C	-	-	-	-	0.187	0.023
118 T2 C	-	1.205	-	4.506	-	0.071
118 T3 C	0.080	-	0.597	3.863	-	0.045
118 T4 C	-	0.797	-	4.859	-	0.146
119 T1 C	-	-	-	10.847	-	0.110
119 T2 C	0.876	2.280	-	-	-	0.151
119 T3 C	1.062	0.148	-	6.663	-	0.174
119 T4 C	0.636	-	0.227	7.830	-	0.017
123 T1 C	1.232	-	0.016	0.524	0.432	0.075
123 T2 C	0.249	-	0.174	6.300	-	0.079
123 T3 C	0.447	-	-	-	-	0.130
123 T4 C	0.512	-	-	-	-	0.135

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Baldassini, W. A., C. P. Braga, L. A. L. Chardulo, J. A. I. V. Silva, J. M. Malheiros, L. G. De Albuquerque, T. T. Fernandes, and P. D. M. Padilha. 2015. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). *Food Chem.* 169:65–72. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.131.
- Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., de Paula Araújo, W. L., da Cunha Bataglioli, I., da Silva, J. M., da Silva, Buzalaf, M.A.R., Fleuri, L.F., Padilha, P.M., **Characterization of molecular biomarkers of mercury exposure to muscle tissue of *Plagioscion squamosissimus* and *Colossoma macropomum* from the Amazon region.** *Food Chem.*, 276 (2019), pp. 247-254.
- Braga, C. P., A. C. Bittarello, C. C. F. Padilha, A. L. Leite, P. M. Moraes, M. A. R. Buzalaf, L. F. Zara, and P. M. Padilha. 2015. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta.* 132:239–244. doi:10.1016/j.talanta.2014.09.021. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.021>.
- Braga, C. P., Vieira, J. C. S., Grove, R. A., Boone, C. H.T., Leite, A. L., Buzalaf, M. A. R., Fernandes, A. A. H., Adamec, J., Padilha, P. M. (2017). A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 96, p. 817-832.
- Brand, M.D., 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472.
- Cañeque, V., C. Pérez, S. Velasco, M. T. Díaz, S. Lauzurica, I. Álvarez, F. Ruiz De Huidobro, E. Onega, and J. De La Fuente. 2004. Carcass and meat quality of light lambs using principal component analysis. *Meat Sci.* 67. doi:10.1016/j.meatsci.2004.01.002.
- Carapelli, R., de Oliveira, A. F., Giglioti, R., Tullio, R. R., Nassu, R. T., Oliveira, M. C. S., & Nogueira, A. R. A. (2020). Calcium, Fe, Cu, Zn, and Mg Fractionation in In Natura and Aged Beef Samples by Bioanalytical Methods. *Food Analytical Methods*, 13(1), 186-194.
- CRICHTON, R. R.; *Biological Inorganic Chemistry – An Introduction*. Oxford, Elsevier, 2008. P. 369.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. E HURRELL, R. F. “Bioavailability of minerals and trace elements”. *Nutr. Res. Ver.*, 9 : 295, 1996.
- Firkins, J.L.; Berger, L.L.; Fahey Jr, G.C. Evaluation of wet and dry distillers and wet and dry corn gluten feeds for ruminants. *Journal of Animal Science* **1985**, 60, 847–860, doi:10.2527/jas1985.603847x.
- Gagaoua, M., Bonnet, M., & Picard, B. (2020). Protein Array-based approach to evaluate biomarkers of beef tenderness and marbling in cows: Understanding of the underlying mechanisms and prediction. *Foods*, 9, 1180.
- Gagaoua, M., Hughes, J., Terlouw, E. M. C., Warner, R. D., Purslow, P. P., Lorenzo, J. M., & Picard, B. (2020). Proteomic biomarkers of beef colour. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 234–252.
- Gagaoua, M., Terlouw, E.M., Micol, D., Boudjellal, A., Hocquette, J.F., Picard, B., 2015. Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the longissimus thoracis muscle of young Blond d’Aquitaine bulls using protein biomarkers. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6799–6809.
- Gao, G.; Yi, J.; Zhang, M.; Xiong, J.; Geng, L.; Mu, C.; Yang, L. Effects of iron and copper in culture medium on bovine oocyte maturation, preimplantation embryo development, and apoptosis of blastocysts in vitro. *J. Reprod. Dev.* 2007, 53, 777-784.
- Garcia, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. “Trends in metal-binding and metalloprotein analysis”. *Talanta.*, 69 : 1, 2006.

- Grabez, V., Kathri, M., Phung, V., Moe, K.M., Slinde, E., Skaugen, M., Saarem, K., Egelanddal, B., 2015. Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 93, 1967–1979.
- Guillemain, N., Jurie, C., Renand, G., Hocquette, J.F., Micol, D., Lepetit, J., Picard, B., 2012. Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *Int. J. Biol.* 4, 26–38.
- Ham, G.A.; Stock, R.A.; Klopfenstein, T.J.; Huffman, R.P. Determining the net energy value of wet and dry corn gluten feed in beef growing and finishing diets. *Journal of animal science* **1995**, 73, 353–359, doi:10.2527/1995.732353x.
- Itzhaki, R. F., & Gill, D. M. (1964). **A micro-biuret method for estimating proteins.** *Analytical biochemistry*, 9(4), 401-410.
- Jia, X., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K.I., Bendixen, E., 2006. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics* 6, 936–944.
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K.I., Hollung, K., 2009. Peroxiredoxin-6—a potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J. Anim. Sci.* 87, 2391–2399.
- Joseph, P., Suman, S.P., Rentfrow, G., Li, S., Beach, C.M., 2012. Proteomics of muscle-specific beef color stability. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3196–3203.
- Kampman, K.A.; Loerch, S.C. Effects of dry corn gluten feed on feedlot cattle performance and fiber digestibility. *Journal of animal science* **1989**, 67, 501–512, doi:10.2527/jas1989.672501x.
- Kim, N.K., Cho, S., Lee, S.H., Park, H.R., Lee, C.S., Cho, Y.M., Choy, Y.H., Yoon, D., Im, S.K., Park, E.W., 2008. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Sci.* 80, 1068–1073.
- Kim, Y. H. B., Warner, R. D., & Rosenvold, K. Influence of high pre-rigor temperature and fast pH fall on muscle proteins and meat quality: a review. *Animal Production Science*, v. 54, n. 4, p. 375-395, 2014.
- Krehbiel, C.R.; Stock, R.A.; Herold, D.W.; Shain, D.H.; Ham, G.A.; Carulla, J.E. Feeding wet corn gluten feed to reduce subacute acidosis in cattle. *Journal of animal science* **1995**, 73, 2931–2939, doi:10.2527/1995.73102931x.
- Laville, E., Sayd, T., Morzel, M., Blinet, S., Chambon, C., Lepetit, J., Renand, G., Hocquette, J.F., 2009. Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10755–10764.
- Lima, P. M., de CF Neves, R., Dos Santos, F. A., Pérez, C. A., Da Silva, M. O., Arruda, M. A., ... & Padilha, P. M. (2010). Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: preliminary results. *Talanta*, 82(3), 1052-1056.
- Lomiwes, D., Farouk, M.M., Wiklund, E., Young, O.A., 2014. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: a review. *Meat Sci.* 96, 26–40.
- MACKEN, C.N.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; STOCK, R. A. Effects of concentration of wet corn gluten feed in steam-flaked corn-based finishing diets. *Journal of Animal Science*, Albany, v. 82, p. 2718-2723, 2004.
- Malheiros, J. M., Braga, C. P., Grove, R. A., Ribeiro, F. A., Calkins, C. R., Adamec, J., & Chardulo, L. A. L. (2019). Influence of oxidative damage to proteins on meat tenderness using a proteomics approach. *Meat science*, 148, 64-71.
- Marsh BB, Ringkob TP, Russell RL, Swartz DR, Pagel LA (1987) Effects of early-postmortem glycolytic rate on beef tenderness. *Meat Science* 21(4), 241–248.
- MATOS, W. O.; MENEZES, E. A.; GONZALES, M. H.; COSTA, L. M.; TREVIZAN, L. C.; NOGUEIRA, A. R. A. “Partial microwave-assisted wet digestion of animal tissue using a

- baby-bottle sterilizer for analyte determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B*, 64 : 615, 2009.
- Miller, W.J. Zinc nutrition of cattle: A review. *J. Dairy Sci.* 1970, 53, 1123–1135.
- Moraes, P, Santos, F. A., Padilha, C. C. F., Vieira, J. C. S., Zara, L. F., Padilha, PM (2012). A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research*, v. 150, p. 195-199.
- Moraes, P. M., Santos, F. A., Cavecci, B., Padilha, C. C., Vieira, J. C., Roldan, P. S., & Padilha, P. D. M. **GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon Brazil**. *Food Chem.*, 141 (2013), pp. 2614-2617.
- Ohta, S., Ohsawa, I., Kamino, K., Ando, F., Shimokata, H., 2004. Mitochondrial ALDH2 deficiency as na oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1011, 36–44.
- Ouali, A., M. Gagaoua, Y. Boudida, S. Becila, A. Boudjellal, C. H. Herrera-Mendez, and M. A. Sentandreu. 2013. Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci.* 95:854–870. doi:10.1016/j.meatsci.2013.05.010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.010>.
- Pacheco, R.D.L.; Millen, D.D.; DiLorenzo, N.; Martins, C.L.; Marino, C.T.; Fossa, M. V; Beier, S.L.; DiCostanzo, A.; Rodrigues, P.H.M. Effects of feeding a multivalent polyclonal antibody preparation on feedlot performance, carcass characteristics, rumenitis, and blood gas profile in *Bos indicus* biotype yearling bulls. *Journal of Animal Science* **2012**, 90, 1898–1909, doi:<http://dx.doi.org/10.2527/jas.2010-3521>.
- Pflanzer, S.B. and de Felício, P.E., 2011. Moisture and fat content, marbling level and color of boneless rib cut from Nellore steers varying in maturity and fatness, *Meat Science*, 87, 7–11.
- Picard, B., & Gagaoua, M. (2017). Chapter 11 - proteomic investigations of beef tenderness. In M. L. Colgrave (Ed.). *Proteomics in Food Science: from farm to fork* (pp. 177– 197). London: Academic Press.
- Picard, B., & Gagaoua, M. (2020). Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. *Food Research International*, 127, 108739.
- Pike, M. M., T. P. Ringkob, D. D. Beekman, Y. O. Koh, and W. T. Gerthoffer. 1993. Quadratic relationship between early-post-mortem glycolytic rate and beef tenderness. *Meat Sci.* 34:13.
- Polati, R., Menini, M., Robotti, E., Million, R., Marengo, E., Novelli, E., Balzan, S., Cecconi, D., 2012. Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. *Food Chem.* 135, 2052–2069.
- Pulford, D.J., Fraga Vazquez, S., Frost, D.F., Fraser-Smith, E., Dobbie, P., Rosenvold, K., 2008. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Sci.* 79, 623–630.
- Rosa, A. F., Moncau, C. T., Poleti, M. D., Fonseca, L. D., Balieiro, J. C. C., Silva, S. L. E., & Eler, J. P. (2018). Proteome changes of beef in Nellore cattle with different genotypes for tenderness. *Meat Science*, 138 (June 2017), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.12.006>.
- SCOOT, T. L.; MILTON, C. T.; ERICKSON, G. E. KLOPFENSTEIN, T. J.; STOCK, R. A. Corn processing method in finishing diets containing wet corn gluten feed. *Journal of Animal Science*, Albany, v. 81, p. 3182-3190, 2003.
- Shackelford, S. D., T. L. Wheeler, and M. Koohmaraie. 1999. Evaluation of slice shear force as an objective method of assessing beef longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.* 77.
- Stelzleni, A.M.; Segers, J.R.; Stewart, R.L. Long-term use of corn coproducts as a source of protein in beef finishing diets and the effects on carcass characteristics and round muscle quality. *Journal of Animal Science* **2016**, 94, 1227–1237, doi:10.2527/jas.2015-9752.

- Suttle, N.F. *Mineral Nutrition of Livestock*, 4th ed.; CABI: Oxfordshire, UK, 2010.
- Thomas, K.J., McCoy, M.K., Blackinton, J., Beilina, A., van der Brug, M., Sandebring, A., Miller, D., Maric, D., Cedazo-Minguez, A., Cookson, M.R., 2011. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 20, 40–50.
- VAN EMON, Megan; SANFORD, Carla; MCCOSKI, Sarah. Impacts of bovine trace mineral supplementation on maternal and offspring production and health. *Animals*, v. 10, n. 12, p. 2404, 2020.
- Vieira, J. C. S., Braga, C. P., de Oliveira, G., de Lima Leite, A., de Queiroz, J. V., Cavecci, B., Bittarello, A.C., Buzalaf, M.A.R., Zara, L.F. , & de Magalhães Padilha, P. **Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish.** *Environ. Chem. Lett.*, 15 (2017), pp. 717-724.
- Wheeler, T. L., S. D. Shackelford, and M. Koohmaraie. 1996. Sampling, Cooking, and Coring Effects on Warner-Bratzler Shear Force Values in Beef. *J. Anim. Sci.* 74.
- Wu, W., Fu, Y., Therkildsen, M., Li, X.-M., & Dai, R.-T. (2015). Molecular understanding of meat quality through application of proteomics. *Food Reviews International*, 31, 13–28.
- Wysocka, D.; Snarska, A.; Sobiech, P. Iron in cattle health. *J. Elementology* 2020, 25, 1175–1185.
- Zapata, I., Zerby, H.N., Wick, M., 2009. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4956–4963.
- Zinn, R.A., Shen, Y., 1998. An evaluation of ruminally degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/1998.7651280x>.

CAPÍTULO III
FRACIONAMENTO METALOPROTEÔMICO DO TECIDO HEPÁTICO DE
BOVINOS NELORE TERMINADOS EM CONFINAMENTO

RESUMO

Na busca por um subproduto que otimize a produção e a eficiência em confinamento, o fornecimento do Farelo de Glúten de Milho (DCGF – “*Dry Corn Gluten Feed*”) surgiu como uma alternativa interessante. Porém há dúvidas acerca do impacto que um ingrediente novo possa trazer ao metabolismo de bovinos azebuados. Diante disto o trabalho objetivou avaliar a inclusão de diferentes níveis de DCGF no perfil mineral e proteico (metaloproteômico) do tecido hepático de bovinos Nelore na terminação em confinamento. As dietas experimentais foram compostas de 85% de concentrado contendo diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho (0%, 18%, 36% e 54%) em substituição ao milho grão. Após a coleta das amostras biológicas foram otimizados: procedimentos de extração da fração proteica das amostras para obtenção do proteoma por 2D PAGE; procedimentos de extração de minerais das amostras dos *spots* proteicos para determinação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) e procedimentos de preparo dos *spots* associados ao minerais por espectrometria de massas em sequência acoplado com cromatografia líquida (LC-MS/MS). Segundo os resultados, o Farelo de Glúten de Milho (DCGF) não se mostrou prejudicial à saúde hepática. As proteínas encontradas fazem parte da manutenção de processos biológicos, e a resposta hepática aos diferentes tratamentos mostrou bons resultados para a inclusão do subproduto na dieta. O ferro e o zinco foram os principais minerais do estudo, aparecendo em maiores frequências nos *spots* proteicos. Diante disto, a inclusão de 36% de DCGF mostrou-se a melhor recomendação em substituição ao milho moído, pois apresentou melhores resultados de desempenho, sem prejuízo à saúde animal.

Palavras-chave: tecido hepático, metaloproteômica, perfil mineral-proteico, 2D-PAGE, GFAAS, LC-MS/MS.

1. INTRODUÇÃO

O milho é o grão mais utilizado como fonte de energia e o farelo de soja o ingrediente proteico mais utilizado na formulação das dietas brasileiras de confinamento (PINTO e MILLEN et al., 2016). Ligado a isso, os custos do confinamento representam o maior entrave para sua utilização, devido principalmente a valorização dos grãos usados na alimentação animal (RESTLE et al., 2012), tornando necessário a busca por subprodutos ou alimentos mais econômicos, visando maximizar a eficiência do processo.

O alto valor proteico e energético dos grãos de destilaria pode ser útil para a substituição do milho em dietas de crescimento e terminação de bovinos de corte (Klopfenstein et al., 2008). Por ser proveniente da produção de etanol, os grãos de destilaria contém pouco amido, cerca de 4,85% (Liu, 2009). Assim, a substituição parcial do milho, e consequentemente do amido, por grãos de destilaria, pode melhorar a saúde metabólica e reduzir a incidência de acidose ruminal e de abscessos hepáticos (Larson et al. 1993; Klopfenstein et al., 2008).

Outro subproduto do processamento industrial do milho, mais especificamente proveniente da separação do glúten e do amido, é o Farelo de Glúten de Milho (DCGF – “*Dry Corn Gluten Feed*”), com composição atraente para ruminantes por ser rico em proteína bruta ($\pm 21,4\%$ PB) e fibra ($\pm 44,3\%$ FDN), mas com baixos teores de amido ($\pm 12,7\%$) e gordura ($\pm 5,04\%$ EE) (BEAUCHEMIN e KOENIG, 2005). Sua fração protéica tem características semelhantes às do farelo de soja, sendo grande parte da sua proteína degradada no rumen, (FIRKINS et al., 1985).

Na literatura inúmeras pesquisas avaliaram o efeito da inclusão de grãos de destilaria no desempenho de bovinos confinados, subprodutos bastante utilizados na nutrição animal. (HULS et al., 2008; Schoonmaker et al., 2010; Watson et al., 2014). No entanto, não foram encontradas pesquisas que avaliaram o efeito da inclusão de DCGF através do metaloproteoma de bovinos, especialmente no metabolismo hepático.

Notadamente, o fígado é um dos órgãos mais importantes do organismo animal, sendo ele de vital importância para o bom funcionamento do metabolismo (GUYTON, 1997). É também responsável pela produção e metabolismo de várias substâncias, além de atuar de forma direta no armazenamento e degradação de substâncias, hormônios e participar da síntese e secreção de sais biliares, promovendo a regulação dos carboidratos, proteínas e lipídeos.

Neste contexto, a proteômica pode ser capaz de elucidar possíveis alterações no metabolismo hepático através do mapeamento de suas proteínas e minerais a partir da inclusão de um subproduto.

Sendo assim, objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes níveis de DCGF na dieta de terminação de bovinos Nelore sobre proteínas e minerais relacionadas ao metabolismo hepático animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com os animais seguiram os padrões éticos de pesquisa (PROTOCOLO - CEUA 0203/2018), estabelecidos pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Campus de Botucatu.

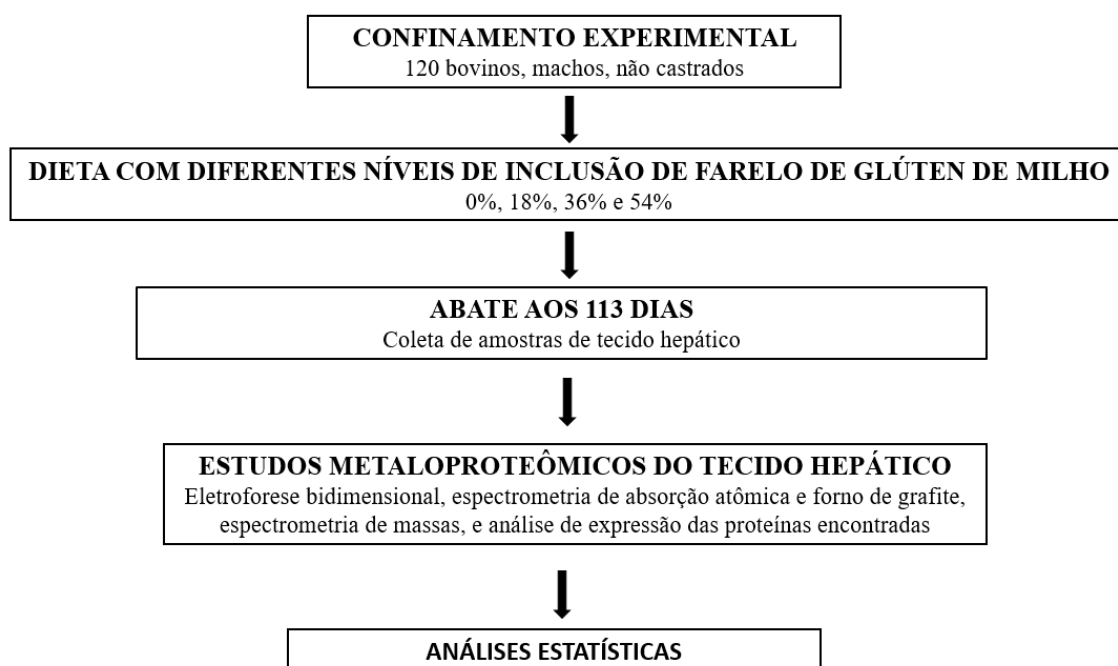


Figura 1: Fluxograma da metodologia de estudo.

2.1. Confinamento experimental

O estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Botucatu, no confinamento experimental do Departamento de Melhoramento de Nutrição Animal, entre os meses de Agosto a Dezembro de 2018. Foram utilizados 120 bovinos, machos não castrados, Nelore, com peso médio inicial de 361 kg, oriundos de pastagem, do mesmo rebanho. Os animais foram mantidos em baias com piso de concreto equipadas com bebedouro tipo concha com dimensionamento de 5 x 6 metros e área de cocho de 3,75 m, tendo uma lotação de cinco animais por baia.

Os animais foram alocados aleatoriamente nos tratamentos com diferentes níveis de Farelo de Glúten de Milho (0; 18%; 36% e 54% da MS) em dietas contendo cerca de 86,78%

de concentrado e 13,22% de volumoso (Tabela 1). Os tratamentos foram fornecidos duas vezes ao dia em horários fixos, no período da manhã (10h) e da tarde (16h). No total, cada tratamento foi distribuído aleatoriamente em 5 baias e semanalmente foi coletado amostras dos ingredientes do concentrado e do feno. Para determinação do consumo de matéria seca e eficiência alimentar a unidade experimental será a baia. Os animais foram pesados no início e ao fim do período do experimento, depois de jejum alimentar e hídrico de 16 horas. As pesagens intermediárias foram conduzidas sem jejum. Para obtenção do consumo diário de matéria seca, a dieta ofertada e as sobras foram pesadas, e amostras destes, coletadas, para determinação do teor de matéria seca.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingredientes e composição da dieta (%MS)	Níveis de DCGF (% MS)			
	0	18	36	54
Bagaço da cana-de-açúcar	13.22	13.23	13.2	13.24
Milho moído	71.34	59.95	47.38	29.34
Farelo de soja	11.89	5.4	0	0
Farelo de Glúten de Milho	0	18	36	54
Núcleo de vitaminas e minerais ¹	3.42	3.42	3.42	3.42
Cloreto de Potássio	1.3	0	0	0
Matéria seca (% da dieta)	84.24	84.16	84.1	83.92
Proteína Bruta (PB)	13.08	13.3	13.98	16.97
Extrato Etéreo (EE)	3.3	3.63	3.92	4.07
Fibra em detergente neutro (FDN)	18.62	24.69	30.75	37.09
Carboidratos não fibrosos (CNF) ²	62.06	54.92	47.29	36.89
Amido	46.05	40.72	34.71	25.52
Cinzas	2.93	3.46	4.05	4.99
ELg (Mcal / kg MS) ³	1.3	1.25	1.32	1.32

¹Núcleo de vitaminas e minerais contendo: 19,5% de Ca; 1,9% S; 1,5% Mg; 4,5% Na; 1,6% P; 1715 ppm Zn; 1285 ppm Mn; 428 ppm Cu; 25 ppm I; 5,7 ppm Se; 8,5 ppm Co; 286 ppm Fe; 86.000 UI Vit A; 115.000 UI Vit D3; 128.000 UI Vit E; 0,39% de uréia; 945 ppm de monensina sódica.

²Estimado pela equação CNF = 100 - (% PB +% EE +% cinza +% FDN).

³Energia líquida para valores de ganho, calculados a partir de dados de desempenho usando equações de requisitos de energia para manutenção e ganho de peso de acordo com Zinn e Shen (1998).

2.2. Abate

O abate dos animais foi realizado em frigorífico comercial, sob procedimentos normais de inspeção federal, sendo precedido de jejum de sólidos e líquidos dos animais por no mínimo 16 horas.

2.3. Coleta de amostras do tecido hepático

Amostras do tecido hepático utilizadas no estudo metaloproteômico foram coletadas imediatamente ao abate e congeladas em nitrogênio líquido e transportadas para o laboratório de metalômica (item 2.6).

2.4. Estudo metaloproteômico do tecido hepático

Estudos metaloproteômicos utilizando eletroforese bidimensional (2D-PAGE), espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS) e cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS/MS) foram conduzidos para fracionar o metaloproteoma das amostras do tecido hepático e caracterizar os *spots* proteicos associados aos minerais.

Para isso, *pool* de amostras do tecido hepático dos animais que receberam essas dietas foram utilizadas no estudo metaloproteoma.

2.4.1. Procedimentos de extração e precipitação das proteínas.

Para processo de extração das proteínas, 250 mg de amostras de tecidos foram pesados e transferidos para *vials* de 2 mL. Posteriormente, adicionou-se em cada *vial* 500 µL de água ultrapura, usando um OMNI Bead Ruptor e esferas de cerâmica de 2,8 mm (OMNI International, Kennesaw, GA, EUA) (velocidade = 3, ciclos = 2, tempo = 60 s); entre os ciclos, as amostras foram mantidas em gelo por 5 min. O processo de extração usando água ultrapura foi usado para maximizar a extração de proteínas solúveis em água. Os *vials* foram centrifugados a 14000 rpm, 4°C por 60 min. A precipitação da fração proteica foi feita adicionando-se 400 µL de acetona gelada 80% (v/v) a 100 µL extrato proteico e mantendo-se a mistura em repouso por 2h em geladeira a 10°C.

Após a verificação de precipitado, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm, 4°C por 5 min para separação dos *pellets* proteicos. Após esse processo, os *pellets* proteicos foram submetidos a três lavagens com 200 µL de etanol 80%.

Parte dos *pellets* foram solubilizado com NaOH a 0,50 mol L⁻¹ para a quantificação de proteína total utilizando o método de Biureto (ITZHAKI; GILL, 1964), e outra parte foi armazenada em freezer à -80°C para os experimentos metaloproteômicos.

2.4.2. Eletroforese em gel bidimensional e tratamento de imagem

Para a focalização isoeletrica (IEF), primeira etapa da 2D PAGE, que consiste na separação por ponto isoeletrico (pI), alíquotas dos extratos proteicos foram diluídas em solução contendo ureia a 7 mol L⁻¹, tiourea a 2 mol L⁻¹, CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% e 2,8 mg de DTT, de forma que a concentração de proteína total ficasse igual a 1,50 µg µL⁻¹ (MORAES et al., 2012). Posteriormente, alíquotas 250 µL de extrato proteico contendo 1,50 µg µL⁻¹ de proteína total foram aplicadas em quatro fitas IEF de 13 cm, (gradiente de pH 3-10). As fitas IEF foram cobertas com óleo mineral, tranferidas para caixa de hidratação e incubadas por 12 horas em IPGBox a 20 °C. Após serem devidamente hidratadas, as fitas foram transferidas para o sistema de focalização isoeletrica (MORAES et al, 2012, Baldassini et al., 2018). O tempo de corrida foi de 4,5 horas.

Para a segunda dimensão, as tiras foram colocadas em gel de poliacrilamida (12,5%, p / v), ao lado de cada fita foi colocado um papel filtro com 8 µL de padrão de proteínas com massa molecular conhecida (β-fosforilase 97,0 kDa, albumina 66,0 kDa, ovoalbumina 45,0 kDa, anidrase carbônica 30,0 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa e α-lactoalbumina 14,4 kDa). O sistema foi selado com agarose 0,5 % (m/v) para garantir o contato do gel com a fita na corrida eletroforética (LIMA et. al., 2010; MORAES et al, 2012, BALDASSINI et al., 2018). O tempo de corrida foi de 2,50 horas.

Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas com coloração D e coradas com Coomassie coloidal (LIMA et. al., 2010; MORAES et al, 2012). Os géis foram escaneados com ImageScanner III (GE Healthcare) e os *spots* foram detectadas e avaliados quanto a expressão utilizando o software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare) (BRAGA et al., 2017).

2.4.3. Determinação de minerais nas amostras de spots proteicos do tecido hepático

As determinações de cálcio e magnésio (macrominerais) e de cobre, ferro, manganês e zinco (microminerais) foram feitas utilizando espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), após mineralização ácida das amostras, conforme descrito por Moraes et al., 2013, Braga et al., 2015, Vieira et al., 2017, Bittarello et al., 2019.

1 Após o tratamento de imagens, foram selecionados os *spots* (utilizando quadruplicata dos
2 géis de tecido muscular e carne para essa análise), recortados com auxílio da ponta de uma
3 ponteira e digeridos com para a eliminação da fração orgânica.

4 Os *spots* foram transferidos para balões de digestão de 5mL. Para cada balão de digestão
5 foram transferidas alíquotas de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, os frascos foram então
6 colocados em um bloco digestor e aquecidos a aproximadamente 250 ° C e adicionado 250 µL
7 de peróxido de hidrogênio a até que os extratos claros fossem observados. Após essa etapa, as
8 amostras foram avolumadas para 5 mL com água ultrapura. Na sequencia foram feitas as
9 determinações de minerais cálcio e magnésio (macrominerais) e de cobre, ferro, manganês e
10 zinco (microminerais).

11 2.4.4. Caracterização dos *spots* proteicos por LC-MS/MS

12 Os *spots* proteicos diferencialmente expressos (entre tratamentos) foram extraídos dos
13 géis com auxílio de bisturi, recortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos
14 para microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v) e submetidos às seguintes etapas:
15 remoção do corante, redução e alquilação das proteínas e digestão triptica utilizando solução de
16 tripsina 10 ng mL⁻¹ (BRAGA et al., 2015). As sequências peptídicas foram caracterizadas por
17 espectrometria de massas em sequência acoplada à cromatografia líquida (LC- MS/MS). A
18 identificação das proteínas foi feita por meio de pesquisa na base de dados UniProt
19 (www.uniprot.org) para o genoma *Bos taurus*. Após a identificação das proteínas, uma análise
20 das interações funcionais previstas e conhecidas entre as proteínas identificadas e outras
21 proteínas *B. taurus* foi realizada usando o software STRING 11.0. Nessas análises três níveis
22 foram investigados: função molecular, componente celular e função biológica.

23 2.4.5. Tratamento e análise de imagens

24 Os géis dos grupos experimentais (0% vs 18%, 36% e 54%), foram escaneados e as
25 imagens analisadas usando o ImageMaster 2D Platinum 7.0 (BRAGA et al., 2017;
26 BALDASSINI et al., 2018) com algumas adaptações. Em resumo, os pontos equivalentes
27 (correspondência) foram identificados, e a edição automática e manual foi realizada para
28 remover os pontos falsos. Sempre utilizando dois géis por amostra, obtidos de um mesmo
29 processo eletroforético. Os parâmetros utilizados para a detecção dos *spots* foram: *smooth* (fixa
30 o número de vezes que o programa homogeneiza a região selecionada antes de seguir a
31 detecção) – 3; *saliency* (medida que se baseia na curvatura do *spot*, filtra *spots* reais) – 25; e
32 *min area* (elimina regiões menores que as indicadas) – 5. A correlação obtida entre os géis foi

1 feita pela equivalência entre os *spots* dos dois géis (matching), onde os *spots* foram comparados
2 quanto à sua distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico (pI) e massa molar
3 (Mm). A análise comparativa de todos os pontos com base no volume normalizado (% V)
4 permitiu a detecção de pontos diferencialmente expressos entre os grupos experimentais (0%
5 vs 18%, 36% e 54%).

6 Na análise de expressão dos *spots*, calculou-se a média e o desvio padrão correspondentes
7 ao parâmetro vol% (volume normalizado) de cada *spot* e estabeleceu-se um valor de 95% para
8 que a mudança na expressão fosse considerada relevante.

9 **2.5. Análises estatísticas**

10 Os resultados (características de carcaça e carne) foram analisados usando o software SAS
11 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, Estados Unidos, 2011). O teste de normalidade dos dados foi
12 realizado pelo teste de Shapiro-Wilk pelo procedimento PROC UNIVARIATE. Os dados que
13 não mostraram uma distribuição normal foram transformados usando PROC RANK. Em
14 seguida, os dados foram analisados por contrastes ortogonais (controle vs DCGF, linear e
15 quadrático) utilizando o procedimento PROC MIXED, onde a caneta foi a unidade
16 experimental, a inclusão de DCGF foi o efeito fixo e o bloco, efeito aleatório, seguindo o
17 modelo:

$$18 \quad Y_{ij} = \mu + B_i + P_j + e_{ij}$$

19 Onde: μ = média geral, B_i = efeito de bloco aleatório, P_j = efeito dos níveis de DCGF (0,
20 18, 36 e 54% de base de MS) e e_{ij} = erro experimental.

21 Efeito significativo foi considerado quando $P \leq 0,05$, e tendências quando $0,05 < P < 0,10$.

22 **3. RESULTADOS**

23 Os resultados de avaliação hepática estão relacionados com o perfil metaloproteico do
24 tecido, e a figura 2 representa os *spots* que obtiveram proteínas com diferença de expressão no
25 tecido hepático, mostrando a localização no gel de cada um desses *spots*, descritos na tabela 3;
26 e quanto a presença de minerais nas tabelas 2 e 4. Todos os *spots* com expressão significativa
27 ($P < 0,05$) foram avaliados e caracterizados quanto à presença de proteínas.

28 Dentre os minerais, foram determinados as concentrações de: Ca (Cálcio) e Mg
29 (Magnésio) – macrominerais – e Zn (Zinco), Cu (Cobre), Fe (Ferro) e Mn (Manganês) -
30 microminerais. Os resultados mostraram que o zinco e o ferro foram identificados com maior
31 frequência nos *spots* proteicos do tecido hepático, para todos os tratamentos, e o manganês

apareceu apenas no tratamento de 18% de inclusão de DCGF, ainda assim em baixa incidência nos *spots*. (Figura 3).

As Tabelas 2 e 4 apresentam os resultados relacionados com os tratamentos quanto a presença de minerais nos *spots* proteicos. As análises dos minerais foram feitas nos *spots* com diferença de expressão nos diferentes tratamentos.

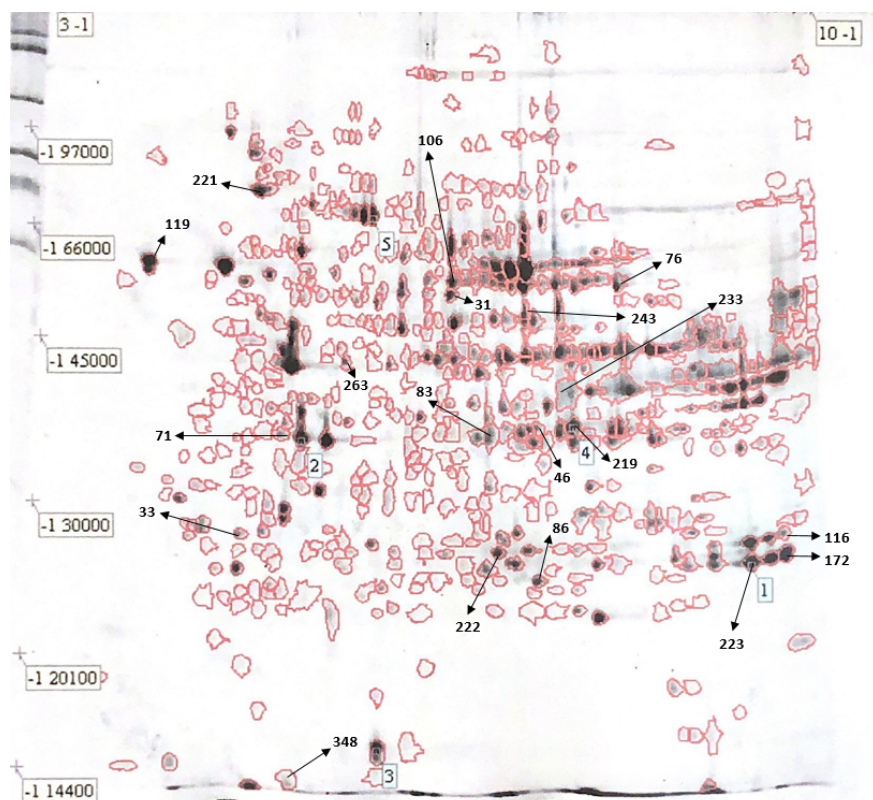


Figura 2: Gel de poliacrilamida com spots proteicos de tecido hepático de bovinos identificados por LC-MS/MS.

A tabela 3 apresenta as proteínas com diferença de expressões no tecido hepático de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho Seco. As proteínas foram identificadas por LC-MS/MS. Nos dados que apresentam expressões positiva (+), os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de DCGF. Com destaque para o grupos funcionais de ligação com o ferro e de atividade catalítica, além dos processos biológicos: processos catabólicos, destoxicação celular, metabolismo de carboidratos, processo metabólico ligado ao enxofre, e processo metabólico de modificação celular de aminoácidos.

Os *spots* diferencialmente expressos foram caracterizados por LC-MS/MS. Após a identificação, foi padronizada considerando o maior *score* proteico, pI e massa molecular (MM) mais próximos dos resultados teóricos e experimentais.

A Tabela 5 apresenta dados de desempenho dos animais, considerando a ingestão de matéria seca e o ganho médio de peso diário, direcionando as respostas produtivas dos animais aos diferentes níveis de inclusão de DCGF. Com relação à ingestão, os animais alimentados com DCGF em diferentes níveis de inclusão (18, 36, e 54%) apresentaram maior IMS quando comparados ao grupo controle ($P = 0,018$). A inclusão do subproduto causou efeito quadrático na IMS ($P = 0,021$), sendo que os animais que receberam dieta contendo 18% de DCGF consumiram 13,3% a mais do que o grupo controle.

O GMD aumentou linearmente ($P = 0,043$), porém, o grupo que recebeu dieta contendo 36% de DCGF apresentou maior GMD durante o período experimental. Em média, a inclusão do subproduto aumentou o GMD em 10,5%, quando comparada à dieta controle. Os animais que receberam o DCGF na dieta apresentaram maior PCF ($P = 0,012$), independente do nível de inclusão.

Avaliação da interação proteína-proteína, das proteínas identificadas nos *spots* proteicos diferencialmente expressos do tecido hepático foi feita utilizando o software STRING 11.0, para as espécies *Bos Taurus* (Figura 4). Os dados mostram interações entre proteínas identificadas em diferentes grupos metabólicos. As linhas representam associações proteína-proteína e essas ligações podem ser específicas e significativas, ou seja, as proteínas contribuem conjuntamente para uma função compartilhada; isso não significa necessariamente que elas estejam fisicamente vinculadas uma a outra.

4. DISCUSSÃO

Não foram encontrados estudos que avaliaram as associações de minerais com proteínas do metabolismo hepático em bovinos através da metaloproteômica.

Apesar da diferença de expressão nas proteínas encontradas, envolvidas em diferentes processos metabólicos, não há evidências de prejuízos à saúde dos animais para nenhum dos tratamentos avaliados. Os dados de ingestão de matéria seca e ganho médio diário foram favoráveis à inclusão de DCGF na dieta de bovinos confinados, especialmente no nível de 36%. Ao contrário de Pereira et al. (2007), que comparou a inclusão de 36% de farelo de glúten de milho em substituição ao milho moído, e encontrou queda na ingestão e também no ganho

médio diário, porém, relatou maior consumo de FDN (Fibra em Detergente Neutro) no tratamento com 36% de inclusão de farelo de glúten de milho. No presente estudo, apesar das dietas que contém DCGF apresentarem maiores teores de FDN, não houve efeito prejudicial sobre a ingestão. Os animais que participaram do experimento não apresentaram incidência de abscessos hepáticos, sinalizando boa metabolização.

O fígado é um órgão conhecido por ser rico em minerais, participando ativamente de seu metabolismo. Dentre os minerais analisados, o ferro e o zinco se mostraram mais expressivos nas amostras (Figura 3). Crichton (2008), segundo a tabela 1, mostra as diferentes ligações de íons metálicos com proteínas. Sendo o zinco um mineral de força de ligação moderada/forte e o ferro um mineral de ligação forte, estes são fortemente coordenados nos sítios protéicos, sendo portanto encontrados em maiores quantidades ligados à essas estruturas.

Tabela 1: Força de ligação, mobilidade, e função de íons metálicos em moléculas orgânicas.

Íon metálico	Ligação	Mobilidade	Função
Na ⁺ , K ⁺	Fraca	Alta	Contra-íons
Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Moderada	Semi-móvel	Estrutural
Zn ²⁺	Moderada/forte	Intermediária	Ácido de Lewis, estrutural
Fe, Cu, Mn e Mo*	Forte	Baixa	Transporte de oxigênio e reações redox

* carga não mencionada, já que varia com o estado de oxidação (fonte: Crichton, 2008).

O zinco é componente de metaloenzimas com efeitos nos metabolismos dos carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (NRC, 2007). De acordo com McDowell (1992), os principais efeitos do zinco estão ligados à produção e secreção de hormônios, especialmente relacionados com a testosterona, insulina e corticóides da adrenal. Uma das formas de armazenamento do zinco é associado às metalotioneínas que são expressas no fígado. A síntese das metalotioneínas é induzida no fígado quando ocorre excesso de absorção de zinco (MCDOWELL, 1992).

Com relação ao ferro, Moraes (1998), complementando estudos realizados por Tokarnia et al. (1968, 1971), encontraram valores elevados deste mineral em amostras de fígado de bovinos e ovinos, parte destes relacionada com a deficiência de cobre.

Segundo Moraes (2001), o manganês é necessário para a manutenção da estrutura óssea normal e o funcionamento adequado do sistema nervoso central. O manganês (Mn) se encontra em maiores concentrações nos ossos, rins, fígado, pâncreas e glândula pituitária, todos os tecidos ricos em mitocôndrias. Segundo Scottá et al. (2014) o Mn é componente de enzimas

(quinases, hidrolases, transferases e descarboxilases) envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, atuando como um co-fator na produção da enzima antioxidante superóxido dismutase. Apesar disso, o manganês não mostrou frequência expressiva em amostras de tecido hepático do estudo atual.

As proteínas diferencialmente expressas, demonstradas na tabela 3 pertencem a diferentes grupos funcionais, com destaque para os de ligação com o ferro (RAN, SUCLG2, ENO1, ENO3, UGP2, QDPR) e os de atividade catalítica (HRSP12, GLYAT, PSMA7, ASS1, RAN, PSMB6, GATM, GSTA1, CAT, CBR1, RGN, ECHS1, SUCLG2, ACADS, HSD17B10, ENO1, TST, AKR1A1, ENO3, UGP2, UGDH, QDPR).

As funções das proteínas listadas tem base no Banco de Dados Uniprot.

A RAN (Proteína nuclear de ligação GTP) está envolvida no transporte nucleocitoplasmático, importando e exportando proteínas e RNAs. Ela controla o carregamento e a liberação da carga pelos receptores de transporte a garante sua direção. Foi encontrada em todos os tratamentos do experimento ligada ao ferro. Já a SUCLG2 (Succinil – CoA sintase) participa do Ciclo do Ácido Cítrico, acoplando a hidrólise do succinil – CoA à síntese de GTP, representando a etapa de fosforilação em nível de substrato. Foi encontrada ligada ao ferro em todos os tratamentos, exceto no de 54% de inclusão do DCGF (Tabela 2).

As enolases (ENO1 e ENO3) apresentaram ligação com o ferro em todos os tratamentos em que há inclusão de DCGF. ENO 1 é reportada como uma enzima glicolítica que catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. Além da glicólise, está envolvida em processos do controle do crescimento, tolerância a hipóxia, e respostas alérgicas. Quanto às suas expressões, não houve diferença entre os tratamentos de maior concentração de DCGF, exceto para o de 18%, no qual a expressão de mostrou negativa (-), sinalizando que possivelmente não houve resposta alérgica à inclusão do subproduto.

A UGP2 (Uridiltransferase) é uma precursora crucial para a produção de glicogênio, catalisando a conversão da glicose-1-fosfato em UDP-glicose. No presente estudo, apresentou ligação com o ferro em todos os tratamentos, exceto no de 18% de inclusão de DCGF. Sabe-se que as proteínas do grupo de ligação ao ferro são especialmente dependentes deste mineral para exercerem suas funções. Uma vez que o ferro não foi encontrado nos *spots* que contém a UGP2, pode-se prever uma menor atividade na produção de glicogênio.

Finalizando o grupo funcional de ligação com o ferro, a QDPR (Dihidropteridina redutase) foi verificada em todos os tratamentos, exceto no de 36% de inclusão de DCGF. Ela se caracteriza como uma enzima responsável pela produção de tetrahidrobiopterina (BH-4), um importante cofator para as hidroxilases: fenilalanina, tirosina, e triptofano.

1 Em se tratando das proteínas do grupo funcional de atividade catalítica, são enzimas que
2 executam a catálise de reações químicas a temperaturas fisiológicas. Nestas reações, os
3 reagentes são conhecidos como substratos, e os catalisadores são substâncias macromoleculares
4 que possuem sítios de ligação específicos (AmiGO 2).

5 A RIDA/HRSP12 (2-iminobutanoato/2-iminopropanoato deaminase) catalisa a
6 desaminação hidrolítica de intermediários que se formam durante o curso do metabolismo
7 normal. Ela pode facilitar a liberação de amônia desses metabólitos reativos potencialmente
8 tóxicos, reduzindo seu impacto nos componentes celulares. Nos resultados de expressão, se
9 expressou positivamente no tratamento de 54% de inclusão de DCGF. GLYAT (Glicina N-
10 aciltransferase) é uma enzima mitocondrial capaz de conjugar uma infinidade de substratos para
11 formar uma N-acilglicinas, desintoxicando assim xenobióticos, como ácido benzóico ou ácido
12 salicílico, e ácidos orgânicos endógenos. Esta se mostrou positivamente expressa para o
13 tratamento de 36% de inclusão de DCGF.

14 PSMA7 (Proteassoma tipo-7 subunidade alfa) e PSMB6 (Proteassoma tipo-6 subunidade
15 beta) se caracterizam como componentes de um complexo de proteassomas envolvidos na
16 degradação proteolítica da maioria das proteínas intracelulares. Este complexo desempenha
17 vários papéis essenciais dentro da célula, associando-se a diferentes partículas reguladoras. O
18 proteassoma 26S, por exemplo, desempenha um papel fundamental na manutenção da
19 homeostase das proteínas, removendo proteínas mal dobradas ou danificadas que podem
20 prejudicar as funções celulares. A PSMA7 teve expressão (-) nos tratamento de 18% e 54% de
21 inclusão, possivelmente representando menor necessidade de atuação no reparo de proteínas
22 nesses tratamentos, válido também para a PSMB6 com expressão (-) em todos os níveis de
23 inclusão de DCGF comparados ao tratamento controle.

24 A RGN (Regucalcina): catalisa um passo chave na biossíntese do ácido ascórbico. É uma
25 proteína de ligação de cálcio, modulando a sinalização de Ca^{2+} em processos celulares
26 dependentes e atividades enzimáticas. No presente estudo, não foram encontrados minerais
27 ligados a RGN.

28 Outra enzima de atividade catalítica é a HSD17B10 (3-hidroxiacil-CoA desidrogenase
29 tipo-2), uma desidrogenase mitocondrial envolvida em vias de ácidos graxos, aminoácidos de
30 cadeia ramificada e metabolismo de esteróides. Atua na beta-oxidação de ácidos graxos
31 mitocondriais, uma importante via de degradação de ácidos graxos. Pode degradar espécies
32 durante a resposta ao estresse oxidativo para proteger as células da apoptose.

33 Outro grupo de proteínas está ligado aos processos catabólicos que ocorrem no tecido
34 hepático. Essas reações químicas resultam na quebra de substâncias, incluindo a quebra de

1 compostos de carbono, com a liberação de energia para uso pela célula ou organismo. A
2 ACADS (Acil-CoA desidrogenase específica de cadeia curta, mitocondrial) faz parte desse
3 grupo e catalisa a primeira etapa da beta-oxidação de ácidos graxos mitocondriais, um processo
4 aeróbico que quebra os ácidos graxos em acetil-CoA e permite a produção de energia a partir
5 de gorduras. A expressão desta proteína se mostrou reduzida no tratamento com 36% de
6 inclusão de DCGF, podendo sinalizar que houve menores taxas de quebra de gordura como
7 fonte energética para esses animais, justificando o melhor desempenho observado nesse
8 tratamento.

9 A CAT (Catalase) é uma importante enzima, que ocorre em quase todos os organismos
10 que respiram aerobicamente e protege as células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio.
11 É também responsável por promover o crescimento celular. A catalase apresentou expressão
12 positiva no tratamento de 18% de inclusão de DCGF, que também obteve bons resultados de
13 desempenho.

14 O processo biológico de destoxicação celular envolve importantes reações que protegem
15 as células de agentes tóxicos, incluindo o transporte dessas substância tóxicas para longe de
16 áreas sensíveis, como uma espécie de “sequestro”. A exemplo disso, a AKR1A1 (Aldo-Keto
17 redutase) catalisa a redução dependente de NADPH de uma ampla variedade de compostos
18 contendo carbonila para seus álcoois correspondentes. Apresenta atividade enzimática frente a
19 metabólitos endógenos como aldeídos aromáticos e alifáticos, cetonas, monossacarídeos e
20 ácidos biliares. Funciona então como uma enzima desintoxicante, reduzindo uma gama de
21 aldeídos tóxicos. Reduz metilglioxal e 3-desoxiglucosona, que estão presentes em níveis
22 elevados em condições hiperglicêmicas e são citotóxicos, envolvendo-se também na
23 desintoxicação de aldeídos derivados de lipídios. Esta enzima não apresentou expressão nos
24 tratamentos de maiores níveis de inclusão de DCGF (36% e 54%), sinalizando que não houve
25 toxicidade nessas dietas (Tabela 3).

26 Outro processo biológico de extrema importância na avaliação de diferentes dietas nos
27 processos que envolvem o organismo animal é o metabolismo de carboidratos. A UGDH (UDP-
28 glicose 6-desidrogenase) é necessária para a biossíntese de sulfato de condroitina e sulfato de
29 heparan, atuando diretamente no desenvolvimento adequado do cérebro e das vias neuronais.
30 Apesar das diferentes fontes de energia que envolveram as dietas avaliadas, e da diferença nos
31 níveis de amido, não houve diferença na expressão da UGDH.

32 Os processos metabólicos ligados ao enxofre sinalizaram duas importantes proteínas:
33 GSTA1 e GSTA2. São caracterizadas por reações químicas que envolvem o enxofre,
34 especialmente nas vias de aminoácidos, como por exemplo, a da metionina e da cisteína. A

1 GSTA1 (Glutathione S-transferase A1) pode desempenhar um papel importante na biossíntese
2 hormonal. Por meio da sua atividade de peroxidase dependente de glutathione em direção ao
3 hidróperóxido de ácido graxo, também está envolvida no metabolismo do ácido linoleico. Já a
4 GSTA2 (Glutathione S-transferase A2) participa da conjugação de glutathione reduzida a
5 eletrófilos hidrofóbicos exógenos e endógenos. Ambas apresentaram menores expressões nos
6 tratamentos com a presença de DCGF.

7 Por fim, o processo metabólico de modificação celular de aminoácidos relaciona-se com
8 a atuação da ASS1 e da GATM. ASS1 (Argininosuccinato sintase) é uma das enzimas do ciclo
9 da uréia, a via metabólica que transforma a amônia neurotóxica produzida pelo catabolismo
10 proteico em uréia inócua no fígado de animais ureotélicos. A GATM (Glicina
11 amidinotransferase mitocondrial) catalisa a biossíntese de guanidinoacetato, o precursor
12 imediato da creatina. A creatina desempenha um papel vital no metabolismo energético nos
13 tecidos musculares. Pode desempenhar um papel no desenvolvimento embrionário e do sistema
14 nervoso central. São importantes enzimas do metabolismo hepático, e não apresentaram
15 diferenças de expressão significativas entre tratamentos.

17 5. CONCLUSÃO

18 De modo geral, o Farelo de Glúten de Milho (DCGF) não se mostrou prejudicial à saúde
19 hepática. Foram encontradas proteínas importantes relacionadas à manutenção de
20 processos biológicos, e a resposta hepática aos diferentes tratamentos indica bons
21 resultados para a inclusão do subproduto na dieta. O ferro e o zinco apareceram em
22 maiores frequências nos *spots* proteicos, sendo fundamentais na atuação de determinadas
23 enzimas. Diante disto, a inclusão de 36% de DCGF mostrou-se a melhor recomendação
24 em substituição ao milho moído, pois apresentou melhores resultados de desempenho, sem
25 prejuízo à saúde animal.

Tabela 2: Presença de minerais em *spots* proteicos que apresentaram diferença de expressão no tecido hepático de bovinos alimentados com 0%, 18%, 36% e 54% de Farelo de Glúten de milho (DCGF).

<u>Spot ID</u>	<u>Proteína ID</u>	<u>ABV</u>	<u>Proteína</u>	<u>Farelo de Glúten de Milho (DCGF)</u>			
				<u>0%</u>	<u>18%</u>	<u>36%</u>	<u>54%</u>
31	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	Zn, Cu	Zn, Fe	Zn, Ca, Fe, Cu	Zn, Fe, Mg
	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase				
	Q2HJ74	GATM	Glicina amidinotransferase, mitocondrial				
33	Q148C9	HEBP1	Proteína de ligação ao heme 1	Zn, Fe	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn, Fe	Ca, Mg
	Q3MHN0	PSMB6	Subunidade beta de proteassoma tipo-6				
46	P00586	TST	Tiosulfato sulfurtransferase	Zn, Fe, Cu	Zn, Fe, Mg	Zn, Fe, Mg	Fe, Mg
	Q3SZD7	CBR1	Carbonil redutase [NADPH] 1				
	Q3ZCJ2	AKR1A1	Aldo-ceto redutase família 1 membro A1				
76	Q07130	UGP2	UTP--glicose-1-fosfato uridililtransferase	Ca, Fe, Mg	Mg	Zn, Fe, Mg	Zn, Ca, Fe, Mg
83	P12378	UGDH	UDP-glicose 6-desidrogenase	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn	Zn, Fe, Cu	Ca, Fe, Mg
86	Q3T054	RAN	Proteína nuclear de ligação a GTP Ran	Zn, Fe	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Fe, Mg
106	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	Zn	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn	Zn
	P00432	CAT	Catalase				
116	O18879	GSTA2	Glutathione S-transferase A2	Zn, Fe	Zn, Fe	Zn, Fe, Mg	Fe
	Q3ZBG0	PSMA7	Subunidade alfa de proteassoma tipo-7				
	Q28035	GSTA1	Glutathione S-transferase A1				
119	P00432	CAT	Catalase	Zn, Ca	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Mg	-
172	Q28035	GSTA1	Glutathione S-transferase A1	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca	Zn, Fe	Zn, Fe
	O02691	HSD17B10	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo-2				
219	Q2KIR7	GLYAT	Glicina N-aciltransferase	Zn, Ca, Mg	Zn, Fe	Zn, Mg	Zn, Fe, Mg

221	Q0VCX2	HSPA5	Chaperona do retículo endoplasmático BiP	Zn, Fe	Zn, Mn, Ca, Fe	Zn, Fe	Zn, Fe
	P34933	HSPA2	Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico				
222	Q58DM8	ECHS1	Enoil-CoA hidratase, mitocondrial	Zn, Fe, Cu, Mg	Zn, Mn, Ca, Fe, Cu, Mg	Zn, Ca, Mg	Ca, Fe, Mg
	Q3T0Z7	QDPR	Dihidropteridina redutase				
223	O02691	HSD17B10	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo-2	Zn	Zn, Fe	Zn, Fe	Zn, Ca, Fe, Cu, Mg
	Q28035	GSTA1	Glutathione S-transferase A1				
233	Q3ZBF6	ACADS	Acil-CoA desidrogenase específica de cadeia curta, mitocondrial	Ca, Mg	Zn, Mn, Fe	Zn, Mg	Zn, Ca
	Q2KIR7	GLYAT	Glicina N-aciltransferase				
243	P14568	ASS1	Argininosuccinato sintase	Fe	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn, Fe	Fe
263	Q3MHX5	SUCLG2	Succinato--CoA ligase [formadora de GDP] subunidade beta, mitocondrial				
	Q28035	GSTA1	Glutathione S-transferase A1	Zn, Fe, Mg	Zn, Fe	Zn, Fe, Mg	-
348	Q3T114	RIDA	2-iminobutanoato/2-iminopropanoato deaminase		Zn, Fe	Zn, Ca, Fe, Mg	Zn, Fe, Mg
	Q32PA4	PHPT1	14 kDa fosfo-histidina fosfatase	Zn, Fe, Mg			
	Q58DU7	SH3BGRL	Proteína rica em ácido glutâmico de ligação ao domínio SH3				
371	Q9TTJ5	RGN	Regucalcina	-	-	-	-

Tabela 3: Identificação de proteínas com diferentes expressões no tecido *hepático* de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de Farelo de Glúten de Milho (DCGF). A análise da expressão dos pontos foi realizada usando o Programa ImageMaster Platinum com a identificação de proteínas por *LC-MS/MS*. Positivo (+) os valores mostram uma tendência potencial de expansão e os valores negativos (-) mostram potenciais reduções na expressão. O sinal Ø significa que não houve expressão. Esses valores são avaliados em comparação com o tratamento controle, sem inclusão de Farelo de Glúten de Milho.

<u>Spot ID</u>	<u>Protein a ID</u>	<u>ABV</u>	<u>Proteína</u>	<u>Score</u>	<u>PI/Mw experimental</u>	<u>PI/Mw teorico</u>	<u>Cobertura (%)</u>	<u>Diferença de</u>	<u>Diferença de</u>	<u>Diferença de</u>
----------------	---------------------	------------	-----------------	--------------	---------------------------	----------------------	----------------------	---------------------	---------------------	---------------------

								<u>Expressã o18%</u>	<u>Expressã o 36%</u>	<u>Expressã o 54%</u>
31	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	18244.0 3	6.72873/48.893	6.37/47.326	68.43	-	∅	∅
	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	18244.0 3		7.60/47.096	18.43	-	∅	∅
	Q2HJ74	GATM	Glicina amidinotransferase, mitochondrial	2168.36 5		8.00/48.357	48.46	-	∅	∅
33	Q148C9	HEBP1	Proteína de ligação ao heme 1	820.709 9		5.35/21.230	6.68	-1,35805	-1,31279	-1,24842
	Q3MHN0	PSMB6	Subunidade beta de proteassoma tipo-6	737.839 6		4.90/25.542	16.74	-1,35805	-1,31279	-1,24842
46	P00586	TST	Tiosulfato sulfurtransferase	7890.09 6	7.51418/33.804	6.72/33.296	45.12	-	∅	∅
	Q3SZD 7	CBR1	Carbonil redutase [NADPH] 1	2967.18 9		8.50/30.533	42.96	-	∅	∅
	Q3ZCJ2	AKR1A1	Aldo-ceto redutase família 1 membro A1	1298.16 8		6.80/36.617	24.62	-	∅	∅
76	Q07130	UGP2	UTP--glicose-1-fosfato uridililtransferase	1934.20 4	8.273736/51.12 8	7.69/56.903	38.39	+1,43371	∅	∅
83	P12378	UGDH	UDP-glicose 6- desidrogenase	1290.59 4	7.030826/34.88 7	7.51/55.136	29.15	-	∅	∅
86	Q3T054	RAN	Proteína nuclear de ligação a GTP Ran	1278.78 8	7.479655/23.12 4	7.01/24.423	15.74	+1,2051	∅	-1,29093
106	Q9XSJ4	ENO1	Alfa-enolase	7691.31 3	6.737361/51.45 5	6.37/47.326	44.01	+1,69221	∅	∅
	P00432	CAT	Catalase	2273.09 8		6.79/59.915	25.81	+1,69221	∅	∅
116	O18879	GSTA2	Glutathiona S-transferase A2	4833.59 9	9.732429/25.50 3	8.66/25.717	53.36	-1,39582	∅	-1,40428

	Q3ZBG 0	PSMA7	Subunidade alfa de proteassoma tipo-7	3177.78 4		8.59/27.869	29.03	-1,39582	∅	-1,40428
	Q28035	GSTA1	Glutathiona S-transferase A1	1934.39 7		8.66/25.452	42.34	-1,39582	∅	-1,40428
119	P00432	CAT	Catalase	797.737 5	3.851117/55.17 5	6.79/59.915	14.5	-1,36256	+1,32511	∅
172	Q28035	GSTA1	Glutathiona S-transferase A1	8543.15 7	9.704715/24.69 7	8.66/25.452	54.05	∅	-4,05186	∅
	O02691	HSD17B10	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo-2	4202.29 2		8.45/27.140	62.84	∅	-4,05186	∅
219	Q2KIR7	GLYAT	Glicina N- aciltransferase	5503.48 3	7.794045/34.62 0	7.11/33.907	56.61	∅	1,26768	∅
221	Q0VCX 2	HSPA5	Chaperona do retículo endoplasmático BiP	21455.8 1	5.014888/74.93 7	5.07/72.400	53.89	∅	1,58767	∅
	P34933	HSPA2	Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico	5271.04 6		5.43/69.740	5.35	∅	1,58767	∅
222	Q58DM 8	ECHS1	Enoil-CoA hidratase, mitocondrial	13229	7.073201/25.32 7	8.82/31.243	44.14	∅	-1,31092	-1,46416
	Q3T0Z7	QDPR	Dihidropteridina redutase	1825.01 3		6.90/25.504	51.24	∅	-1,31092	-1,46416
223	O02691	HSD17B 10	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase tipo-2	4766.38 3	9.418114/24.30 4	8.45/27.140	55.17	∅	1,45835	∅
	Q28035	GSTA1	Glutathiona S-transferase A1	4149.87 3		8.66/25.717	42.34	∅	1,45835	∅
233	Q3ZBF6	ACADS	Acil-CoA desidrogenase específica de cadeia curta, mitocondrial	1270.19	7.794045/37.97 7	8.82/44.552	30.34	∅	-2,0644	∅
	Q2KIR7	GLYAT	Glicina N- aciltransferase	257.183 7		7.11/33.907	6.37	∅	-2,0644	∅
243	P14568	ASS1	Argininosuccinato sintase	1520.46 6	7.38471/44.899	7.15/46.417	27.91	∅	-	∅

263	Q3MHX 5	SUCLG2	Succinato--CoA ligase [formadora de GDP] subunidade beta, mitocondrial	4861.12 8	5.736128/40.47 9	7.51/46.691	46.53	∅	1,30793	∅
	P02769	ALB	Albumina	531.883 9		5.82/69.293	18.29	∅	1,30793	∅
348	Q3T114	RIDA	2- iminobutanoato /2- iminopropanoato desaminase	16623.2 1	4.709001/13.25 7	6.19/14.272	88.32	∅	∅	4,32865
	Q32PA4	PHPT1	14 kDa fosfo-histidina fosfatase	557.576 2		5.49/13.931	20.8	∅	∅	4,32865
	Q58DU 7	SH3BGR L	Proteína rica em ácido glutâmico de ligação ao domínio SH3	399.359 6		5.22/12.776	46.49	∅	∅	4,32865
371	Q9TTJ5	RGN	Regucalcina	2477.36 8	5.15783/33.126	5.54/33.308	50.17	∅	∅	-1,2648

Tabela 4: Concentração de zinco, manganês, cálcio, ferro, cobre e magnésio (ng mL⁻¹) de acordo com cada spots protéicos das amostras de fígado dos grupos (T1, T2, T3 e T4), nos quais foram analisados quanto a presença desses elementos. Os mesmos são representados na figura 2, e na tabela 2 quanto as proteínas identificadas.

<i>Spot</i> ID	Zinco (Zn) (ng mL ⁻¹)	Manganês (Mn) (ng mL ⁻¹)	Cálcio (Ca) (ng mL ⁻¹)	Ferro (Fe) (ng mL ⁻¹)	Cobre (Cu) (ng mL ⁻¹)	Magnésio (Mg) (ng mL ⁻¹)
31 T1 F	0.401	-	-	-	0.567	-
31 T2 F	0.926	-	-	0.818	-	-
31 T3 F	1.050	-	0.025	1.439	0.269	-
31 T4 F	1.280	-	-	1.462	-	0.002
33 T1 F	1.179	-	-	1.098	-	-
33 T2 F	1.143	-	0.104	0.005	-	0.005
33 T3 F	1.153	-	-	1.205	-	-
33 T4 F	-	-	0.042	-	-	0.004
46 T1 F	1.222	-	-	1.714	1.875	-
46 T2 F	1.217	-	-	1.420	-	0.006
46 T3 F	0.541	-	-	2.336	-	0.009
46 T4 F	-	-	-	5.624	-	0.002
71 T1 F	-	-	0.139	1.528	-	0.001
71 T2 F	-	-	-	-	-	0.001
71 T3 F	0.175	-	-	1.808	-	0.008
71 T4 F	0.825	-	0.139	0.383	-	0.003
76 T1 F	-	-	-	2.812	-	-
76 T2 F	-	-	-	0.715	0.139	-
76 T3 F	1.207	-	-	3.223	-	0.003
76 T4 F	0.402	-	-	-	-	0.007
83 T1 F	0.589	-	0.192	2.466	-	0.003
83 T2 F	1.122	-	-	-	-	-
83 T3 F	1.165	-	-	1.051	0.322	-
83 T4 F	-	-	0.016	1.145	-	0.004
86 T1 F	0.577	-	-	1.691	-	-
86 T2 F	1.023	-	0.033	0.098	-	0.003
86 T3 F	1.092	-	0.438	0.972	3.120	0.003
86 T4 F	1.173	-	-	0.603	-	0.008
106 T1 F	1.216	-	-	-	-	-
106 T2 F	0.819	-	0.174	0.037	-	0.001
106 T3 F	0.037	-	-	-	-	-
106 T4 F	1.177	-	-	-	-	-
116 T1 F	1.2241	-	-	1.897	-	-
116 T2 F	1.1743	-	-	0.061	-	-
116 T3 F	0.3495	-	-	0.355	-	0.004
116 T4 F	-	-	-	3.382	-	-
119 T1 F	0.0203	-	0.051	-	-	-
119 T2 F	1.1668	-	0.068	0.019	0.183	0.003
119 T3 F	1.2377	-	-	-	-	0.002
172 T1 F	1.1831	-	0.386	0.808	1.692	0.016
172 T2 F	1.0919	-	0.051	-	-	-
172 T3 F	0.2185	-	-	1.462	-	-
172 T4 F	1.051	-	-	2.387	-	-
219 T1 F	1.158	-	0.209	-	-	0.003
219 T2 F	1.223	-	-	1.752	-	-
219 T3 F	0.561	-	-	-	-	0.005
219 T4 F	1.206	-	-	1.051	-	0.008
221 T1 F	1.175	-	-	0.131	-	-

221 T2 F	0.090	1.879	0.139	1.784	-	-
221 T3 F	0.234	-	-	1.630	-	-
221 T4 F	0.213	-	-	1.565	-	-
222 T1 F	1.151	-	-	0.453	1.553	0.018
222 T2 F	1.174	5.920	0.051	1.327	3.740	0.008
222 T3 F	1.186	-	0.033	-	-	0.007
222 T4 F	-	-	0.068	2.378	-	0.008
223 T1 F	1.063	-	-	-	-	-
223 T2 F	0.220	-	-	1.453	-	-
223 T3 F	0.955	-	-	0.621	-	-
223 T4 F	0.186	-	0.165	0.215	0.188	0.004
233 T1 F	-	-	0.121	-	-	0.006
233 T2 F	0.905	0.568	-	2.322	-	-
233 T3 F	0.710	-	-	-	-	0.005
233 T4 F	0.051	-	0.227	-	-	-
243 T1 F	-	-	-	2.499	-	-
243 T2 F	0.733	-	0.165	0.799	-	0.008
243 T3 F	1.029	-	-	0.537	-	-
243 T4 F	-	-	-	2.658	-	-
263 T1 F	1.127	-	-	0.276	-	0.003
263 T2 F	0.204	-	-	1.303	-	-
263 T3 F	0.654	-	-	4.321	-	0.001
348 T1 F	1.117	-	-	0.350	-	0.007
348 T2 F	1.127	-	-	0.663	-	-
348 T3 F	0.670	-	0.104	4.190	-	0.009
348 T4 F	0.577	-	-	1.878	-	0.003

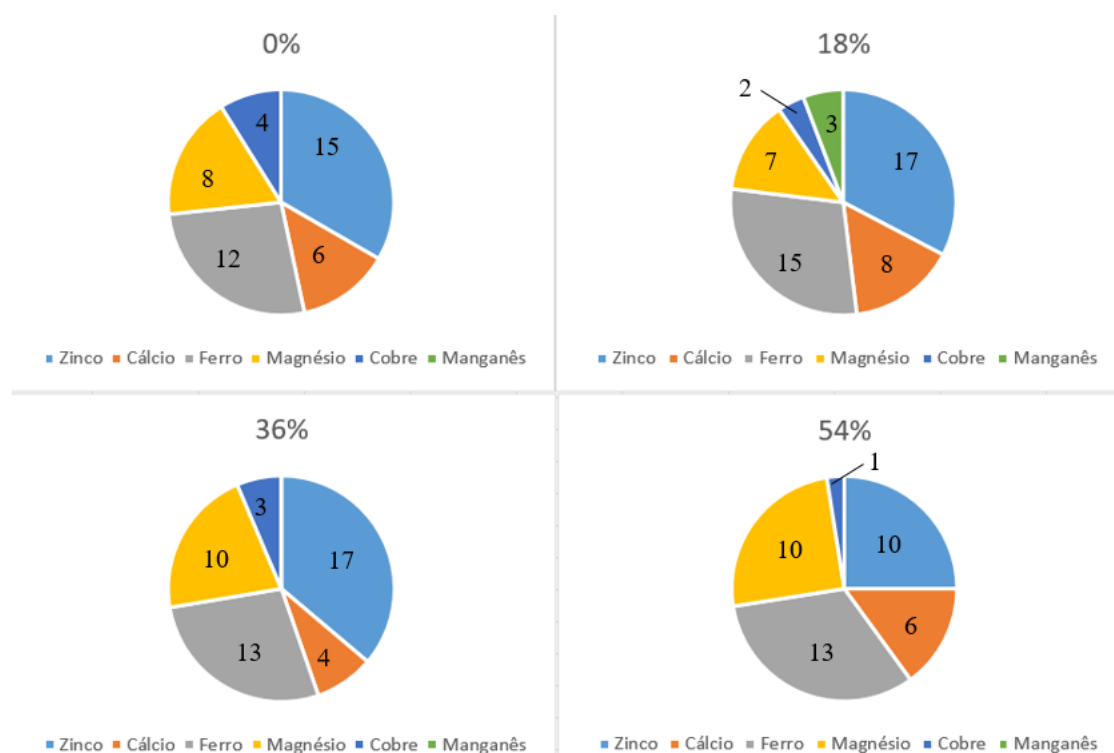


Figura 3: Incidência de *spots* no tecido hepático com cada mineral avaliado nos diferentes níveis de inclusão de DCGF.

Tabela 5: Ingestão de MS e performace de bovinos Nelore alimentados com diferentes níveis de DCFG.

Item ²	Níveis de DCGF, %MS				EPM ¹	P-valor ³		
	0	18	36	54		C vs DCGF	Linear	Quadrático
IMS, kg	9.57	10.85	10.42	10.12	0.345	0.018	0.331	0.021
GPD, kg	1.51	1.66	1.7	1.65	0.047	0.01	0.043	0.06

¹Erro padrão da média

²IMS = Ingestão de Materia Seca, GPD = Ganho de Peso Diário

³C vs DCGF = controle vs Farelo de Glúten de milho, L = linear, Q = quadrático

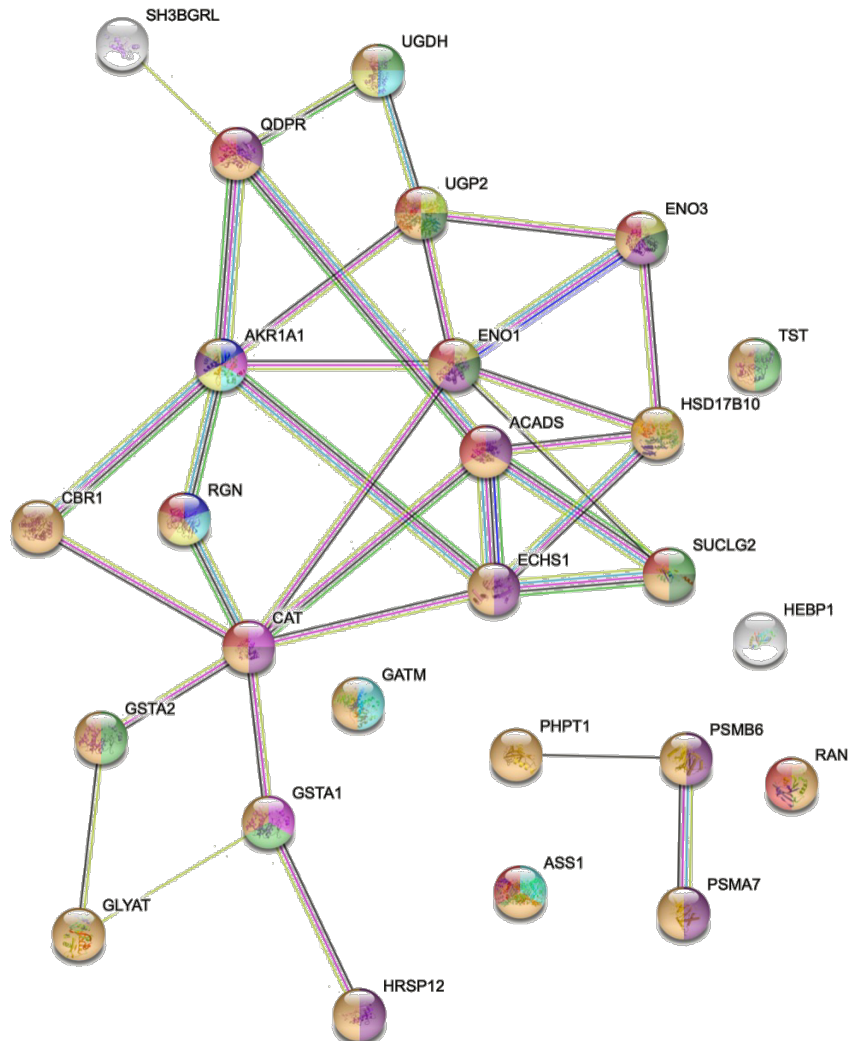


Figura 4: Análise da interação proteína-proteína realizada pela String 11.0 de proteínas diferencialmente expressas no tecido hepático de Bovinos Nelore.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

- Baldassini, W. A., Bonilha, S. F. M., Branco, R. H., Vieira, J. C. S., Padilha, P. M., & Lanna, D. P. D. (2018). Proteomic investigation of liver from beef cattle (*Bos indicus*) divergently ranked on residual feed intake. *Molecular biology reports*, 45(6), 2765-2773.
- Beauchemin, K.A., Koenig, K.M., **Feedlot cattle diets based on barley or corn supplemented with dry corn gluten feed evaluated using the NRC and CNCPS beef models** *Can. J. Anim. Sci.*, 85 (2005), pp. 365-375.
- Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., de Paula Araújo, W. L., da Cunha Bataglioli, I., da Silva, J. M., da Silva, Buzalaf, M.A.R., Fleuri, L.F., Padilha, P.M., **Characterization of molecular biomarkers of mercury exposure to muscle tissue of *Plagioscion squamosissimus* and *Colossoma macropomum* from the Amazon region.** *Food Chem.*, 276 (2019), pp. 247-254.
- Braga, C. P., Bittarello, A. C., Padilha, C. C. F., Leite, A. L., Moraes, P. M., Buzalaf, M. A. R., R., Zara, L.F., Padilha, P. M. **Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies** *Talanta*, 132 (2015), pp. 239-244.
- Braga, C. P., Vieira, J. C. S., Grove, R. A., Boone, C. H., de Lima Leite, A., Buzalaf, M. A. R., ... & de Magalhaes Padilha, P. (2017). A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *International journal of biological macromolecules*, 96, 817-832.
- CRICHTON, R. R.; *Biological Inorganic Chemistry – An Introduction*. Oxford, Elsevier, 2008. P. 369.
- Firkins, J.L., Berger, L.L., Fahey, G.C., 1985. Evaluation of wet and dry distillers grains and wet and dry corn gluten feeds for ruminants. *J. Anim. Sci.* 60, 847–860.
- GUYTON Arthur C., **Tratado de Fisiologia Médica**, M, 9 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, c. 70, p. 672, 1997.
- HULS, T. J., M. K. LUEBBE, G. E. ERICKSON, T. J. KLOPFENSTEIN. 2008. Effect of inclusion level of modified wet distillers grains plus solubles on feedlot performance and carcass characteristics. *Journal of Animal Science*. 86(Suppl. 2):118.
- Itzhaki, R. F., & Gill, D. M. (1964). **A micro-biuret method for estimating proteins.** *Analytical biochemistry*, 9(4), 401-410.
- KLOPFENSTEIN, T. J., G. E. ERICKSON, V. R. BREMER. 2008. BOARD-INVITED REVIEW: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. *Journal of*

animal science, 86(5):1223-1231.

- LARSON, E. M., R. A. STOCK, T. J. KLOPFENSTEIN, M. H. SINDT, R.P. HUFFMAN. 1993. Feeding value of wet distillers byproducts for finishing ruminants. *Journal of Animal Science*, 71(8):2228-2236.
- Lima, P. M., de CF Neves, R., Dos Santos, F. A., Pérez, C. A., Da Silva, M. O., Arruda, M. A., ... & Padilha, P. M. (2010). Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: preliminary results. *Talanta*, 82(3), 1052-1056.
- LIU, K. Effects of particle size distribution, compositional and color properties of ground corn on quality of distillers dried grains with solubles (DDGS). *Bioresource technology*, 100(19):4433-4440, 2009.
- McDOWELL, L.R. Minerals in animal and human nutrition. San Diego: Academic Press, p.524, 1992.
- Moraes S.S. 1998. Avaliação das concentrações de ferro, manganês e ferro no fígado de bovinos e ovinos de várias regiões do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18(3/4):107-110.
- Moraes, P, Santos, F. A., Padilha, C. C. F., Vieira, J. C. S., Zara, L. F., Padilha, PM (2012). A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research*, v. 150, p. 195-199.
- Moraes, P. M., Santos, F. A., Cavecci, B., Padilha, C. C., Vieira, J. C., Roldan, P. S., & Padilha, P. D. M. **GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon Brazil**. *Food Chem.*, 141 (2013), pp. 2614-2617.
- MORAES, S. S. Embrapa gado de corte: Principais deficiências minerais em bovinos de corte. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande MS, 2001.
- NRC – National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11654>.
- Pereira, E. M., Santos, F. A. P., Bittar, C. M. M., Ramalho, T. R., Costa, D. F. A., & Martinez, J. C. (2007). Substituição do milho por farelo de trigo ou farelo de glúten de milho na ração de bovinos de corte em terminação. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 29(1), 49-55.
- PINTO, A. C. J., & D. D. MILLEN. 2016. Situação atual da engorda de bovinos em confinamento e modelos nutricionais em uso. In: Sebastião de Campos Valadares Filho et al.. (Org.). *Simpósio de Produção de Gado de Corte (X Simcorte)*. 1ed. Viçosa/MG: UFV, 1:103-120.

- RESTLE, J., R. L. MISSIO, P. L. P. RESENDE, N. L. Q. SILVA, F. N. VAZ, I. L. BRONDANI, F. KUSS. 2012. Silagem de híbridos de sorgo associado a percentagens de concentrado no desempenho de novilhos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(5):1239-1245.
- SCHOONMAKER, J. P., A. H. TRENKLE, D. C. BEITZ. 2010. Effect of feeding wet distillers grains on performance, marbling deposition, and fatty acid content of beef from steers fed low-or high-forage diets. *Journal of animal science*, 88(11):3657-3665.
- SCOTTÁ, B.A. et al. Influência dos minerais quelatados e inorgânicos no metabolismo, desempenho, qualidade da carcaça e da carne de frangos de corte. *PUBVET*, Londrina, v.8, N. 9, Ed. 258, Art. 1710, 2014.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C., Guimarães J.A. & Döbereiner J. 1968. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos no nordeste e norte do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 3:351-360.
- Tokarnia C.H., Guimarães J.A., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1971. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 6:61-77.
- Vieira, J. C. S., Braga, C. P., de Oliveira, G., de Lima Leite, A., de Queiroz, J. V., Cavecci, B., Bittarello, A.C., Buzalaf, M.A.R., Zara, L.F., & de Magalhães Padilha, P. **Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish.** *Environ. Chem. Lett.*, 15 (2017), pp. 717-724.
- WATSON, A. K., K. J. VANDER POL, T. J. HULS, M. K. LUEBBE, G. E. ERICKSON, T. J. KLOPFENSTEIN, M. A. GREENQUIST. 2014. Effect of dietary inclusion of wet or modified distillers grains plus solubles on performance of finishing cattle¹. *The Professional Animal Scientist*, 30(6):585-596.
- Zinn, R.A., Shen, Y., 1998. An evaluation of ruminally degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/1998.7651280x>.

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

Embora a maioria dos trabalhos relacionados aos minerais refiram-se à reprodução animal, é notório o seu impacto na produção e no bom funcionamento celular. Por ser estritamente importante para a saúde/sobrevivência animal, o estudo das metaloproteínas e/ou *metal binding proteins* (ainda pouco estudados em bovinos anelados) requer alguma atenção e deve ser mais explorado. Assim, estudos com maior profundidade relacionados com a associação de minerais à proteínas e/ou enzimas podem fornecer informações de grande relevância para nutrição e saúde animal.

Neste trabalho, os animais não foram desafiados quando a deficiência ou excesso de minerais. Deixando os bovinos sobre mesmas condições nutricionais, possibilitou o entendimento da ação dos mesmos sobre o organismo (presença, ausência, ligação mineral-proteína). Assim como, outros alimentos podem ajudar na disponibilidade destes minerais, possibilitando ou não sua ação no organismo; ou seja, dependendo da alimentação, um mineral ingerido pode ou não ser “usado/ estar disponível” no corpo, influenciando diretamente na qualidade do alimento que chega a mesa do consumidor.

O presente estudo demonstra grande contribuição para o entendimento das metaloproteínas e suas funções no metabolismo, bem como o impacto que essas podem causar na produção animal. Chamando a atenção para novos estudos a serem explorados quando a influência dos minerais na produção bovina (carne e leite).

É possível também explorar estudos à respeito das proteínas diferencialmente expresas, como proteínas-alvo, em diferentes fases de desenvolvimento animal, podendo aumentar a validação das informações.