

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LARYSSE APARECIDA ALVES

**ANÁLISE DO PLASMA SANGUÍNEO DE FÊMEAS NELORE PELA
TÉCNICA DE METABOLÔMICA**

Uberlândia – MG

2020

Larysse Aparecida Alves

**ANÁLISE DO PLASMA SANGUÍNEO DE FÊMEAS NELORE PELA
TÉCNICA DE METABOLÔMICA**

Monografia

apresentada à coordenação do
curso de graduação em
Zootecnia da Universidade
Federal de Uberlândia, como
requisito parcial a obtenção do
título de Zootecnista.

Uberlândia – MG

2020

Larysse Aparecida Alves

**ANÁLISE DO PLASMA SANGUÍNEO DE FÊMEAS NELORE PELA
TÉCNICA DE METABOLÔMICA**

Monografia

apresentada à coordenação do curso de graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial a obtenção do título de Zootecnista.

APROVADA EM DE OUTUBRO DE 2020

Professor: Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão (Professor – UFU)

Orientador

Professor (a): Dr. Eliane Pereira Mendonça (Professora – UFU)

Professor: Dr. Felipe Antunes Magalhães (Professor – UFU)

Uberlândia - MG

2020

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca comercial registrada.

μl - Microlitro.

KVa - Kilovoltampere.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me propiciar ter chegado até aqui, meus pais Elismar Alves e Márcia Helena que sempre trabalharam e me apoiaram na vida e na jornada acadêmica, sempre me amparando nos momentos mais difíceis e acreditando em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava, minhas irmãs Aline Pereira e Juliana Pereira que sempre me incentivaram e ajudaram a ir atrás dos meus objetivos, estando sempre ao meu lado me apoiando, meu cunhado Luís Fernando que sempre esteve disposto a me ajudar nos meus projetos.

Agradeço imensamente meu orientador, Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão pela confiança expressa a mim, por todo empenho, atenção e paciência ao me orientar, por compartilhar seu vasto conhecimento comigo, não tenho palavras para descrever tamanha gratidão que sinto.

Meus sinceros agradecimentos ao Mário do laboratório de Nanobiotecnologia que me ajudou de maneira efetiva na análise dos dados, estando sempre disposto a ajudar, apesar da correria ele sempre se prontificou e o Prof. Dr. Luís Ricardo Goullad responsável pelo laboratório que permitiu que fossem feitas as análises.

Agradeço meus amigos que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e não me deixando desanimar diante das adversidades, Amanda Maniezo, Juliana Santana, Gustavo Segatto, Matheus Felipe, Pablo Matos, Pedro Lucas Nunes, Rafael Simões, Rainer Mozer, Priscilla Lindenberg, Vitor Eneas e Yasmin Teixeira, vocês foram e são essenciais na minha vida. Agradeço aos meus familiares, principalmente a Poliandra Amaral e Byanca Alves que estiveram sempre comigo.

Agradeço a banca examinadora que esteve presente, Prof. Dr. Eliane Pereira Mendonça, Prof. Dr. Felipe Antunes Magalhães, obrigado pela disponibilidade e por contribuir na qualidade do trabalho.

Resumo

Este trabalho foi conduzido tendo como objetivo de verificar a técnica de metabolômica para identificar as modificações metabólicas no plasma sanguíneo de bovinos da raça Nelore, utilizando um probiótico. O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental Capim Branco pertencente a UFU, no setor de pecuária de corte. Os animais ficaram ao longo do experimento estabulados e recebendo uma mesma dieta de grão inteiro e diferentes níveis de inclusão de aditivo. Foram avaliadas cinco fêmeas Nelore com fistulas ruminais, distribuídas ao acaso no modelo de delineamento de Quadrado latino (5x5), onde os tratamentos foram 4 níveis de inclusão do aditivo probiótico nas doses de 1,5; 3; 6 e 9 g além do grupo controle sem adição de aditivo. Foi utilizado o software Masshunter profiler professional V. 13.1. para rodar as análises estatísticas, formando o heatmap, e obter três metabólitos que se expressaram de forma significativa.

Palavras-chave: Aditivo; Metaboloma; Nelore.

Abstract

This work was carried out with the objective of verifying the metabolomics technique to identify the metabolic changes in the blood plasma of Nellore cattle, using an alkaline additive from sedimentary seaweed. The experiment was conducted at the Experimental Capim Branco Farm belonging to UFU, in the beef cattle sector. The animals were kept throughout the experiment established and receiving the same whole grain diet and different levels of additive inclusion. Five Nellore females with ruminal fistulas were evaluated, randomly distributed in the Latin square design model (5x5), where the treatments were 4 levels of inclusion of the alkaline additive at doses of 1.5; 3; 6 and 9 g in addition to the control group without adding additives. Masshunter profiler professional V. 13.1 software was used. where three metabolites with significant expression were found.

Keywords: Additive; Metabolome; Nellore.

Sumário

1.0. Introdução.....	9
2.0. Referencial Teórico.....	10
2.1. Características gerais da raça Nelore.....	11
2.2. Metabolômica e a importância da análise.....	12
2.3. O uso de aditivos	13
3.0. Objetivo	14
4.0. Metodologia	14
5.0. Resultados	16
6.0. Discussões	18
7.0. Conclusão.....	19
8.0. Referências bibliográficas.....	20
Anexo a – Aprovação da CEUA.....	23

1.0. Introdução

Nas últimas décadas a bovinocultura de corte em termos de rebanho mais que dobrou e as áreas de pastagens tiveram pouco aumento, o que indica avanço na produtividade, altos níveis tecnológicos e organização na cadeia produtiva. Isso fez com que houvesse melhorias na alimentação dos nossos rebanhos, como a adoção de forragens selecionados e desenvolvidos por meio de pesquisas científicas, juntamente com suplementação alimentar proteica, energética, mineral e vitamínica.

O Brasil é um dos mais importantes produtores de carne bovina no mundo, resultado de décadas de investimento em tecnologia que elevou não só a produtividade como também a qualidade do produto brasileiro (EMBRAPA, 2020).

A raça Nelore é de origem Indiana, sua chegada no Brasil foi em 1868 e desde então é uma das raças mais utilizadas pois apresenta rápida resposta aos estímulos zootécnicos, isso pela sua adaptação ao clima brasileiro (ACNB, 2020).

É resistente ao calor, pois possui maior número de glândulas sudoríparas e seu trato digestivo é 10% menor em relação as raças Europeias e seu metabolismo é baixo o que gera menor quantidade de calor. (ACNB, 2020).

O rúmen é considerado um ecossistema microbiano diverso e único. Seu meio anaeróbico (baixa concentração de oxigênio), temperatura em torno de 39 a 42°C, pH que varia normalmente entre 6,0 e 7,0 (KOZLOSKI, 2011).

Habitam no interior do rúmen três tipos de microorganismos ativos: bactérias, protozoários e fungos (KOZLOSKI, 2011).

Os microrganismos ruminais fazem primeiro a digestão dos carboidratos para subsequentemente utilizar metabólitos de interesse como glicose, dextrose, pentoses e lactatos como fonte de energia.

Segundo Canuto et al. (2017), Metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica. O conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da), presentes ou alterados em um sistema biológico, é chamado de Metaboloma.

Os metabólitos podem atuar como substratos na próxima etapa dos processos bioquímicos, ou então, podem ser excretados na forma de resíduo, ou ainda serem estocados podendo ser utilizado, por exemplo, como defesa química contra algum patógeno (COSTA, 2018)

Os metabólitos podem ser divididos em metabólito primário e metabólito secundário, onde utilizamos os metabólitos primários, pois são rotas de síntese de degradação de macromoléculas nos seres vivos, os metabólitos secundários estão relacionados a plantas e fungos.

Após a genômica, transcriptômica, e a proteômica, a metabolômica surgiu como uma estratégia analítica recente para o estudo do metabolismo em um nível global, para um dado sistema biológico (DUARTE, 2016).

Para a análise metabolômica o sangue é um dos mais importantes biofluidos, pois é através dele que se observa os metabólitos instantâneos que conduzem informações sobre os nutrientes no metabolismo (CRUZ, 2008). Por meio da análise metabolômica é possível ter maior conhecimento das bases metabolômicas responsáveis por cada característica.

Atualmente o uso de aditivo na pecuária de corte visa melhorar o metabolismo animal e a fermentação ruminal, pois acredita-se que melhorando a fermentação ruminal aumenta a eficiência alimentar.

Aumentando a eficiência alimentar, consegue-se diminuir o consumo de alimentos utilizados para produção de proteína, produzindo mais carne com menor custo e assim melhorando a produtividade para atender a demanda (PIRES, 2011).

Sabe-se que no Brasil alguns grupos de aditivos são proibidos, tais como hormônios e anabolizantes para motivar o crescimento, entretanto alguns aditivos são aprovados para o uso na alimentação, porém existe limitação. Para o uso em ruminantes podemos citar: leveduras, ionóforos e antibióticos não ionóforos, tamponantes e própolis (OLIVEIRA, 2005).

2.0. Referencial Teórico

2.1. Características gerais da raça Nelore

O rebanho bovino brasileiro é constituído por grande diversidade de raças e, em importância, as raças originárias da Índia têm papel de destaque na pecuária brasileira (OLIVEIRA et, al 2002). Os bovinos podem ser divididos em dois grandes grupos: taurinos (*Bos taurus taurus*), representado pelos bovinos europeus e zebuínos (*Bos taurus indicus*), originados das regiões tropicais, onde suas características mais importantes são a pele pigmentada e solta com pêlos curtos e a presença do cupim (SANTIAGO, 1987).

A raça Ongole ou Nelore, como é conhecida no Brasil é da espécie *Bos taurus* e subespécie, *Bos taurus indicus*, seu início foi a mil anos antes da era cristã, os arianos do povo germânico levaram os animais para o continente indiano (ACNB, 2020). A grande maioria do rebanho indiano é constituído por animais mestiços, são variados principalmente pela falta de divisão de pastos, sendo livres

Na história é descrito que a primeira aparição da raça no Brasil foi em torno de 1868, onde um navio com destino a Inglaterra ancorou em Salvador com um casal da raça que estava a bordo, os animais foram comercializados e permaneceram no país (ACNB, 2020).

A importação realizada em 1930, por Manoel Oliveira Prata e Francisco Ravísio Lemos, foi fundamental para o desenvolvimento da seleção no Brasil. Eles trouxeram animais que tiveram influência decisiva na formação dos plantéis nacionais, como Marajá- um dos pilares da raça Nelore e Rajá - que juntamente com Sheik consideraram o padrão racial do Nelore no Brasil (SANTOS, 1995).

Passados quase 30 anos, em 1960 desembarcou no Porto de Paranaguá, estado do Paraná, um lote de 20 zebuínos da raça Nelore, trazidos da Índia pelo criador Celso Garcia Cid (CID & PELEGRINE, 1990).

Um dos principais motivos para a aceitação da raça Nelore no Brasil se teve devido ao seu bom desempenho produtivo e reprodutivo em climas tropicais (LIMA. 1989).

As características de interesse que podem ser observadas na raça Nelore são: rusticidade; as fêmeas apresentam garupa com ligeira inclinação, sendo ótimo para abertura da bacia, facilitando o parto; alta fertilidade e prolificidade; prepúcio reduzido do touro que conferem maior eficiência reprodutiva e as cores da pele e pelagem faz com que o animal fique protegido dos raios ultravioletas e refletem a luz do sol.

O gado zebu se adaptou tão bem às condições de criação do Brasil que foi largamente utilizado em cruzamentos absorventes com o gado crioulo e hoje cerca de 80% do rebanho bovino brasileiro é de gado zebu ou de animais com alguma mestiçagem de zebu (SILVA et al., 2002).

A raça Nelore se destaca para a produção de carnes e cruzamentos, como é uma raça resistente ao calor e aos parasitas tem se utilizado sua genética para cruzamento com animais *Bos taurus taurus*, pois os mesmos são sensíveis ao clima tropical, as progênies provindas do cruzamento apresentam médias superiores aos do seus pais.

2.2. Metabolômica e a importância da análise

O termo Metabolômica é relativamente recente, sendo introduzido no ano 2000 por Fiehn e colaboradores, ao integrar os dados com as demais ômicas pode-se aplicar para a construção de redes moleculares, auxiliando na compreensão dos processos bioquímicos (DUARTE, 2016)

Os metabólitos são os resultados de processos celulares, entretanto ao receber qualquer estímulo que seja externo, suas características ou concentração é alterada, o estudo da metabolômica foca em explicar tais modificações (DUARTE, 2016).

As duas maiores plataformas usadas em metabolômica são a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (MS, do inglês, Mass Spectrometry), na qual cada uma delas possui suas próprias vantagens e desvantagens (DUARTE, 2016).

A vantagem dessas técnicas é a identificação e quantificação de centenas de metabólitos em uma única amostra, permitindo um conhecimento amplo desses compostos relacionados com as características de interesse (COSTA, 2018).

Sabe-se que o sangue é um dos principais biofluidos para a análise metabolômica, segundo Costa (2018), com os resultados do perfil metabolômico do plasma e sua diferença para animais selecionado de acordo com a característica desejada, podemos identificar e correlacionar os metabólitos com a característica escolhida.

O estudo aumenta o conhecimento das bases metabolômicas ligadas às características de interesse de maneira mais rápida. A avaliação dos metabólitos do plasma é capaz de melhorar a compreensão dos metabólitos e identificar os metabólitos chave, e então, correlacionar com a deposição proteica, que afinal, influencia no crescimento (COSTA, 2018).

Segundo Costa (2018), podemos observar que os estudos da metabolômica, são ferramentas fundamentais para gerar informações que possibilitem orientar os sistemas de produção a obter um produto que atenda as exigências dos consumidores e da indústria.

2.3. O uso de aditivos

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, através da IN 44/21, define aditivo como substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo (MAPA, 2015).

O uso de aditivo iniciou-se na década de 50, visando prevenir e curar doenças, com eliminação dos microrganismos que competiam pelo substrato no trato gastrointestinal, contudo observou-se que se obtinha sucesso na conversão alimentar e crescimento (MATOS, 2008).

De acordo com o Ministério da Agricultura e Pecuária MAPA (2015), o termo probiótico é definido como cepas de micro-organismos vivos (viáveis), que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestório dos animais, contribuindo para o seu equilíbrio. (NR).

Os probióticos têm a capacidade de melhorar a saúde intestinal, estimulando o desenvolvimento de uma microbiota saudável (predominada por bactérias benéficas),

evitando que patógenos entéricos colonizem o intestino, aumentando a capacidade digestiva e melhorando a imunidade da mucosa (UYENO, et al).

3.0. Objetivo

Identificar se houve variações no metabolismo de vacas Nelore com fistulas ruminais, recebendo dieta de alto grão e diferentes níveis de inclusão do aditivo probiótico, por meio da técnica de análise metabolômica do plasma sanguíneo.

4.0. Metodologia

As atividades do experimento foram conduzidas de julho a agosto de 2018. Essa área está localizada na Fazenda experimental Capim-Branco, pertencente a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, MG. Situada em uma região com altitude média de 863 metros, 18° 55' 207' de latitude sul e a 48° 16' 38'' de longitude oeste *Greenwich*. O clima da região de Uberlândia, segundo a classificação de Köppen (1948), é do tipo Cwa, tropical de altitude, com inverno ameno e seco, e estações seca e chuvosa bem definidas. A temperatura média anual em Uberlândia é 21.5 °C e 1479 mm é a pluviosidade média anual (CLIMA, UBERLÂNDIA 2020).

Foram avaliados 5 bovinos, zebuínos, fêmeas com fistula ruminal, da raça Nelore com idade média de 36 meses, peso corporal (PC) médio de 408 ± 10 kg, todos os animais com brincos de identificação, desvermifugadas contra ecto e endoparasita. Os animais receberam uma mesma dieta de grão inteiro (80% de milho em grão e 20% de núcleo proteico e mineral extrusado comercial). Foi utilizado o delineamento experimental Quadrado latino 5x5, com cinco animais e cinco tratamentos durante um período total de experimento de cinco semanas, todas as fêmeas receberam os tratamentos propostos. O aditivo utilizado foi um probiótico comercial que continha 2,5 x 10⁶ UFC/g de *Saccharomyces cerevisiae* e 2,0 x 10⁷ UFC/g de *Bacillus subtilis*, na MS total da dieta, de forma que a ingestão foi de 1,5; 3; 6 e 9 g de aditivo por animal dia, além do tratamento controle.

Os animais foram mantidos em confinamento do tipo *tie stall*, em baias individuais e cobertas, 24 m² de área por animal, comedouros individuais de alvenaria,

piso de cimento e bebedouros com disponibilidade de água potável constantemente. Todos os animais foram adaptados antecipadamente aos tratamentos, ambiente e ao manejo.

Os tratamentos experimentais foram 4 níveis de inclusão do aditivo alcalino nas doses de 1,5; 3; 6 e 9 g além do grupo controle sem adição de aditivo.

As coletas de sangue dos animais foram realizadas de 7 em 7 dias, por 5 domingos no período da manhã, em torno das 8:00 horas, logo após a execução do manejo dos animais para coleta do líquido ruminal, a coleta foi realizada por punção na veia caudal, as amostras foram coletadas em tubos do tipo Vacutainer® sem reagentes.

Posteriormente e de forma rápida as amostras de sangue foram levadas para o laboratório onde foi separado o plasma da porção celular, centrifugado a 5.000 rpm durante 10 minutos. O plasma foi pipetado e armazenado em tubos cônicos do tipo eppendorf à -80°C.

Para a extração dos metabólitos a técnica utilizada foi a mesma criada e usada no laboratório de Nanobiotecnologia. Foi adicionado 100 µL de amostra (sangue) com 1000 µL de metanol grau espectroscópico em tubos cônicos de 2 mL esta mistura foi incubada por 4 horas em ultrafreezer (-80°C). Em sequência centrifugado por 15 min à 13000 g e o sobrenadante transferido para outro tubo cônico de 2 mL, o qual foi concentrado em concentrador a vácuo por 30 min e liofilizado. O material foi armazenado em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises.

As análises IES/EM por injeção em fluxo, foi utilizado o método de infusão direta e foram realizadas com um cromatógrafo líquido, (marca Agilent modelo Infinity 1260) para injeção das amostras, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatógrafo serão: 0,2 mL.min⁻¹ de fluxo constante da fase móvel com a composição de 90% metanol e 10% de água acidificada com ácido fórmico (0,1 % (v.v-1)), o volume de injeção das amostras foi de 10 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L.min⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KVa.

A parte estatística foi usado o software Masshunter Profiler Professional V. 13.1, primeiramente foi feita uma filtragem de frequência dos compostos, que estavam 100% frequentes em pelo menos uma das condições e aplicado o método de ANOVA, com análise variada, T < 0,15%, posteriormente foi formado o *Heatmap*.

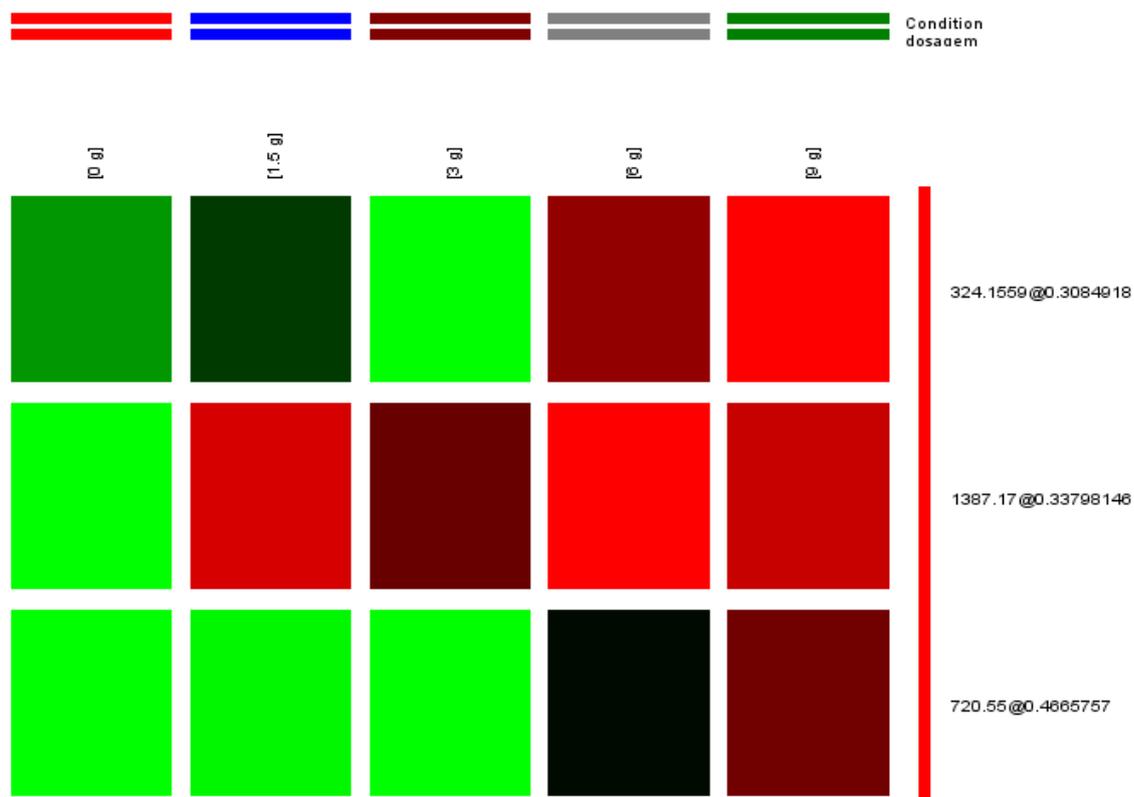
5.0. Resultados

Foi realizado somente a análise estatística no software Masshunter profiler profissional V. 13.1., de forma variada, com um nível de significância de $T < 0,15\%$ após a análise foi possível concluir que não houve diferença metabólica significativa. Por outro lado, identificamos três compostos metabólitos com predominância maior que os demais metabólitos.

Foram identificados três metabólitos (Gráfico 1) o primeiro com massa molar de 324,15m/z, o segundo com 1387,17m/z e por fim o terceiro com 720,55m/z, os mesmos influenciaram no *Heatmap* criada pelo software, pois foram os únicos compostos com diferença significativa.

Gráfico 1 – Gráfico da média da resposta metabólica dos animais, divididos em grupos pela intensidade.





Fonte: Própria autoria

A média dos cinco animais geraram a intensidade das imagens de acordo com o tratamento e expressão nos metabólitos. Todas as concentrações estão comparadas com o controle (0g), no pareamento que foi feito para gerar esse gráfico.

6.0. Discussão

Esses processos bioquímicos que ocorreram nas células dos organismos vivos, causaram uma variação de compostos, esses compostos são os metabólitos (DIXON, 2001). O esperado era que houvesse alguma expressão pois segundo Oliveira et al. (2005) os aditivos agem diretamente sobre o metabolismo dos animais. No entanto, não houve efetividade ($p < 0,05$) no controle do pH ruminal dos animais submetidos aos tratamentos deste trabalho.

No presente experimento não foi feito o estudo para a classificação dos metabólitos que se expressaram de forma significativa, no entanto segundo Costa (2018) no seu experimento de caracterização metabolômica do plasma de tourinhos bovinos Nelore, a glicose, ureia, ácido lático, acetato e glicerol foram os metabólitos mais

abundantes encontrados no plasma e Ghaffari et al. (2017) utilizando bezerros, encontraram-se os mesmos metabólitos e em maiores concentrações no metaboloma desses animais, independente do momento em que foi coletado, se foi antes ou após a alimentação.

No gráfico 1 foi feita a média dos animais segundo a resposta aos tratamentos de cada animal durante as cinco semanas, de acordo com a intensidade dos metabólitos. Fez-se uma análise variada, todas as concentrações estão comparadas com o tratamento controle de 0g no pareamento para gerar o *Heatmap*.

Com o tratamento de 1,5 g de aditivo obteve alteração mais intensa para o metabólito de 720.55m/z, estando próximo a 16,3 na escala da legenda, porém igual ao tratamento controle, enquanto no metabólito 138,17m/z a intensidade foi baixa e diferente do tratamento controle que se apresenta com alta intensidade e em 324.1559m/z, uma alteração média, próxima a intensidade do controle. É possível que os metabólitos atuem como substratos nas outras etapas dos processos bioquímicos, ou podem ser estocados, sendo usados como defesa química e excretados do organismo como resíduo (DEMAIN; VAISHNAV, 2002). Deste modo, cada um desses processos pode gerar alterações nos níveis de um ou vários metabólitos simultaneamente, deste modo podemos estudá-las através de processos metabólicos (COSTA, 2018).

No tratamento de 3g, não houve alteração no metabólito de 720.55m/z, quando comparado ao tratamento controle, portanto nos tratamentos de 6g e 9g ocorreu uma queda na intensidade em que o metabólito se expressava, indo de uma média de 13,5 para ± 12 . No metabólito 324.15m/z houve maior expressão, inclusive superior ao tratamento controle, toda via nos dois últimos tratamentos verificou-se queda nas expressões com isso baixa intensidade do metabólito. O metabólito 138,17m/z, no tratamento de 3g obteve um aumento na expressão, porém nos tratamentos de 6 e 9g houve uma queda na intensidade comparado ao tratamento controle. Uma possível explicação para essas diferenças de desempenho individuais é que as características podem estar relacionadas com as alterações no metabolismo dos animais (COSTA, 2018).

Os resultados se mostram promissores para avaliação de metabólitos gerados por processos fisiológicos, entretanto existem outras etapas de identificação e

quantificação desses metabólitos que precisam ser implementadas e assim permaneceriam como subsídio para futuras pesquisas.

7.0. Conclusão

Por meio da técnica de análise metabolômica foi possível identificar a produção de três metabólitos diferentes no plasma de vacas Nelore, recebendo dieta de alto grão e diferentes níveis de inclusão do aditivo probiótico, porém não foi possível caracterizá-los.

8.0. Referências bibliográficas

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL, **Histórico**, 2020. Disponível em: <http://www.nelore.org.br/Raca/Historico> Acesso em: 01 de Agosto de 2020.

BORGES, P.C. **A índia que eu vi**. Uberaba: Grifo Editora e Grifo Editora e gráfica, 1988. 78p;

CANUTO, B. A. G.; COSTA, L. J.; SOUZA, L. R. A.; FACCIO, T. A.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, T. K.; TAVARES, M. F. M. **Metabolômica: Definições, Estado – da – arte e aplicações representativas**. 2017, 18f. Quim. Nova, vol. XY, No. 00,1-17, 200_ São Paulo;

CARVALHO, R. F. **Efeito da alga calcária e da Monensina no controle de acidose de bovinos Nelore submetidos a mudança abrupta para dieta com elevada proporção de concentrado**. 2014, 67f. Dissertação de Mestrado (Qualidade e produtividade animal) Universidade de São Paulo – Pirassununga;

CID, C. G.; PELLEGRINE, D. **O tempo de Seo Celso**. Londrina: Gráfica Ipê, 1990. 336 p.;

CLIMA DATA UBERLÂNDIA , 2020. Disponível: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/minas-gerais/uberlandia-2896/t/agosto-8/> Acesso em 01 de Agosto de 2020.

COSTA BORSONELLO, Marcella. **Caracterização Metabolômica do Plasma de tourinhos Nelore com diferentes DEPs de crescimento**. 2018, 62f. Dissertação (Mestrado em qualidade e produtividade animal) Faculdade de engenharia de Alimentos – Pirassununga;

CRUZ, A, C, M; **Metabolômica Nutricional**. 2008, Monografia. Faculdade de Ciências Da Nutrição E Alimentação - Universidade do Porto.

DEMAIN, A. L; VAISHNAV, P. **Involvement of nitrogen- containing compounds in beta-lactam biosynthesis and its control**, v.26. 67-82 p.

DIXON, R. A. **Natural products and plant disease resistance**. Nature, London, v.411, n. 6839, p. 843-847, 2001.

DUARTE, B. H. G.; **Metabolômica por LC-ESI-QTOF-MS em plasma de camundongos NOD/SCID sob tratamento quimioterápico: Potenciais biomarcadores de leucemia**. 2016, 77f. Dissertação (Mestrado em química na área de química analítica) Universidade Estadual de Campinas – Campinas;

EMBRAPA. **Qualidade da carne bovina**, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>. Acesso em: 01 de Agosto de 2020.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS, cap. 08 2013/05/8. Disponível em: <http://www.ufjf.br/quimicaead/files/2013/05/8-Espectrometria-de-massa.pdf>. Acesso em: 25 outubro 2019

GHAFFARI, M. H. et al. **Diurnal variation of NMR based blood metabolites in calves fed a high plane of milk replacer: a pilot study**. BMC Veterinary Research, London, v. 13, n. 1, art 271, 2017.

GOMES, O. P. I.; **Uso de ionóforos na alimentação de ruminantes**. 2011, 4f. Departamento de produção animal e alimentos, CAV/UEDESC – Lages – Santa Catarina;

KOZLOSKI, G, V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2º edição, Santa Maria – RS, Editora UFSM, 2009;

LANÇAS, M. F. **Cromatografia Líquida moderna e a Espectrometria de massas finalmente compatíveis?** 2009 V.1, N.2 Universidade de São Paulo – Instituto de Química. 1:27 f;

LIMA, F. P. **Nelore: a força de uma raça** São Paulo: Associação dos criadores de Nelores do Brasil,1989. Vídeo;

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 44, de 15 de dezembro de 2015. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692> Acesso em: 11 de outubro de 2020;

MARINO, T, C.; MEDEIROS, R, S. **Aditivos alimentares na nutrição de bovino de corte, Cap. 07** 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/120200/1/Nutricao-Animal-CAPITULO-07.pdf>. Acesso em: 25 outubro 2019;

Matos, B.C. **Uso de aditivos na pecuária leiteira: revisão**. PUBVET, V.2, N.9, Mar1, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/5856/uso-de-aditivos-na-pecuaacuteria-leiteira-revisatildeo>. Acesso em: 25 outubro 2019;

MELO, T. V.et al. **Solubilidad in vitro de algunas fuentes de calcio utilizadas em alimentación animal**. Archivos de Zootecnia, v. 55, n.211, p. 299, 2006.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. Embrapa Gado de Corte. Documentos, 106,** 2001. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/325185>;

OLIVEIRA, F. H.; MAGNABOSCO, U. C.; BORGES, M. S. M. A.; **Nelore: Base Genética e Evolução Seletiva no Brasil**, 2002. 50f. Documentos 49 Embrapa – Planaltina, DF;

OLIVEIRA, J.S., ZANINE, A.M., SANTOS, M.E. 2005. **Uso de aditivos na nutrição de ruminantes**. Revista Eletrônica de Veterinária REDVET, 6: 1- 23.;

OLIVEIRA, V. S. **Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo – Revisão de literatura**. Garça/ SP, Ano XI – Número 20 – Janeiro 2013 – Periódicos semestral 1:21p

ORTOLAN, J. H. 2010. **Efeito de aditivos no metabolismo ruminal e parâmetros sanguíneos em bovinos**. Tese de Doutorado (Animal de produção e controle de qualidade) Universidade Federal de Pirassununga. – São Paulo

PIRES ASSIS, Murillo. **Utilização de aditivos na alimentação de bovinos confinados: Desempenho, degradabilidade *in vitro*, extrato etéreo e Ph fecal**. 2011, 55f. Dissertação (Mestrado em produção animal) Universidade Federal de Goiás – Goiânia;

REIS, R.A.; MORAIS, J.A.S.; SIQUEIRA, G.R. **Aditivos alternativos para a alimentação de Ruminantes**. In: CONGRESSO LATINO – AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., São Paulo. **Anais ...** São Paulo: CBNA, 2006. P. 1-40;

SANTIAGO, A. Alberto. **Gado Nelore 100 anos de seleção** São Paulo, Ed. Dos criadores 1987, 594 p;

SANTOS, G, V. **Explorando novas aplicações para a técnica de espectrometria de massas com ionização/ dessorção por laser LDI-MS**. 2016, 100f. Tese (Doutorado em ciências) Universidade Federal de Campinas – Campinas;

SANTOS, R. dos. **Nelore: a vitória brasileira**. Uberaba. Ed. Agropecuária Tropical. 1995. V. 2 392p.

SILVA, L.O.C.; GONDO, A.; NOBRE, P.R.C.; EUCLIDES FILHO, K.; ROSA, A. N.; JOSAHKIAN, L.A.; FIGUEIREDO, G.R. **Genetic Trends in Nellore Breed in Brazil**. In: VII World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier – France, august 19-23, 2002;

SITTA, C.; **Aditivos (ionóforos, antibióticos não ionóforos e probióticos) em dietas com altos teores de concentrado para tourinhos da raça Nelore em terminação**. 2011, 88f. Dissertação (Mestrado Ciência animal e pastagens) Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba;

UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. **Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. Microbes and environments**, v.30, n.2 ,p.126–132, 2015. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/30/2/30_ME14176/html/-char/en.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 193/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 099/16

Projeto Pesquisa: "Degradabilidade *in situ* dos componentes nutricionais de diferentes forrageiras tropicais".

Pesquisador Responsável: Felipe Antunes Magalhães

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 19 de setembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU