

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DE BOTUCATU**

AUXÍLIO À PESQUISA – REGULAR

**NÍVEIS DE GRÃOS DE DESTILARIA EM DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE
CONFINADOS: DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA E
QUALIDADE DE CARNE**

Responsável: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto

**Botucatu-SP
Março de 2016**

**SÃO PAULO STATE UNIVERSITY “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE**

**LEVELS OF DISTILLER GRAINS IN FEEDLOT DIETS: PERFORMANCES,
CARCASS TRAITS AND MEAT QUALITY**

Coordinator Researcher: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto

Botucatu-SP

March, 2016

RESUMO

Em virtude do aumento nos custos para aquisição de alimentos comumente utilizados em dietas para animais de produção, frequentemente tem sido estudadas alternativas alimentares de menor custo. Uma opção que tem tido destaque recentemente são os grãos de destilaria com solúveis (DDGS), pois tem surgido como opção no Brasil em consequência do início da produção de etanol a partir do milho.. Diante do exposto, os objetivos do presente projeto serão avaliar os efeitos da inclusão de grãos de destilaria em dietas com milho moído, sobre o consumo, desempenho, características de carcaça, carne, perfil de ácidos graxos, oxidação lipídica e expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Serão utilizados 100 bovinos, machos, F1 Angus-Nelore, com peso inicial médio de 330 kg. Os animais serão alocados aleatoriamente aos tratamentos com diferentes níveis de DDG (0; 15%; 30% e 45% da MS dietética) em dietas contendo 80% de concentrado e 20% de volumoso. O abate dos animais será realizado utilizando a técnica de concussão cerebral. As carcaças serão identificadas, lavadas, divididas em duas metades, sendo estas pesadas individualmente e levadas à câmara fria, por aproximadamente 24 horas, à temperatura de 1°C. As mensurações nas carcaças serão: rendimento total da carcaça quente, peso da carcaça quente, peso da carcaça fria, área de olho de lombo e espessura de gordura subcutânea, sendo os últimos mensurados após resfriamento. Na desossa, serão coletadas amostras do músculo L.dorsi, para as análises físico-químicas (cor, perda de peso por cozimento e força de cisalhamento), de composição centesimal, perfil de ácidos graxos, estabilidade lipídica e expressão gênica.

1-) Enunciado do Problema

Em virtude do aumento nos custos para aquisição de alimentos comumente utilizados em dietas para animais de produção, frequentemente tem sido estudadas alternativas alimentares de menor custo. Uma opção que tem tido destaque recentemente são os grãos de destilaria com solúveis (DDGS), pois tem surgido como opção no Brasil em consequência do início da produção de etanol a partir do milho.

Uma vez que o Brasil é um grande produtor de grãos, especialmente do milho, o uso do grão para a produção de etanol torna-se uma oportunidade interessante, sendo um processo bastante eficiente, inferior apenas à eficiência de uso da cana de açúcar para produzir etanol. A partir de uma tonelada de milho é possível produzir 400 litros de etanol e a partir de uma tonelada de cana de açúcar obtém-se cerca de 85 litros de etanol, entretanto a produção de cana em toneladas por hectare é bem superior à observada com milho. A eficiência energética de conversão de glicose em etanol é de aproximadamente 51,4% enquanto 48,6% são

atribuídos à produção de dióxido de carbono. Por outro lado, a produção de etanol a partir do milho apresenta algumas vantagens em virtude da ausência de necessidade de processamento logo após a colheita, o que não ocorre com a cana de açúcar, que necessita de ser processada até 24 horas após a colheita. Ademais, a produção de etanol a partir de cereais como o milho é uma estratégia para escoar o excesso da produção do grão. Diante disso o milho parece ser uma interessante opção para o período da entressafra da cana de açúcar, por exemplo. Cerca de 80% dos equipamentos utilizados em usinas de cana de açúcar também podem ser utilizados para o processamento do milho na produção de etanol, o que ameniza a necessidade de aquisição de novos equipamentos.

A produção de etanol a partir do milho gera como subproduto grãos de destilaria com solúveis (DDGS), sendo que para cada 3,8 litros de etanol produzidos são gerados 2,4 kg de DDGS (CEPA, 2011). O alto valor protéico e energético (cerca de 29,5% de PB; 13,9% de EE e 30% de FDN) torna o DDGS um alimento bastante atrativo como substituto de alimentos tradicionalmente utilizados em consideráveis quantidades em dietas de bovinos de corte seja em pastagem ou confinamento, como milho e farelo de soja. O farelo de soja, que é o alimento protéico comumente utilizado em dietas de bovinos de corte pode apresentar alto custo e diante disso, o estudo de alternativas protéicas é de grande relevância para a cadeia produtiva. O considerável teor de lipídeos dos grãos de destilaria com solúveis (11 a 13%), pode também afetar importantes características da carne bovina, como o teor de gordura intramuscular, perfil de ácidos graxos, coloração e oxidação lipídica, tornando importante a sua avaliação. Em bovinos, assim como em outras espécies de animais, a deposição de gordura reflete a nutrição e o grupo genético utilizado. Com isso, há enorme interesse na manipulação da composição química da carne por meio da regulação de sua biossíntese. Para melhor compreensão dos efeitos da nutrição sobre o metabolismo lipídico, uma alternativa recente é a utilização da expressão gênica associada à nutrição, também conhecida como nutrigenômica. A expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida na estrutura do DNA é transmitida para os RNAm e produtos proteicos (EGGEN & HOCQUETTE, 2003), sendo esta controlada pela ligação de determinados fatores de transcrição em sequências específicas do DNA.

As interações entre os nutrientes que compõem a dieta e a síntese e atividade de enzimas lipogênicas podem ilustrar as inúmeras possibilidades no que diz respeito à deposição de lipídeos no tecido adiposo. Isso é possível devido à atividade biológica apresentada por certos ácidos graxos da dieta, que podem estimular ou inibir genes que codificam enzimas lipogênicas específicas. Como por exemplo, fontes ricas em ácidos graxos

poli-insaturados (AGPI) têm a capacidade de aumentar a transcrição dos genes que codificam a enzima lipoproteína lipase (LPL), o transportador proteína de ligação ao ácido graxo 4 (FABP4), PPAR α (KERSTEN, 2014) e PPAR γ (BIONAZ et al., 2013) e diminuir a expressão do gene que codifica a esteroil-coA-dessaturase (SCD1) (HERDMANN et al., 2010) e os SREBP-1c (BOTOLIN et al., 2006).

O uso de cruzamento entre zebuínos e taurinos no Brasil tem sido crescente, principalmente em sistemas que visam nichos diferenciados de mercado. Uma das metas quando este tipo de animal é submetido à terminação intensiva, é a obtenção de carne mais macia e com níveis superiores de gordura intramuscular. Por isso torna-se importante verificar se o uso de subprodutos com baixo teor de amido poderia prejudicar a adipogênese intramuscular e vida de prateleira da carne, além de desempenho e características quantitativas da carcaça.

Os objetivos do presente projeto serão avaliar os efeitos da inclusão de grãos de destilaria em dietas com milho moído, sobre o consumo, desempenho, características de carcaça, carne, perfil de ácidos graxos, oxidação lipídica e expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Os efeitos de ácidos graxos insaturados sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico não estão totalmente elucidados e trabalhos nesse tópico são de grande importância, pois poderão auxiliar na formulação de dietas com o objetivo de manipular o desempenho animal e composição química da carne. Por fim também será realizado um estudo de viabilidade econômica com o uso deste ingrediente alternativo.

As hipóteses da presente proposta são:

O uso de altos níveis de grãos de destilaria afeta o consumo e o desempenho de bovinos de corte.

O uso de altos níveis de grãos de destilaria afeta a composição química da carne, especialmente causando redução na concentração de extrato etéreo da mesma.

Altos níveis de grãos de destilaria causam redução o teor de gordura intramuscular do L.dorsi em virtude da menor expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico (PPAR γ , SREBP-1c, LPL, FABP4, ACACA, FAS, SCD1, CPT2 e ACOX).

Altas concentrações dietéticas de grãos de destilaria causam redução na vida de prateleira da carne bovina, em virtude de seu alto teor de enxofre e ácidos graxos insaturados.

1.1) Desempenho animal e uso de grãos de destilaria

Os grãos de destilaria são extensivamente utilizados nos Estados Unidos desde o final do século XIX (Henry, 1900) em virtude da importante produção de etanol a partir do milho no país. Stock et al. (2000) descreveram o processo de obtenção dos grãos secos de destilaria

com solúveis (DDGS), especialmente a partir do milho, onde o amido, que representa aproximadamente dois terços do grão é fermentado até etanol. Os nutrientes remanescentes gerados são a vinhaça e o DDGS, que é produzido após a remoção da água. Portanto, proteína, gordura, fibra e fósforo, têm suas concentrações aumentadas em cerca de três vezes nesse processo de produção de etanol. O teor protéico pode chegar a 30%, a gordura aproximadamente 12%, o FDN atinge até 36% e o fósforo pode representar até 0,9% do alimento. Em virtude do elevado teor de proteína no DDGS em comparação ao milho, este subproduto foi inicialmente utilizado como uma fonte protéica (Klopfenstein et al., 1978). McDonald (1954) relataram que a zeína, principal proteína do milho apresenta degradação ruminal de cerca de 40%, o que garante um bom aporte de PNDR na dieta. Klopfenstein et al. (2008) verificaram que o escape ruminal da proteína oriunda do DDGS é 2,6 vezes maior que o observado no farelo de soja, alimento protéico extensivamente utilizado em confinamentos no Brasil. O uso de fontes protéicas com média degradação ruminal é interessante, uma vez que animais jovens quando submetidos à dietas de terminação para alto desempenho, apresentam maior exigência de proteína não degradável no rúmen. Schoonmaker et al. (2013) avaliaram o efeito de dietas com alto teor de concentrado (80%) contendo níveis crescentes (0%, 30% ou 60%) de DDGS, tendo utilizado 90 novilhos Simental-Angus com peso inicial médio de 200 kg. Os autores verificaram que a elevação dos níveis dietéticos de DDGS não afetaram o ganho de peso diário, a ingestão de matéria seca bem como a eficiência alimentar. Por outro lado, características como rendimento de carcaça, peso de carcaça quente e espessura de gordura subcutânea, responderam de forma quadrática aos níveis de DDGS, sendo que a inclusão de 30% de DDGS promoveu aumento dos valores observados para estes parâmetros, entretanto, com a utilização de 60%, verificou-se decréscimo nos valores observados para essas variáveis.

Inexistem experimentos realizados no Brasil avaliando o uso de grãos de destilaria nas condições dietéticas praticadas nos confinamentos nacionais. Em virtude do interesse dos confinadores em reduzir os custos com alimentação, a avaliação deste subproduto é de grande importância para a pecuária nacional.

1.2) Perfil de ácidos graxos

Dentre as fontes lipídicas disponíveis para alimentação de bovinos de corte, o caroço de algodão é a oleaginosa mais utilizada para este fim, pois apresenta cerca de 20% de extrato etéreo além do elevado teor de proteína, que é o principal fator que motiva o seu uso. Possui também preço reduzido em relação ao farelo de soja, principal alimento protéico utilizado no

país. O grão de destilaria pode surgir como nova opção para os confinadores com possibilidade de reduzir os custos com alimentação.

Nos Estados Unidos, os grãos de destilaria são bastante utilizados em dietas de bovinos de corte. Van der Pol et al. (2009) relataram que parte da gordura presente nos grãos de destilaria estaria parcialmente protegida da biohidrogenação ruminal e isso poderia aumentar a concentração de ácidos graxos insaturados no duodeno, o que poderia alterar o perfil de ácidos graxos da carne bovina. Essa alteração pode impactar sobre a adipogênese intramuscular e vida de prateleira da carne.

Gill et al. (2008) realizaram um experimento com o objetivo de verificar o efeito do fornecimento de grãos de destilaria de milho ou sorgo sobre o perfil de ácidos graxos da carne bovina, utilizando dietas com cerca de 4,5% de extrato etéreo. Os autores verificaram que a substituição do milho floculado-laminado por grãos de destilaria promoveu aumento da concentração de ácidos graxos da série n-6. Outro resultado interessante observado foi a maior concentração de ácido vaccênico na carne de animais alimentados com grãos de destilaria oriundos do milho, em relação ao sorgo.

Por outro lado, a substituição do milho por grãos de destilaria tem como consequência a redução do teor de amido das dietas o que poderia impactar negativamente sobre o teor de gordura intramuscular da carne produzida, entretanto informações sobre o mecanismo pelo qual este ingrediente pode causar esta alteração são escassos na literatura. Há crescente interesse no Brasil em manipular o teor de gordura intramuscular da carne bovina, especialmente nos últimos anos, em virtude do aumento de uso de sêmen de raças europeias em rebanhos de vacas zebuínas.

1.3) Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico

A expressão dos genes, a síntese de RNAm, é controlada pela ligação de determinados fatores de transcrição em sequências específicas do DNA. A expressão destes fatores e, conseqüentemente a sua atuação, é dependente da situação fisiológica e do estágio de desenvolvimento do organismo. Assim, alguns genes são expressos apenas nos momentos apropriados.

O termo PPAR corresponde a uma família de receptores nucleares influenciados por ácidos graxos, que desempenham funções importantes na regulação do metabolismo de nutrientes e homeostase energética. Suas formas funcionam como heterodímeros com receptor X de retinóide (RXR), em que os dois juntos ligam-se a uma sequência específica de DNA na região promotora do gene alvo que induz ou reprime a expressão deste.

Existem basicamente três isoformas de PPAR, que se diferenciam pelo tecido alvo, propriedades fisiológicas e estágios de desenvolvimento do tecido. O PPAR γ tem elevada expressão nos adipócitos e menor expressão no músculo (KERSTEN, 2014), sendo o mesmo crucial no controle da adipogênese e sensibilidade à insulina. A expressão do PPAR α é mais elevada no fígado e no tecido adiposo, seguido do intestino delgado e coração (GEORGIADI et al., 2012). O PPAR α atua na síntese e na β -oxidação dos ácidos graxos no músculo (BIONAZ et al., 2013). Já o PPAR δ/β é expresso em praticamente todos os tecidos (KERSTEN, 2014).

Oliveira et al. (2014) encontraram correlação positiva da expressão do PPAR α no músculo de bovinos com os genes que codificam as enzimas LPL e SCD1, assim como o transportador de ácidos graxos FABP4. Corazzin, et al. (2013) avaliando o PPAR γ , também encontraram que a sua expressão é correlacionada positivamente com a SCD e LPL. Estas correlações positivas indicam que PPAR γ aumenta a expressão de genes envolvidos na lipogênese.

Os SREBP são outros fatores de transcrição que possuem um papel fundamental na homeostase energética, promovendo a glicólise, lipogênese e adipogênese (MANNEN, 2011). Existem três membros da família de SREBP: 1a, 1c e 2. A SREBP-1 está mais relacionada com a regulação dos genes envolvidos na lipogênese (HARVATINE et al., 2006), enquanto a SREBP-2 tem maior influência na regulação da expressão dos genes colesterogênicos (EBERLE, et al. 2004). O SREBP regula a transcrição de genes de ativação através da ligação ao elemento de regulação de esterol (SRE) sequências (50-TCACNCCAC-30), contidos no promotor do seu gene (SHIMANO, 2001).

Ao chegarem aos adipócitos os triglicerídeos transportados pelos quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL), a qual é sintetizada pelos adipócitos e secretada nos capilares do tecido adiposo, produzindo ácidos graxos livre. Partículas de lipoproteínas ricas em TAG são grandes demais para atravessar o endotélio capilar na maioria dos tecidos, com isso a LPL atua liberando AGL, que cruzam o endotélio chegando ao adipócito. A LPL é responsável ainda por controlar a divisão dos ácidos graxos entre o tecido adiposo e muscular (HOCQUETTE et al., 1998), sendo assim de grande importância para os animais produtores de carne.

Após a liberação dos AGL na corrente sanguínea, estes serão removidos pelos tecidos que os utilizarão como combustível ou estoque energético. No entanto, a entrada desses AGL no adipócito exige processos específicos ou transportadores, que facilitam a entrada destas moléculas, como a proteína de ligação ao ácido graxo (FABP) (JURIE et al., 2007). A

importância da FABP4 no transporte de ácido graxo livre se dá pela sua atuação no efluxo e influxo de ácidos graxos no adipócito, em resposta às condições anabólicas e catabólicas, respectivamente (VURAL et al., 2008). As enzimas lipogênicas acetil coA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (FAS) estão associadas à síntese de novo de lipídeos que, em suínos e ruminantes ocorre no próprio tecido adiposo, em aves e na espécie humana ocorre no fígado e em roedores ocorre em ambos os locais (SMITH et al., 2003). Portanto, estas enzimas são consideradas regulatórias, pois mudanças nas suas atividades refletem em alterações nas taxas de síntese dos ácidos graxos. A atividade dessas enzimas pode estar associada a outros fatores, como observado por Ward et al. (2010), ao demonstrarem que a composição da gordura de marmoreio em bovinos está positivamente relacionada com a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de AGS. Estes resultados sugerem que a taxa de biossíntese de ácidos graxos pode ser um fator importante na determinação do perfil lipídico da gordura de marmoreio em ruminantes. A ACC catalisa a carboxilação da acetil-CoA em malonil-CoA. O malonil-CoA, por sua vez, é o sinal metabólico chave para o controle da síntese e oxidação de ácidos graxos em respostas a mudanças na dieta (BROWNSEY et al., 2006). Na verdade, é um substrato para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa. Assim, a ACC tem função importante na regulação da homeostase energética em animais e desempenha papel importante na deposição de lipídeos em diferentes compartimentos do corpo, através do seu produto (ROLLIN et al., 2003). Nos mamíferos, a ACC é altamente regulada pela dieta, hormônios e outros fatores fisiológicos (KIM, 1997). A ingestão de alimentos, especialmente os constituídos por baixo teor de lipídeos, induz a síntese de ACC e, conseqüentemente, aumento na sua atividade (ABU-ELHEIGA et al., 2001).

Um possível envolvimento da atividade da ACC na formação do marmoreio em bovinos também foi verificado por Underwood et al. (2007), que relataram que bovinos com maior quantidade de gordura de marmoreio tiveram maior taxa de ativação da ACC. Em contraste, os animais com baixo marmoreio tiveram maior taxa de fosforilação e inativação da ACC, o que resultou em menor nível da enzima ativa.

1.4) Oxidação lipídica em carne bovina

O número, a posição e a geometria das insaturações dos ácidos graxos afetam a velocidade da oxidação. Para os ácidos araquidônico, linolênico, linoléico e oleico a velocidade de oxidação é de aproximadamente 40:20:1, respectivamente (Araújo et al., 2004). Outro aspecto importante é que ácidos graxos de configuração cis oxidam mais rapidamente que o seu correspondente trans, e as ligações não conjugadas são mais reativas que as ligações conjugadas (Araújo et al., 2004).

Uma maneira de se mensurar a oxidação lipídica é através do teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O teste de TBA quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído, produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm).

A utilização do DDG poderá alterar o perfil de ácidos graxos da carne bovina, principalmente nos maiores níveis de inclusão e conseqüentemente a estabilidade lipídica e de coloração poderá ser prejudicada. Kim & Park (2015) em ensaio com ratos, relataram que o CLA cis-9, trans-11 pode estimular a maior expressão de PGC-1-alpha, um fator de transcrição que exerce papel fundamental na biogênese mitocondrial. Há necessidade de estudos neste tópico com ruminantes, se o aumento da concentração de CLA cis-9, trans-11 poderia impactar em redução da vida de prateleira da carne em virtude de modificações na biogênese mitocondrial e alteração da capacidade respiratória do músculo.

Os grãos de destilaria possuem alto teor de enxofre e podem colaborar para o desenvolvimento de estresse oxidativo (Truong et al., 2006), além disso este mineral pode reduzir a biodisponibilidade de outros minerais com função antioxidante (Pogge, 2013). Diante disso, a redução da vida de prateleira e aumento na taxa de descoloração da carne de animais submetidos à terminação em dietas com grãos de destilaria, como relatado em alguns artigos, pode não ser apenas um efeito de alteração do perfil lipídico do músculo.

2) Resultados esperados

Com os resultados do projeto espera-se obter maiores informações sobre o potencial do uso de grãos de destilaria para animais cruzados nas condições de manejo alimentar utilizadas no Brasil. O presente projeto propõe avaliar o uso deste subproduto em nível que proporcione a formulação de dietas com até 8% de EE e o efeito deste manejo nutricional sobre o consumo, desempenho e eficiência alimentar. No que diz respeito às características de carcaça, importantes fatores podem ser influenciados pelos manejos nutricionais propostos, como por exemplo espessura de gordura subcutânea e na garupa. Considerando que o no Brasil pelo menos 50% dos bovinos abatidos apresentam baixo grau de acabamento de carcaça, o projeto poderá sugerir recomendações para adequação do grau de acabamento das mesmas. Em relação à carne, o teor de extrato etéreo intramuscular poderá ser afetado negativamente pela redução do nível de amido das dietas, entretanto o nível de grãos de destilaria que pode causar esse efeito não é conhecido e o presente projeto poderá auxiliar a

comunidade acadêmica nesse sentido. Pesquisas demonstram que o aumento do teor de ácidos graxos insaturados absorvidos no intestino pode inibir a lipogênese intramuscular, o que não é consenso entre os pesquisadores e o presente projeto poderá colaborar também neste sentido. O interesse na melhoria do perfil de ácidos graxos da carne bovina tem crescido nos últimos anos, com grande número de pesquisas tendo sido realizadas. A grande maioria dos trabalhos propostos envolve o uso de alimentos que podem apresentar alto custo, como gorduras protegidas e grãos de soja. Apesar desse tipo de produto muitas vezes serem efetivos em melhorar o perfil lipídico da carcaça, pesquisas com o uso de subprodutos ricos em lipídeos podem auxiliar na redução do custo de produção. Não há consenso entre os pesquisadores sobre como o perfil e a quantidade de ácidos graxos da dieta pode afetar a expressão de importantes genes relacionados ao metabolismo lipídico (Choi et al., 2015; Choi et al., 2015; Turner et al., 2012; Urrutia et al., 2015). Essas informações serão úteis na formulação de dietas mais eficientes quando o objetivo for modular a adipogênese intramuscular. **No que diz respeito à vida de prateleira, pretende-se verificar se a maior ingestão de grãos de destilaria poderia causar aumento na concentração de CLA cis-9,trans-11 no músculo L.dorsi e se haveria alguma relação entre este aumento e a expressão de *PGC-1-alpha* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha) bem como redução da vida de prateleira.**

3) Desafios científicos e tecnológicos e os meios e métodos para superá-los

No Brasil busca-se atualmente a melhoria da qualidade da carne e características de importância nesse sentido são os teores de gordura subcutânea e intramuscular. Dependendo do nível de inclusão do DDG teores mínimos de gordura subcutânea e intramuscular poderão não ser alcançados e o presente projeto pretende poder recomendar a sua utilização sem efeitos negativos sobre essa característica de importância econômica.

3.1) Material e métodos

O estudo será conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu no confinamento experimental do Departamento de Melhoramento de Nutrição Animal, no período de julho a novembro de 2016. **Serão utilizados 100 bovinos, machos não castrados, F1 Angus-Nelore, com peso inicial médio de 330 kg**, oriundos do mesmo rebanho. Os animais serão mantidos em baias de piso de concreto, bebedouro tipo concha, tendo uma lotação de cinco animais por baia, com cinco baias por tratamento, sendo o dimensionamento 5 X 6 metros e uma área de cocho de 3,75m.

A dieta será formulada segundo o software *Large Ruminant Nutrition System 1.0.12*, nível 2. Os animais serão alimentados duas vezes ao dia, sendo 9h:00min e 15h:00min. Os animais serão alocados aleatoriamente aos tratamentos com diferentes níveis de DDG (0; 15%; 30% e 45% da MS dietética) em dietas contendo 80% de concentrado e 20% de volumoso conforme demonstrado na Tabela 1.

Uma vez por semana serão coletadas amostras dos ingredientes do concentrado e do feno, que será usada como volumoso. Portanto, para determinação do consumo de matéria seca e eficiência alimentar a unidade experimental será a baía. Os animais serão pesados no início do experimento, a cada 28 dias e ao fim do período, depois de jejum alimentar e hídrico de 16 horas. Para obtenção do consumo diário de matéria seca, a dieta ofertada e as sobras serão pesadas, e amostras destes, coletadas, para determinação do teor de matéria seca.

Tabela 1. Composição de ingredientes das dietas

Ingredientes (%)	Níveis de DDG's			
	0%	15%	30%	45%
Milho	60,6	55,39	47,6	32,6
Farelo de Soja	17,0	7,21	-	-
DDG's	-	15,0	30,0	45,0
Feno	20,0	20,0	20,0	20,0
Núcleo Mineral	2,40	2,40	2,40	2,40

As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e cinzas (MM) das dietas serão realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da FMVZ-UNESP, no equipamento *Feed and Forage Analyzer (FOSS NIRS DS2500TM)*.

Todos os dias do período experimental serão coletadas as sobras da ração nos cochos antes do primeiro fornecimento de ração do dia, medindo a ingestão de matéria seca (IMS) de cada baía, isso ocorrerá pesando a sobra e calculando o quanto o animal consumirá todos os dias. A determinação da matéria seca (MS) da dieta será efetuada diariamente para avaliação do consumo diário, sendo utilizado o aparelho *Koster moisture test*.

Os animais serão submetidos à observação visual para avaliação do comportamento ingestivo, sendo observados a cada cinco minutos, durante período de 24 horas. Durante as observações serão coletados dados para determinação do tempo despendido em alimentação,

ruminação e ócio, expressos em minutos, conforme descrito por Johnson e Combs (1991), números de refeições e de visitas ao bebedouro. Além disso, será calculado o tempo de alimentação por refeição, utilizando a eficiência alimentar que o animal apresentou no dia da observação dividido pelo número de refeições no dia da observação, expresso em minutos, e ingestão de massa seca por refeição, utilizando a ingestão de MS que o animal apresentará no dia da observação dividida pelo número de refeições no dia da observação, expresso em quilos. Para avaliar variações na IMS será utilizada metodologia proposta por Bevans et al. (2005). Também será realizada avaliação da seleção de ingredientes usando-se o *Penn State Particle Separator* (PSPS) conforme descrito por Heinrichs (1996)

Serão coletadas amostras de sangue da veia jugular de um animal por baia no início do período experimental e ao fim do mesmo. Os seguintes parâmetros serão determinados com um equipamento de análise de pH e perfil metabólico sanguíneo (IL1610 Blood Gas System): pH, pressão parcial de CO₂ (pCO₂), pressão parcial de O₂ (pO₂), bicarbonatos (HCO₃⁻), CO₂ total (TCO₂), excesso de bases no sangue (Beb), excesso de bases no fluido extracelular (Beeef) e saturação de oxigênio (O₂Sat) e lactato. O pH, pCO₂ e pO₂ serão calculados pelo equipamento e HCO₃⁻, TCO₂, Beb, Beeef e O₂Sat serão calculados de acordo com equações do NCCLS (1991). O lactato será mensurado usando um lactímetro (Accutrend Roche).

O abate dos animais será realizado utilizando a técnica de concussão cerebral e secção da veia jugular, seguido de remoção do couro e evisceração. As carcaças serão identificadas, lavadas, divididas em duas metades, sendo estas pesadas individualmente e levadas à câmara fria, por aproximadamente 24 horas, à temperatura de 1°C. As mensurações nas carcaças serão: rendimento total da carcaça quente, peso da carcaça quente, peso da carcaça fria, área de olho de lombo e espessura de gordura subcutânea, sendo os últimos mensurados após o resfriamento.

Na desossa, às 24h *post mortem*, serão coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* (LD), da meia carcaça esquerda, para as análises físico-químicas (cor, perda de peso por cozimento e força de cisalhamento), de composição centesimal, perfil de ácidos graxos e estabilidade lipídica. As amostras que serão submetidas a análise de força de cisalhamento, coloração e perda de peso por cozimento serão embaladas em sacos de polietileno e congeladas a -16°C. Uma sub-amostra do LD será armazenada a vácuo, também em sacos de polietileno, em temperatura de 3°C por 0, 7, 14 e 21 dias, para determinação da coloração e estabilidade lipídica (Tarladgis et al., 1960). As amostras que serão submetidas as análises de expressão gênica serão coletadas logo após o abate e mantidas a -80°C.

Para o acompanhamento e avaliação da incidência de rumenites, abscessos hepáticos e morfologia das papilas do rúmen serão abatidos os animais no final do experimento. Nesse dia será montada uma equipe capacitada e experiente para determinar o grau de incidência dos distúrbios. Para a avaliação das incidências de rumenite e abscesso hepático os animais após o abate, terão seus rumens lavados e avaliados. O epitélio ruminal será classificado conforme a incidência de lesões (rumenites e hiperparaqueratose) e outras anormalidades segundo Bigham et al. (1975). Com relação aos abscessos hepáticos, estes serão classificados de acordo com a metodologia de Brink et al. (1990).

Após o abate, os animais serão eviscerados e os compartimentos rúmen + retículo serão isolados. Após limpeza e remoção do excesso de tecido conjuntivo circundante, os compartimentos serão abertos, esvaziados, e lavados em água corrente. Um fragmento de aproximadamente 1 cm² será coletado da região do saco cranial do rúmen. Essas amostras serão imediatamente colocadas em frascos contendo solução de tampão fosfato (PBS = 0,79g de NaCl; 0,223g de Na₂HPO₄; 0,0524 g de NaH₂PO₄; H₂O qsp 100mL) a 0,1 M e pH 7,4. As amostras serão mantidas por três dias refrigeradas até a realização das mensurações macroscópicas da parede ruminal. As variáveis morfológicas macroscópicas avaliadas serão: número médio de papilas por cm² de parede (NMP), área média das papilas (AMP), área total de superfície absorptiva por cm² de parede (ASA), e participação das papilas ruminais na área total de superfície absorptiva (PSA). Para avaliação histológica das papilas, fragmentos de parede no recesso do saco ventral do rúmen serão coletados e avaliados para: análise morfométrica da altura e área das papilas ruminais, determinação do índice mitótico das células da camada basal do epitélio e mensurações das áreas de epitélio total e de queratina.

A composição química do músculo será realizada no equipamento FoodScan LabTM (Foss NIRSystems, Inc., USA), onde serão determinados os valores de umidade, proteína, gordura, matéria mineral e colágeno total.

O perfil de AGs será determinado por cromatografia gasosa de alta resolução. Os lipídeos serão extraídos seguindo metodologia descrita por Folch et al. (1957), sendo esterificados segundo Hartman & Lago (1973). As amostras serão injetadas em split a uma razão de 1:10. A temperatura do injetor e do detector será de 205°C. A temperatura de programação da coluna utilizada será de 180 a 190°C a 5°C/minuto, 190°C por 12 minutos, 190 a 215°C a 3°C/minuto, 215 a 240°C a 5°C/minuto e 240°C por 10 minutos. O gás de arraste utilizado será o nitrogênio, com fluxo de 1mL/minuto.

Será efetuada a determinação das expressões dos seguintes genes: PPAR γ , SREBP-1c, LPL, FABP4, ACACA, FAS, SCD1, CPT2, ACOX e PGC-1-alpha no músculo bovino. O

RNA total será isolado a partir do tecido muscular congelado, usando reagente Trizol (Invitrogen®) e clorofórmio, posteriormente precipitado com isopropanol. A maceração das amostras será feita com nitrogênio líquido e para cada 100 mg de tecido será adicionado 1 mL de Trizol e misturado vigorosamente em vortex. Os extratos serão incubados por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 4°C por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante será transferido para um novo tubo contendo clorofórmio (0,2 mL/mL de Trizol) e misturado por 15 segundos. A solução será centrifugada por 20 minutos a 4°C a 12.000 rpm, sendo a camada aquosa transferida para um novo tubo. Isopropanol (0,5 mL/mL de Trizol) será adicionado à solução, misturado por inversão e incubado por 60 minutos a -20°C. As amostras serão centrifugadas por 10 minutos a 4°C (12.000 rpm) e o sobrenadante descartado. Os pellets serão lavados com 1mL de etanol a 75% e os tubos serão submetidos a uma nova centrifugação por 5 minutos a 4°C a 12.000 rpm. O sobrenadante será removido e o RNA ressuspensionado em 30 µL de DEPC (dietilpirocarbonato).

A primeira fita complementar (cDNA) será sintetizada utilizando o sistema de transcrição reversa de acordo com o fabricante (instruções Promega UK Ltd.). O RNA total (1µg) de cada amostra será transcrito em cDNA utilizando hexâmeros aleatórios. O cDNA será quantificado por absorbância a 260 nm, diluído para 50 ng/µL para ações de trabalho e será armazenado a -20°C para análises posteriores.

Os primers para transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) serão comercialmente sintetizados (Sigma-Aldrich Brasil Ltda). Cada RT-PCR será realizada em um volume total de 20 µL com 1 µL de cDNA (50 ng/µL), 10 µL de SYBR Green I no mastermix, 1 µL dos primers forward e reverse (20 ng de cada), e 8 µL de água deionizada. Curvas de dissociação serão examinadas para a presença de um único produto de polimerização. A RT-PCR será realizada utilizando Corbett Rotor-Gene 3000, sistema quantitativo de PCR, com tais parâmetros de ciclo: 95°C por 15 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s, seguido da dissociação do amplicon (95°C por 1 min, 50°C por 45 s, elevando a 0,5°C/ciclo até 95°C ser atingido).

O experimento será conduzido em um delineamento inteiramente casualizado e os dados serão analisados utilizando o procedimento PROC MIXED do software estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). A baía será a unidade experimental e incluída no modelo como efeito aleatório. O modelo incluirá o nível de grãos de destilaria como efeito fixo. Dados relativos ao desempenho animal serão analisados como medida repetida.

4) Cronograma de execução do projeto

Atividade	2017												
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Preparo da área experimental	X	X	X										
Adaptação dos animais				X	X								
Fase Experimental						X	X	X	X				
Análises Laboratoriais										x	X	X	
	2018												
Análises Laboratoriais	X	X	X	X	X	X	X	X					
Análises Estatísticas					X	X	X	X	X	X			
Publicação de resultados parciais							X	X					
Submissão de Artigos										X	X		
Entrega do Relatório Final												X	

5) Disseminação e avaliação

Os resultados serão disseminados por meio de publicações dos resultados em Periódicos Científicos classificados com Qualis CAPES no mínimo B1 e também na forma de boletins técnicos, bem como, por meio da participação em workshops e eventos direcionados à comunidade científica e produtores. A equipe também divulgará os resultados em revistas, magazines e sites renomados da área de ciências agrárias. Será selecionado um estudante de mestrado e/ou doutorado para execução da presente pesquisa.

6) Outros apoios

O projeto contará com apoio de importantes pesquisadores do Brasil e do exterior, como Dr. André Mendes Jorge (FMVZ-UNESP), Dra. Cyntia Ludovico Martins (FMVZ-UNESP), Dr. Mário de Beni Arrigoni (FMVZ-UNESP), Dr. Ricardo Andrade Reis (FCAV-UNESP), Dr. Márcio Machado Ladeira (DZO-UFLA). Além do auxílio proporcionado pela infraestrutura da FMVZ-UNESP, haverá parcerias com frigorífico comercial para abate dos animais.

7) Referências Bibliográficas

ARAÚJO, JÚLIO. Química de alimentos: teoria e prática. In: **Química de alimentos: teoria e prática**. UFV, 2004.

BEVANS, D. W.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; et al. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. **J. Anim. Sci.** v. 83, p. 1116-1132, 2005.

BIGHAM, M. L.; MCMANUS, W. R. 1975. Whole wheat grain feeding of lambs. Effects of roughage and wheat grain mixtures. *Aust. J. Agric. Res.* 26:1053-1062.

BIONAZ, MASSIMO et al. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR research**, v. 2013, 2013.

BOTOLIN, SERGIU; MCCABE, Laura R. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. **Journal of cellular biochemistry**, v. 99, n. 2, p. 411-424, 2006.

BRINK, D. R.; LOWRY, S. R.; STOCK, R. A. et al. 1990. Severity of liver abscesses and efficiency of feed.

BROSSARD, L.; MARTIN, C.; MICHALET-DOREAU, B. et al. 2003. Ruminal fermentative 4 parameters and blood acido-basic balance changes during the onset and recovery 5 of induced latent acidosis in sheep. *Animal Research*, ©INRA, 6 EDP Sciences, 52:513–530.

BROWN, J. Mark et al. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of lipid research**, v. 44, n. 7, p. 1287-1300, 2003.

BUCKNER, Crystal D. et al. Optimum levels of dry distillers grains with solubles for finishing beef steers. **Nebraska Beef Cattle Reports**, p. 68, 2007.

CALIFORNIA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2011. California-Modified GREET Pathway for the Production of Biodiesel from Corn Oil at Dry Mill Ethanol Plants. Stationary Source Division, Release Date: November 3, 2011, Version 2.0. 40 pp

CARVALHO, S.; RODRIGO, M. T.; BRANCO, R. H. et al. Comportamento ingestivo de cabras Alpinas em lactação alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro proveniente da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 562-568, 2006.

CORAZZIN, M. et al. Effect of linseed addition on the expression of some lipid metabolism genes in the adipose tissue of young Italian Simmental and Holstein bulls. **Journal of animal science**, v. 91, n. 1, p. 405-412, 2013.

DANIEL, J. L. P., RESENDE JÚNIOR, J. C. AND CRUZ, F. J. Participação do ruminotriclo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 688-694, 2006.

DOREAU, Michel; CHILLIARD, Yves. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, n. 01, p. S15-S35, 1997.

EBERLÉ, Delphine et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839-848, 2004.

EGGEN, André; HOCQUETTE, Jean-François. Genomic approaches to economic trait loci and tissue expression profiling: application to muscle biochemistry and beef quality. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2004.

FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal Dairy of Science**, p.249-251, 1965.

GEORGIADI, Anastasia; KERSTEN, Sander. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 2, p. 127-134, 2012.

GILL, R. K. et al. Impact of beef cattle diets containing corn or sorghum distillers grains on beef color, fatty acid profiles, and sensory attributes. **Journal of animal science**, v. 86, n. 4, p. 923-935, 2008.

HARMON, D. L.; YAMKA, R. M.; ELAM, N. A. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: A review. **Canadian journal of animal science**, v. 84, n. 3, p. 309-318, 2004.

HARVATINE, Kevin J.; BAUMAN, Dale E. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 10, p. 2468-2474, 2006.

HEINRICHS, J. 1996. In evaluating particle Size of Forages and TMRs using the Penn State Particle Size Separator. Pennsylvania: Pennsylvania State University, State College, p.9.

HENRY, W. A. 1900. Dried distillery grains compared with oats. Feeds and Feeding 2nd ed. 421. Morrison Publishing Co., Ithaca, NY

HERDMANN, A. et al. Effect of dietary fatty acids on expression of lipogenic enzymes and fatty acid profile in tissues of bulls. **Animal**, v. 4, n. 05, p. 755-762, 2010.

JOHNSON, T. R.; COMBS, D. K. Effects of prepartum diet, inert rumen bulk, and dietary polyethylene glycol on dry matter intake of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 3, p. 933-944, 1991.

KERSTEN, Sander. Physiological regulation of lipoprotein lipase. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 7, p. 919-933, 2014.

KLOPFENSTEIN, T., J. WALLER, N. MERCHEN, AND L. PETERSEN. 1978. Distillers grains as a naturally protected protein for ruminants. *Distillers Feed Conference Proceedings* 33:38–46.

KLOPFENSTEIN, T.; ERICKSON, G.; BREMER, V. Use of Distillers Byproducts in the Beef Cattle Feeding Industry. 2008. **Journal of Animal Science**, in press, p. 2007-0550.

MCDONALD, I. W. 1954. The extent of conversion of feed protein to microbial protein in the rumen of sheep. *Biochem. J.* 56:120–125

OLIVEIRA, C. A.; MILLEN, D. D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 64-75, 2014.

OLIVEIRA, D. M. et al. Expression of genes involved in lipid metabolism in the muscle of beef cattle fed soybean or rumen-protected fat, with or without monensin supplementation. **Journal of animal science**, v. 92, n. 12, p. 5426-5436, 2014

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. release 9.1. Cary, NC, 2003.

SCHOONMAKER, J. P.; CLAEYS, M. C.; LEMENAGER, R. P. Effect of increasing distillers grains inclusion on performance and carcass characteristics of early-weaned steers. **Journal of animal science**, v. 91, n. 4, p. 1784-1790, 2013.

TARLADGIS, Basil G. et al. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 37, n. 1, p. 44-48, 1960.