

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Departamento de Química e Física molecular
Laboratório de Química Analítica e Inorgânica

**ABORDAGEM METABOLÔMICA DO FÍGADO DE BOVINOS COMO BUSCA
DE BIOMARCADORES PARA MITIGAR A EMISSÃO DE METANO**

SÃO CARLOS-SP

2023

Pâmela Thays da Silva Baima

**ABORDAGEM METABOLÔMICA DO FÍGADO DE BOVINOS COMO BUSCA
DE BIOMARCADORES PARA MITIGAR A EMISSÃO DE METANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química, campus São Carlos —
SP para a obtenção título de mestre em Química.

Área: Química Orgânica e biológica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso.

SÃO CARLOS-SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Pâmela Thays da Silva Baima*

Data: 31/10/2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Baima, Pâmela Thays da Silva

Abordagem metabolômica do fígado de bovinos como busca de biomarcadores para mitigar a emissão de metano / Pâmela Thays da Silva Baima. — São Carlos, 2023.

109 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

1. Fígado de bovino. 2. Metano. 3. Metabólitos. 4. Lipídios. 5. Nelore. I.
Título.



Dedico este trabalho em memória do meu Padrinho Carlos Nina Baima Júnior que como professor e educador me inspirou a estudar e ter paixão pela leitura, que sempre proporcionou o melhor para a minha educação, sendo um pai para mim e quero dedicar também a Carla Gardênia de Brito Baima, minha querida tia por todo carinho, amor, conselhos e incentivos e por mostrar persistência e dedicação em tudo o que fazia bibliotecária exemplar foste minha segunda mãe amo e amarei vocês eternamente, gratidão eterna por tudo sei que são dois anjos olhando por mim lá do céu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS que ao longo da minha vida e em todos os momentos me deu forças para superar todas as dificuldades.

Ao grupo Shalom que me ajudaram muito trazendo esperança, fé e alegria quando estava com depressão.

A psicóloga Caroline Spindola por todo auxílio e assistente social Emanuela Pap da Silva por todo apoio, suporte e conselhos que me deste em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

À toda minha família agradeço em especial aos meus pais, Cláudio Nina Baima Júnior e Sidineia Costa da Silva Baima, por garantirem minha educação e por todo carinho e amor.

Aos meus irmãos pela força, meus avós e avôs por compartilharem sua sabedoria, meu tio Glauco.

À minha tia, Glorinha por toda ajuda financeira e pelas mensagens de motivação.

A minha madrinha Tânia Costa por ser essencial na minha caminhada.

Aos meus amigos da fé, representado na pessoa de Camilo Saraiva, muito obrigada por tudo.

Ao meu namorado, Jairo Pires, pelo incentivo e toda ajuda financeira e/ou psicológica e por todos os momentos que me aconselhou pela paciência, carinho e amor.

A todos os colegas de laboratório Keila, Priscila, Sinara, Silvia na qual pude conviver e aprender muito me qualificando.

A Luísa Almeida por toda a disponibilidade e paciência para me explicar sobre quimiometria.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Maranhão (FAPEMA), por proporcionar a oportunidade de os jovens estudarem em outras instituições auxiliando com bolsas de estudo (EDITAL FAPEMA Nº 011/2021 - BOLSAS DE MESTRADO NO PAÍS/BM-02122/21).

A Coordenação de Pós-Graduação de Química por toda prestatividade.

À Prof.^a Dr.^a Luciana Regitano pesquisadora da Embrapa que me concedeu a oportunidade de fazer parte deste projeto belíssimo.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Daniel Cardoso por ser exemplo de profissional, de humildade, por ter me acolhido, compartilhado seus conhecimentos e por todo o incentivo.

Por fim, a Universidade de São Paulo que proporcionou este momento.

“Os que lançam as sementes entre lágrimas ceifarão com alegria, chorando de tristeza, sairão, espalhando suas sementes; cantando de alegria voltarão, carregando os seus feixes! ” (Salmo 125)

RESUMO

As emissões de metano entérico constituem uma preocupação ambiental significativa, levando o Brasil ao compromisso na COP 26 em 2021 de reduzir as emissões de metano em 30% até 2030. Dado que o fígado desempenha um papel fundamental na regulação do equilíbrio energético e da fisiologia metabólica geral, é essencial investigar os biomarcadores associados ao metabolismo do fígado bovino. Metabólitos polares e apolares no fígado apresentam potencial como indicadores para discernir a presença de microrganismos ligados à emissão de metano. Esta exploração abrangente do metaboloma, conhecida como metabolômica, desvenda as atividades dos metabólitos, esclarece o metabolismo celular e auxilia na identificação de biomarcadores. Este estudo centra-se na avaliação de metabólitos polares e apolares dentro do fígado de bovino Nelore para entender melhor como as diversas intervenções nutricionais podem contribuir para a mitigação do metano. Foram analisadas um total de 52 amostras de fígado de bovinos machos castrados *Bos indicus* (Nelore) submetidos a várias dietas, incluindo dietas convencionais e baseadas em subprodutos. Procedimentos de extração foram empregados para compostos polares e apolares, e técnicas analíticas, tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H NMR) e Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS), foram aplicadas. Os dados dos compostos polares foram recolhidos pelo ^1H NMR e processados usando o software Chenomx, enquanto os dados dos componentes apolares foram coletados pelo MALDI-MS e processado em R usando o pacote MALDIquant e os lipídios foram anotados usando a ferramenta CEU 3.0 mass mediator. Análises multivariadas e univariadas foram realizadas utilizando o software MetaboAnalyst 5.0. Embora esta análise abrangente tenha permitido a identificação e quantificação de metabólitos em amostras de fígado bovino e o reconhecimento de regiões espectrais significativas, o estudo não produziu biomarcadores nem estabeleceu sua associação com vias metabólicas relativas à mitigação das emissões de metano.

Palavras-chave: fígado bovino; metano; metabólitos; lipídios

ABSTRACT

Enteric methane emissions constitute a significant environmental concern, prompting Brazil's commitment at COP 26 in 2021 to reduce methane emissions by 30% by 2030. Given that the liver plays a pivotal role in regulating energy balance and overall metabolic physiology, investigating the biomarkers associated with bovine liver metabolism is essential. Polar metabolites and apolar in liver hold potential as indicators for discerning the presence of microorganisms linked to methane emission. This comprehensive exploration of the metabolome, known as metabolomics, unravels the activities of metabolites, sheds light on cellular metabolism, and aids in biomarker identification. This study focuses on evaluating both polar and apolar metabolites within the Nelore cattle liver to better understand how diverse nutritional interventions may contribute to methane mitigation. A total of 52 liver samples from castrated male *Bos indicus* (Nelore) cattle subjected to various diets, including conventional and byproduct-based diets, were analyzed. Extraction procedures were employed for polar and apolar compounds, and analytical techniques, such as nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS), were applied. Data from polar compounds were collected by ^1H NMR and processed using the Chenomx software, while data from apolar compounds were collected by MALDI-MS and processed in R using the MALDIquant package and lipids were annotated using the CEU 3.0 mass mediator tool. Multivariate and univariate analyses were performed using MetaboAnalyst 5.0 software. Although this comprehensive analysis allowed for the identification and quantification of metabolites in cattle liver samples and the recognition of significant spectral regions, the study did not yield biomarkers or establish their association with metabolic pathways pertaining to methane emission mitigation.

Keywords: bovine liver; methane; metabolites; lipids.

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1- Representação de classes de lipídios	26
Figura 2 – Espectro de RMN dos compostos polares das 24 amostras do fígado de bovinos nelores (Binning de 0,004).....	38
Figura 3 – Gráfico de Scores de PCA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar.....	39
Figura 4 – Gráfico de Q residuals vs Hotelling T ² de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto.	40
Figura 5 – Gráfico da variância explicada da análise de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto.	41
Figura 6 – Gráfico de Scores de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore (com n° do brinco) com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (Scores nas LV 1 e 2).	42
Figura 7 – Gráfico de Scores de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (Scores nas LV 2 e 3).....	42
Figura 8 – Gráfico de variáveis de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (loadings na LV1).	43
Figura 9 – Gráfico de variáveis de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (loadings na LV2).	44
Figura 10- Gráfico de variáveis de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (loadings na LV3).	45
Figura 11 – Gráfico de scores da PCA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com valores de emissão de metano residual alto (high) e baixo (low).	47
Figura 12 – Gráfico de scores da PCA de metabolitos de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	50
Figura 13– Gráfico de scores da PLS-DA de metabolitos de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	52
Figura 14- Gráfico da análise da importância da variável na projeção do conjunto de dados de metabolitos de 24 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	52
Figura 15 - Gráfico de figuras de méritos do PLSDA de metabolitos de 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a duas dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.....	54
Figura 16- Análise Univariada dos metabólitos das 24 amostras de fígado de bovinos nelores a) análise estatística do conjunto 1 (dieta) b) teste t c) análise estatística do conjunto 2 (emissão de metano residual).	55
Figura 17- Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t considerando p= 0,05 de compostos polares de 52 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	57
Figura 18 – Gráfico dos scores da PCA de compostos polares das 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto pra eficiência alimentar (Binning 0,004).	59

Figura 19 – Gráfico de scores de PLS-DA de compostos polares das 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar (Binning 0,004).	60
Figura 20 - Gráfico da análise da importância da variável na projeção do conjunto de dados de compostos polares de 52 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	61
Figura 21 – Gráficos das figuras de méritos do PLS-DA de compostos de 52 amostras de fígado de bovinos frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar. a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.....	61
Figura 22- Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de compostos polares de 52 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	63
Figura 23 - Gráfico do Modelo de classificação do Random Forest para os compostos polares das 52 amostras de fígados de bovinos Nelores frente a dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	64
Figura 24 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de metabolitos de 42 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	65
Figura 25 - Gráfico de scores da PCA de metabolitos de 42 amostras de fígado de bovinos frente a dieta convencional e subproduto para eficiência alimentar.	67
Figura 26 - Gráfico de Scores de PLS-DA de metabolitos de 42 amostras de fígado de bovinos de corte Nelores com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	68
Figura 27 - Gráfico da análise da importância dos metabolitos na projeção do conjunto de dados de 42 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	69
Figura 28 – Gráfico de figuras de méritos do PLS-DA dos metabolitos das 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.	70
Figura 29 - Gráfico do modelo de OPLS-DA de metabolitos de 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas calculado para discriminação entre os grupos Convencional e Subproduto (a). Resultado do teste de permutação do OPLS-DA (b).....	71
Figura 30 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de lipídios de 22 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	73
Figura 31- Gráfico de scores da PCA de lipídios de 22 amostras de fígado de bovinos frente a dieta distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	75
Figura 32 - Gráfico de Scores de PLS-DA de lipídios de 22 amostras de fígado de bovinos de corte Nelores com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.....	76
Figura 33 - Gráfico da análise da importância dos compostos apolares na projeção do conjunto de dados de 22 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	77
Figura 34 — Gráfico de figuras de méritos do PLS-DA dos compostos apolares das 22 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.	78
Figura 35 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	79

Figura 36 - Gráfico de Scores de PCA de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.....	81
Figura 37 - Gráfico de Scores de PLS-DA de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.....	83
Figura 38 - Gráfico da análise da importância dos lipídios na projeção do conjunto de dados de 17 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	84
Figura 39 - Gráfico de Figuras de méritos do PLSDA de lipídios das 42 amostras de fígado de bovinos frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar. a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.	85
Figura 40 - Gráfico da análise de agrupamentos por métodos hierárquicos de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos nelores frente a duas dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	86
Figura 41 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 da correlação de dados de compostos polares e apolares de 22 amostras de fígado de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	87
Figura 42- Gráfico do Modelo de classificação do Random Forest para a correlação dos compostos (polares e apolares) das 22 amostras de fígados de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	89
Figura 43 - Gráfico do modelo de OPLS-DA de metabolitos de 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas calculado para discriminação entre os grupos Convencional e Subproduto (a). Resultado do teste de permutação do OPLS-DA (b).....	90

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1- Estratégias de mitigação de metano e alterações metabólicas no organismo dos ruminantes	22
Tabela 2- Abordagens experimentais na área de lipidômica.....	28
Tabela 3 – Composição da dieta convencional de bovinos nelores confinados na Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos.	32
Tabela 4 – Composição da dieta de subproduto de bovinos nelores confinados na Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos.	33
Tabela 5-Classificação das amostras de fígado de bovinos de nelores e os valores de emissão de metano residual por cada ruminantes.....	34
Tabela 6 – Matriz de confusão da validação do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional(class 1) e subproduto(class 2).	46
Tabela 7 – Classificação da matriz de confusão do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto.	46
Tabela 8 -Matriz de confusão da validação do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores com valores de emissão de metano residual alto (high) e baixo (low).	48
Tabela 9– Classificação da matriz de confusão da validação do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores com valores de emissão de metano residual alto (high) e baixo (low).	49
Tabela 10 - Espectros importantes identificados pelo teste t de 52amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas.	58
Tabela 11- Metabolitos importantes identificados pelo teste t de 42amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.....	65
Tabela 12- Recursos importantes identificados pelo teste t de 22 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.....	74
Tabela 13- Lipídios importantes identificados pelo teste t de 17 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.....	80
Tabela 14-Tabela de recursos importantes identificados pelo teste t da correlação de dados de compostos polares e apolares de 22 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.	87

TABELA DE SIGLAS

AGV	Ácido graxos voláteis
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COP21	21ª Conferência das Partes
COP 26	26ª Conferência do Clima da Organização das Nações Unidas
Da	Dalton
DHB	Dihidroxibenzóico
DIMS	do inglês, <i>Direct Infusion Mass Spectrometry</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
FA	do inglês, <i>Fatty Acyls</i>
GEE	Gás de efeito estufa
GL	do inglês, <i>Glycerolipids</i>
GP	do inglês, <i>Glycerophospholipids</i>
Gt	Giga toneladas
GWP	GLOBAL WARMING POTENTIAL
HCA	do inglês, Hierarchical Cluster Analysis
iNDC	do inglês, <i>Nationally Determined Contribution</i>
IPCC	do inglês, <i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
LVs	do inglês, <i>Latent Variables</i>
MALDI	do inglês, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization</i>
MALDI-MS	do inglês, <i>matrix-assisted laser desorption Ionization mass spectrometry</i>
MS	do inglês, mass spectrometry
Mt	Milhões de toneladas
OOB	do inglês, <i>Out Of Bag</i>
OPLS-DA	do inglês, <i>Orthogonal Projection to Latent Structures Discriminant Analysis</i>
PC	do inglês, <i>principal componente</i>
PCA	do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	do inglês, <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PNMC	Política Nacional sobre Mudança do Clima
RF	do inglês, <i>Random Forest</i>

RME	do inglês, <i>Residual Methane Emission</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SEEG	Sistema de Estimativa de Emissões De Gases De Efeito Estufa
SP	do inglês, <i>Sphingolipids</i>
ST	do inglês, <i>Sterols</i>
TOF	do inglês, <i>Time of Flight</i>
UNFCCC	do inglês, <i>United Nations Framework Convention on Climate Change</i>
VIP	do inglês, <i>Variable Importance in the Projection</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 REBANHO BOVINO COMERCIAL NO BRASIL.....	17
1.2 EMISSÕES DE GASES DO EFEITO ESTUFA NO BRASIL	17
1.3 LEIS QUE REGULAMENTAM AS EMISSÕES DE GASES DO EFEITO ESTUFA ..	18
1.4 PRODUÇÃO DE METANO POR ANIMAIS RUMINANTES.....	19
1.5 ESTRATÉGIAS PARA A MITIGAÇÃO DE METANO	21
1.6 CIÊNCIAS ÔMICAS PARA COMPREENDER O METABOLISMO DOS RUMINANTES.....	23
1.7 RMN APLICADA EM METABOLÔMICA	25
1.8 LIPIDÔMICA	25
1.9 MALDI TOF/MS APLICADO NA ÁREA DE LIPIDÔMICA.....	27
1.10 QUIMIOMETRIA AVANÇO TECNOLÓGICO PARA TRATAMENTO DE GRANDE CONJUNTO DE DADOS.....	28
1.10.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	29
1.10.2. ANÁLISE DISCRIMINANTE DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLSDA)	29
2. OBJETIVO	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	31
3. METODOLOGIA	31
3.1 PRODUÇÃO DE ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRA	31
3.2 AVALIAÇÃO DE PESO DIÁRIO E CONSUMO DE MATÉRIA SECA	33
3.3 COLETA DE AMOSTRAS	33
3.4 ANÁLISE METABOLÔMICA	35
3.4.1 Extração e Preparo de amostras.....	35
3.4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear por ¹ H.	35
3.4.3 Análise de lipídios por MALDI-TOF/MS.....	36
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 CONJUNTO DE DADOS.....	37
4.2 ANÁLISE UNTARGETED.....	37
4.3 CLASSIFICAÇÃO DAS 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES.....	38
4.4 ANÁLISES DE DADOS DAS 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES	38
4.4.1 Análise de Componentes Principais de 24 amostras de fígado de bovinos nelores do conjunto 1 avaliando as dietas distintas (convencional e subproduto).....	39

4.4.2	Análise de Q residuals Vs Hotelling T ² de 24 amostras de fígado de bovinos nelores.	40
4.4.3	Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos - PLS-DA do conjunto 1 dieta (convencional, subproduto).	40
4.4.4	Regiões de caracterização dos grupos de estudo.	43
4.4.5	Matriz de confusão	45
4.5	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PCA DE 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES DO CONJUNTO 2 (ALTA E BAIXA EMISSÃO DE METANO RESIDUAL).	47
4.5.1	Análise discriminante pelo método de mínimos quadrados do conjunto 2 emissões de metano, baixa e alta (<i>low</i> e <i>high</i>).	47
4.6	ANÁLISE TARGETED DAS 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	49
4.6.1	Análise de Componentes Principais das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas para eficiência alimentar.	50
4.6.2	Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dieta distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.	51
5.	ANÁLISE UNTARGETED DE 52 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	56
5.1	Análise por teste T de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.	56
5.2	Análise multivariada de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dieta distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.	58
5.3	Análise Targeted de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.	62
5.3.1	Análise Multivariada de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencionais e subprodutos para a eficiência alimentar.	63
5.4	ANÁLISE TARGETED DE 42 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	64
5.4.1	Análise Univariada Teste T de 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.	65
5.5	ANÁLISE MULTIVARIADA DE 42 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	66
5.6	ANÁLISE UNTARGETED DE LIPÍDIOS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	72
5.7	ANÁLISE MULTIVARIADA DE 22 AMOSTRAS DE LIPÍDIOS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	74

5.8 ANÁLISE TARGETED DAS 22 AMOSTRAS DE LIPÍDIOS DE FÍGADOS DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	78
5.9 ANÁLISE MULTIVARIADA DE 22 AMOSTRAS DE LIPÍDIOS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.	81
5.10 ANÁLISE UNIVARIADA DA CORRELAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS COMPOSTOS POLARES (METABÓLITOS) E APOLARES (LIPÍDIOS) DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO.	86
5.11 Análise multivariada da correlação dos dados obtidos compostos polares (metabólitos) e apolares (lipídios) de fígado de bovinos nelors frente a dietas distintas convencional e subproduto.....	89
6. CONCLUSÃO	92
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	92
8. REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 REBANHO BOVINO COMERCIAL NO BRASIL

A inserção da prática e criação de bovinos no Brasil ocorreu pelos portugueses e iniciou-se no ano de 1534 na capitania de São Vicente (hoje São Paulo), de lá se estendeu por regiões litorâneas, sul, sudeste e nordeste. A principal raça bovina de corte no Brasil é a Nelore, sendo suas principais características a pelagem cinza ou branca e chifres curtos. A introdução da raça Nelore no Brasil se deu com a vinda de seis exemplares (Karvadi, Taj Mahal, Kurupathy, Golias, Godhavari e Rasta) todos oriundos da Índia (MAGNABOSCO, 1997) (FOOTE, 2010) (MUDADU et al., 2016) (FERREIRA et al., 2020).

O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial, estimado em 224,6 milhões de cabeças colocando-se em 2022 como o maior exportador de carne bovina do mundo com 22,7 milhões de toneladas (SEEG, 2022). O rebanho bovino brasileiro cresceu 1,5% no ano de 2020, isto ocorreu devido ao atraso no abate como consequência da pandemia, período no qual o consumo apresentou queda. Com o número crescente de ruminantes nos pastos houve aumento de 1,7% nas emissões de metano oriundas da fermentação entérica (POTENZA et al., 2021). Observou-se também uma redução das terras destinadas à pastagem de cerca de 5,7%, aproximadamente 154 milhões de hectares (IBGE, 2022; ABIEC, 2022).

1.2 EMISSÕES DE GASES DO EFEITO ESTUFA NO BRASIL

O metano (CH_4) é um poderoso gás do efeito estufa, estima-se que cada tonelada de metano tem 28 vezes mais potencial de aquecer o planeta em cem anos quando se compara com uma tonelada de CO_2 . No entanto, o CH_4 é encontrado em menor concentração quando comparado ao CO_2 (SEEG, 2022). As emissões antropogênicas representam cerca de 60% do fluxo total de metano para a atmosfera, totalizando cerca de 365 ± 30 Mt CH_4 /ano. Aproximadamente 35% são provenientes de combustíveis fósseis, 30% da fermentação entérica e manejo de esterco, 10% agricultura de arroz e 20% dos resíduos com o restante, cerca de 5%, emitidos através da queima de biocombustíveis e biomassa (SAUNOIS, et al., 2020). As emissões naturais correspondem à 40% das emissões totais de metano, são gerados por diversas fontes:

águas doces, liberações geológicas, animais selvagens, térmitas ou cupins e permafrost (OLHOFF,2021).

Em 2019, no Brasil houve o aumento de 9,6% nas emissões brutas de gases de efeito estufa (GEE) quando comparado ao ano anterior, lançando 2,17 bilhões de toneladas de dióxido de carbono equivalente (CO₂). Acredita-se que este fato teve a contribuição da extinção do Ministério do meio ambiente e da Secretária de Mudança do Clima e Florestas, que ocasionou uma redução no monitoramento da emissão de gases do efeito estufa (ANGELO; RITTIL, 2019).

Em 2021 o Brasil ocupou o sétimo lugar como emissor de gases de efeito estufa, sendo responsável por 3% do total mundial (2,4 bilhões de toneladas brutas) (SEEG, 2022). A agropecuária contribui para o total de emissões de GEE com cerca de 601 milhões de toneladas de CO₂ equivalente e 14,54 milhões de toneladas de metano (MtCH₄). O setor pecuário é responsável por 91,6% das emissões de metano (13,32 MtCH₄) que tem origem fermentação entérica e eructação do rebanho bovino. O manejo e dejetos dos animais também contribui com 5,8% das emissões (0,85 MtCH₄). O Brasil é o quinto maior emissor de metano no mundo, em 2020 o país emitiu cerca de 5,5 % de CH₄ (21,7 MtCH₄) (SEEG, 2022).

A nível global, o rebanho bovino produz cerca de 30% da produção mundial de metano (2,1 Gt de CH₄ equivalente) pela via entérica e o rebanho de pequenos ruminantes como ovinos e caprinos são responsáveis por 0,26 Gt de CH₄ equivalente (FAO, 2016).

1.3 LEIS QUE REGULAMENTAM AS EMISSÕES DE GASES DO EFEITO ESTUFA

No Brasil há leis ambientais que regulamentam as emissões de gases do efeito estufa, a Lei n. ° 12.187, de 29 de dezembro de 2009, Art. 2.º parágrafo VII prevê a mitigação: mudanças e substituições tecnológicas que reduzam o uso de recursos e as emissões por unidade de produção, bem como a implementação de medidas que diminuam as emissões de gases de efeito estufa e aumentem os sumidouros (BRASIL, 2009).

Além disso, conforme a Lei n. ° 12.187, de 29 de dezembro de 2009, Art. 12 para alcançar os objetivos da Política Nacional sobre Mudança do Clima (PNMC), o País adotou, como compromisso nacional voluntário, ações de redução das emissões de gases

de efeito estufa, com vistas em diminuir entre 36,1% e 38,9% suas emissões projetadas até 2020 (BRASIL, 2009).

Já o Decreto N.º 11.075, de 19 de maio de 2022, Art. 7º, decreta que o Mercado Brasileiro de Redução de Emissões constitui mecanismo de gestão ambiental e será instrumento de operacionalização dos Planos Setoriais de Mitigação das Mudanças Climáticas, para atuar como ferramenta à implementação dos compromissos de redução de emissões mediante a utilização e transação dos créditos certificados de redução de emissões (BRASIL, 2022).

O acordo de Paris foi adotado na 21ª Conferência das Partes (COP21) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas em inglês, United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC). Seu objetivo é manter o aumento da temperatura média global abaixo de 2 °C e envidar esforços para limitar o aumento da temperatura a 1,5 °C acima dos níveis pré-industriais (NATIONS, 2015).

A contribuição nacionalmente determinada (iNDC) do Brasil comprometeu-se a reduzir as emissões de gases de efeito estufa em 37% abaixo dos níveis de 2005, até 2025. Além disso, o país se comprometeu com uma contribuição indicativa subsequente de reduzir as emissões de gases de efeito estufa em 43% abaixo dos níveis de 2005, até 2030 (BRAZIL, 2015). O Brasil, em 2021, durante a 26ª Conferência do Clima da Organização das Nações Unidas (ONU), a COP 26, assumiu o compromisso de reduzir 30% das emissões de metano até 2030, assim como os EUA e a União Europeia anunciaram, na Assembleia Geral da ONU de 2021, o Compromisso Global do Metano (SEEG, 2023).

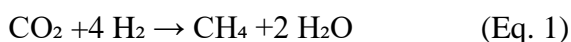
1.4 PRODUÇÃO DE METANO POR ANIMAIS RUMINANTES

A quantidade de metano entérico liberado pelo animal está diretamente relacionada à quantidade de alimento ingerido (tipo e qualidade da dieta consumida) influenciado pelo peso do animal, nível de produtividade, estado reprodutivo e fatores ambientais (FAO, 2016). Quanto à produção de metano pelos ruminantes, as técnicas atuais apontam que a maior parte da produção de CH₄ é realizada no retículo-rúmen, já as emissões retais representam de 2 a 3% do total das emissões (MUNÕZ et al., 2012).

A formação desses gases como o metano é oriundo principalmente da fermentação entérica de ruminantes. Os ruminantes são um dos diversos grupos de herbívoros mais

bem-sucedidos do planeta, este sucesso só é possível pela relação única entre hospedeiro e microbiota. O rúmen abriga uma complexa identidade de microrganismos como: bactérias, arqueias e eucariotos, favorecendo a adaptação desses ruminantes em ecossistemas diversificados (HENDERSON et al., 2015; MOMBACH, et al., 2016).

O metano de ocorrência natural é produzido principalmente pelo processo de metanogênese representado pela equação 1 (HOOK et al., 2010).



Este processo ocorre durante a digestão dos animais ruminantes quando estão sob condições de anaerobiose. A metanogênese é mediada pela ação dos microrganismos como bactérias Archaeas, fungos e protozoários ciliados, são chamados também de metanogênicos (GOIS et al., 2019). Os principais produtos da fermentação entérica são os ácidos graxos voláteis (AGV), propionato, butirato e acetato. Podem ser formados também formato, etanol, lactato, succinato, ácidos graxos de cadeia ramificada, dióxido de carbono, hidrogênio e amônia (JANSSEN, 2010). Durante a fermentação microbiana dos alimentos, o gás hidrogênio é utilizado como fonte de energia pelas arqueias metanogênicas que produzem metano. Por isso o H₂ possui um papel central na fermentação ruminal, já que os metanogênicos que utilizam o hidrogênio são importantes na nutrição animal e função ruminal (HUNGATE, 1967; HUNGATE et al., 1970; JANSSEN; KIRS, 2008; JANSSEN, 2010).

Segundo Janssen (2010) a inibição parcial dos microorganismos metanógenos resulta em concentrações mais elevadas de H₂ levando a uma menor formação de metano e maior formação de propionato. Este fato demonstra que a concentração de H₂ tem influência na termodinâmica da fermentação ruminal (JANSSEN, 2010).

A adaptação bem-sucedida de ruminantes em ecossistemas diversificados, deve-se ao hologenoma, que é a formação de uma entidade biológica única na qual o hospedeiro e seus microrganismos associados constroem uma interação. Essa atuação conjunta pode afetar o desenvolvimento, crescimento, comportamento, adequação do organismo e aptidão geral (ROSENBERG; ROSENBERG, 2016; REGITANO; OLIVEIRA; ANDRADE, 2021).

Os principais fenótipos como a eficiência alimentar e a emissão de metano, estão associadas às interações entre o hospedeiro e suas comunidades microbianas associadas, conhecida como microbiota. Portanto, o estudo destes é essencial para o desenvolvimento da indústria de carne e a redução do seu impacto ambiental (GUAN et al., 2018; CHANG et al., 2018; MUDADU et al., 2016; PSZCZOLA et al., 2018; CHANG et al., 2019; LASSEN; DIFFORD, 2020; ANDRADE et al., 2022).

1.5 ESTRATÉGIAS PARA A MITIGAÇÃO DE METANO

A necessidade de estratégias para melhorar o uso dos recursos naturais surgiu pela demanda intensa por produtos pecuários. Soluções, tais como, alterações na dieta combinadas à seleção e identificação genética de animais, podem promover uma maior produtividade com um consumo menor de recursos naturais e menores emissões de gases. (MOORE; MUJIBI; SHERMAN, 2009; WANAPAT et al., 2015; ROJAS et al., 2017).

O principal caminho para a mitigação de metano entérico são a manipulação da dieta e de aditivos alimentares estes favorecem a menor intensidade de emissão de CH₄. Estas metodologias proporcionam melhorias na eficiência alimentar e na produtividade do animal, afetando também a quantidade de nitrogênio e matéria orgânica fermentável na urina e nas fezes (GERBER et al., 2013).

Muitas pesquisas foram realizadas para avaliar a eficiência alimentar e mitigar a emissão de metano pelos ruminantes. Os estudos são direcionados para múltiplos tecidos, rúmen, fezes e no fígado (DE HAAS et al., 2017; LOVENDAL et al., 2018; ARTEGOITIA et al., 2019; FISCHER; EDOUARD; FAVERDIN, 2020; FITZSIMONS et al., 2013; MCDONNELL et al., 2016; OLIJHOEK et al., 2018; FLAY et al., 2019; RENAND et al., 2019; VELAZCO et al., 2017; MANZANILLA-PECH et al., 2021; DE HAAS, et al. 2021; MALHEIROS et al. 2021). Há ainda estratégias de mitigação de metano (Tabela 1) que são avaliadas por diferentes condições isoladas (DOS SANTOS; DUARTE, 2019).

Tabela 1- Estratégias de mitigação de metano e alterações metabólicas no organismo dos ruminantes

Estratégia	Alterações metabólicas	Autor
Aumento da produtividade dos animais	Baixa produção de CH ₄ /kg de leite ou carne produzido	Pickering et al. (2016) Roehe et al.(2016)
Melhora na qualidade e utilização dos alimentos	Aumento na produção de propionato e redução na produção de H ₂	Rira et al. (2016) Homem-Junior et al.(2017)
Aumento de concentrados na dieta	Aumento na produção de propionato e utilização de H ₂ em outras rotas metabólicas	Cota et al. (2014) Wallace et al. (2014)
Aumento de fibra na dieta	Redução da expressão de genes envolvidos na metanogênese	Nathani et al.(2015)
Defaunação	Redução da população de protozoários no rúmen e redução da concentração de H ₂	Martin et al. (2016) Nguyen; Li e Hegarty (2016)
Extratos de plantas	Redução da população de protozoários no rúmen, redução da concentração de H ₂ e aumento na produção de propionato	Li et al. (2016) Piñeiro Vázquez et al. (2015).

Fonte: Dos Santos; Duarte (2019).

Segundo Knapp e colaboradores (2014), a alteração na dieta de ruminantes que reduz a produção de propionato resulta em uma maior produção de metano por unidade do alimento fermentado. Isto ocorre por diversos fatores como a composição da matéria vegetal mais facilmente degradável, açúcares livres produzem mais propionatos quando fermentados em comparação com as fibras, níveis elevados de carboidratos solúveis em água também resultam em maior produção de propionato comparados com outros ácidos graxos voláteis (ARMSTRONG, 1964; CORBETT et al., 1966; DEMEYER, 1975; PEYRAUD ASTIGARRAGA, FAVERDIN, 1997; LEE et al., 2002; TAWHEEL et al., 2005; JANSSEN, 2010). Os animais ruminantes alimentados com uma dieta de grãos produzem mais propionato do que os animais alimentados com uma dieta a base de forragens (BAUMAN; DAVIS; BUCHOLTZ, 1971, MOSS; GIVENS; GARNSWORTHY, 1995, VAN KESSEL; RUSSELL, 1996; BEAUCHEMIN; MCGINN, 2005; CHRISTOPHERSEN; WRIGHT; VERCOE, 2008; JANSSEN, 2010).

As dietas compostas por misturas de forragens e grãos resultam em uma produção de propionato equivalente a produzidas apenas por forragens, ou seja, uma diferença significativa é encontrada se os grãos constituírem a maior parte da dieta (BLAXTER; WAINMAN, 1964; CHRISTOPHERSEN et al., 2008; JANSSEN, 2010). Para avaliar a

produção de metano em relação ao consumo de ração é imprescindível monitorar as associações entre o fenótipo escolhido e outras características, tais como, longevidade, produção, fertilidade e peso (JANSSEN, 2010).

1.6 CIÊNCIAS ÔMICAS PARA COMPREENDER O METABOLISMO DOS RUMINANTES

As ciências ômicas é o campo de estudo que busca compreender o comportamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. As principais classes das ciências ômicas são: genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica. O termo metabolômica do inglês *metabolomics*, foi introduzido em 2001, por Oliver Fiehn. Este pesquisador definiu a metabolômica como uma análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico (FIEHN, 2002; CANUTO et al., 2018).

Metaboloma é o conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da), presentes em um sistema biológico, esteja ele em homeostase ou alterado por estímulos fisiopatológicos. Estão incluídos no metaboloma lipídios, aminoácidos, ácidos orgânicos, hormônios, minerais, vitaminas, nucleotídeos, xenobióticos, como drogas contaminantes e aditivos alimentares (KOHLENER et al., 2022). A metabolômica analisa a atividade dos metabólitos, investigando a atividade do metabolismo celular e dos organismos para possível identificação de biomarcadores. Esta ciência ômica recorre a técnicas de química analítica de ponta e de métodos computacionais avançados para caracterizar uma mistura bioquímica complexa (OLIVER *et al.*, 1998; JOHNSON.; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016; CANUTO, *et al.*, 2018). Isto ocorre porque a análise do metaboloma é considerada complexa, por apresentar uma diversidade de compostos com múltiplas isoformas e propriedades físico-químicas diversificadas.

A metabolômica se classifica como *targed* e *untarged*, a metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*) é definida como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de determinada classe química, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas. Já a metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*) se baseia na análise qualitativa do maior número de metabólitos possível, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo e oferece a oportunidade de descoberta de novos biomarcadores (ROBERTS et al., 2012; CANUTO et al., 2018). Os biomarcadores podem ser definidos como um indicador que

demonstra o estado médico de uma pessoa ou animal, medido com precisão e reprodutibilidade (STRIMBU; TAVEL,2010). Também podem ser definidos como indicador de estados fisiológicos e características genéticas e demonstra as alterações celulares, bioquímicas em matrizes biológicas, sejam tecidos, células ou fluidos (ZAMORA-OBANDO et al., 2022).

Diversas pesquisas demonstram a utilização da abordagem metabolômica, como uma forma eficiente para entender mais sobre o metabolismo dos animais ruminantes, assim como os biomarcadores envolvidos (WENK, 2010; CHEN et al., 2017; YANG; HAN, 2016; TRIVEDI et al., 2016; ARTEGOITIA et al., 2019; MALHEIROS et al., 2021). Um dos metabólitos mais importantes para os animais ruminantes são os, ácido acético, propiônico e butírico, bem como o derivado β -hidroxibutírico. Estes metabólitos são ácidos graxos voláteis, conhecidos como AGV e são constituídos por 1 a 5 carbonos. São hidrossolúveis em consequência do seu tamanho, estão presentes no rúmen em alta quantidades como produto da digestão de glicídios (GONZALEZ; SILVA, 2017).

O trabalho de Malheiros e pesquisadores (2023) que analisou os metabólitos ruminais e fecais associados à eficiência alimentar, consumo de água e emissão de metano em touros Nelore ao utilizarem diferentes intervenções nutricionais no confinamento: convencional (Conv; n = 26) e subproduto (ByPr, n = 26). Observaram 38 fluidos ruminais e 27 metabólitos fecais que foram significativamente diferentes entre as dietas, demonstraram que o grupo convencional apresentou menores valores para os fenótipos consumo individual de matéria seca (CMS), consumo residual de ração (CAR), consumo de água observado (IAO), consumo previsto de água (IA) e consumo de água residual (ICR). Enquanto o grupo subproduto apresentou menor emissão de metano (EM). Além disso, os fenótipos de consumo de água foram associados pela primeira vez a metabólitos ruminais, como acetona, aspartato, colina e dimetilamina em touros Nelore.

O fígado é um importante órgão metabólico em ruminantes, normalmente consumindo 24 % da energia de todo o corpo, embora corresponda entre 1 a 1,3 % do peso corporal (KEOGH et al., 2016 HIGGINS et al., 2019). O estudo do metaboloma do fígado é fundamental, pois esse órgão está diretamente relacionado à fisiologia metabólica geral e balanço energético dos ruminantes. Uma de suas principais funções é sintetizar a glicose com o ácido propiônico e regular o metabolismo de lipídios (oxidação

e síntese). Além disso, confere informações importantes sobre as condições fisiopatológicas e metabólicas dos animais. Alterações nas dietas dos animais ruminantes provocam diferenças significativas neste órgão (WHITE et al., 2016; NAYERI; STOTHARD; TISSUES, 2016; KIM et al., 2022).

1.7 RMN APLICADA EM METABOLÔMICA

As principais técnicas envolvidas na identificação e quantificação de metabólitos são a espectrometria de massas (MS) acoplada a cromatografia gasosa (GC-MS) e a cromatografia líquida (LC- MS), e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (WISHART, 2016; CANUTO et al., 2017).

A RMN é uma ferramenta muito bem estabelecida na identificação estrutural e análises quantitativas de compostos em uma amostra. A técnica está fundamentada na análise do comportamento da relaxação do *spin* nuclear de certos átomos após um pulso de radiofrequência quando estes estão alinhados à um intenso campo magnético. A relaxação do *spin* nuclear é dependente do ambiente químico onde cada núcleo se encontra, possibilitando assim a obtenção de um espectro contendo os sinais dos núcleos magneticamente distintos (PAVIA, 2010; DUNN et al., 2011; LIU; LOCASALE, 2017). A técnica de RMN é não destrutiva e não requer etapas adicionais de derivatização o que pode ser considerado como uma vantagem sobre as demais metodologias refletindo em uma alta reprodutibilidade. Além disso, a RMN é uma ferramenta útil e poderosa para a metabolômica quantitativa não direcionada. Este fato se deve à quantificação tanto dos metabólitos conhecidos (abundantes) quanto os desconhecidos em uma única medida da amostra contendo uma mistura complexa (GOWDA; RAFTERY, 2015; BINGOL; BRÜSCHWEILER, 2014; BINGOL et al. 2016; MARKLEY et al., 2017; EMWAS et al., 2019; CROOK; POWERS, 2020; EDISON et al., 2020).

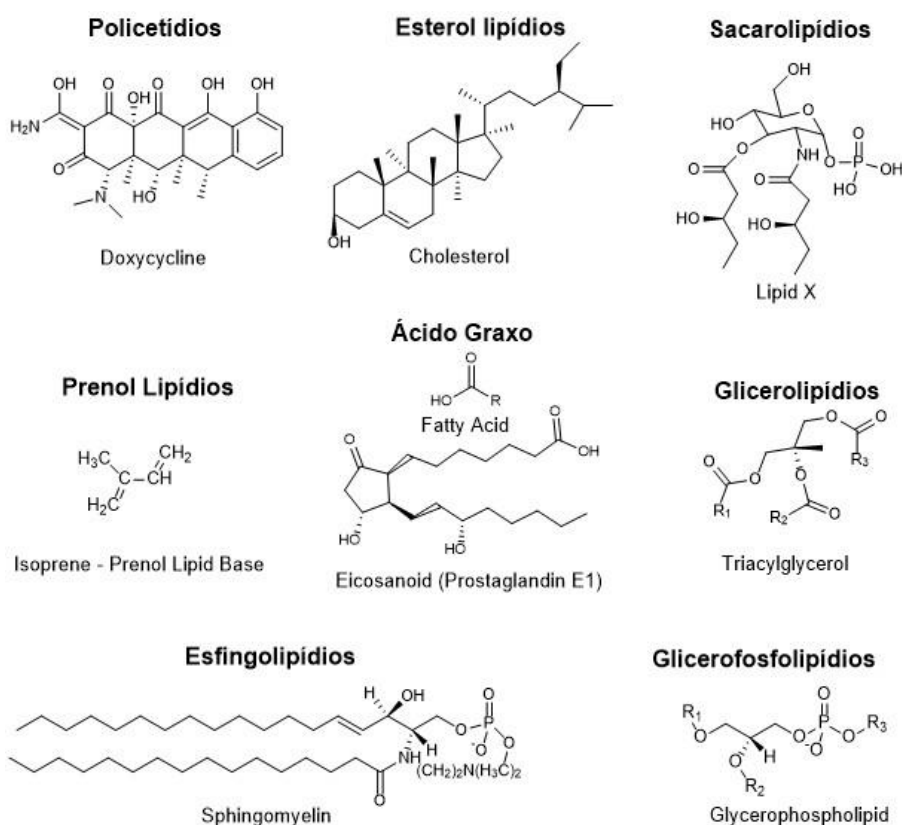
1.8 LIPIDÔMICA

A análise dos lipídios do fígado bovino possibilita o estudo da relação entre o metabolismo com o estado nutricional. Obtendo-se informações sobre disfunções metabólicas (ex. obesidade), alterações hormonais entre outros. Desta forma é possível conduzir estudos através da lipidômica, que é uma abordagem metabolômica direcionada à análise abrangente de lipídios em sistemas biológicos.

A lipidômica tem se desenvolvido nos últimos anos devido à recentes estudos que relacionam os lipídios à regulação de funções celulares e mecanismo de doenças (SETHI; BRIETZKE, 2017). A metodologia analítica aplicada à lipidômica busca avaliar em diferentes matrizes celulares, as espécies fundamentais da classe de lipídios, analisando sua estrutura, função no sistema biológico. Assim como suas variações e relações a determinadas condições fisiopatológicas (HAN et al., 2012; VERGARA et al., 2014; VIRGILI et al., 2018).

Atualmente a lipidômica tem como alvo de investigação oito grupos diferentes de lipídios: ácidos graxos, glicerofosfolipídios e/ou fosfoglicerídeos, glicerolipídios, esfingolipídios, lipídios esterol, lipídios prenol, sacarolipídios e policetídeos (GRIFFITHS; WANG, 2009). As oito classes de lipídios estão representadas na figura 1.

Figura 1- Representação de classes de lipídios



Fonte: Adaptado de Stephenson et al. (2017).

Os lipídios são componentes fundamentais de membranas biológicas, apresentam-se como uma classe de moléculas estrutural e funcionalmente diversa. Estes são

classificados como anfifílicos ou hidrofóbicos que dependem da sua biossíntese e de sua estrutura química (SETHI et al., 2017). Uma das ferramentas indispensáveis na pesquisa moderna quando o objetivo é estudar lipídios é a espectrometria de massa (MS) de dessorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI) pois é rápida, sensível, tolera impurezas da amostra e fornece espectros sem grande fragmentação do analito (CHATTERJEE et al., 2018; ENGEL et al., 2022).

1.9 MALDI TOF/MS APLICADO NA ÁREA DE LIPIDÔMICA

O processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), utiliza uma matriz composta majoritariamente por um ácido orgânico, que fornece um próton para o processo de ionização da amostra. Este próton absorve a energia emitida por um laser e desencadeia o fenômeno de retirada de substâncias absorvidas ou adsorvidas, possibilitando a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso (TANAKA et al., 1988). Um campo eletrostático é aplicado à um tubo sob vácuo causando a aceleração da amostra ionizada até atingir o detector. O tempo necessário para amostra atingir o detector é chamado de tempo de voo (Time of Flight, sigla em inglês TOF) (TANAKA et al., 1988). O MALDI MS, se baseia na utilização de um feixe de laser pulsado que atinge a amostra presente na forma co-cristalizada. A energia absorvida pela matriz que está presente em grande excesso (de 100 a 100.000 vezes) sobre o analito. Conseqüentemente, a matriz é vaporizada, transportando moléculas intactas do analito para a fase gasosa (ENGEL et al., 2022). Quando ocorre a expansão desta nuvem de gás, íons como Na^+ e H^+ são trocados entre matriz e o analito. Este processo gera íons do analito chamados de adutos. Após serem acelerados no campo elétrico, estes passam por uma grade carregada sendo separados em um analisador de massa TOF com base em seu m/z (ZAMBONI, 2021; ENGEL et al., 2022).

As matrizes, comumente utilizadas no MALDI para a análise de lipídios são o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) estas fornecem os resultados ideais em relação à sensibilidade alcançável, resolução e a extensão da fragmentação observada (LEOPOLD et al., 2018).

Os avanços na espectrometria de massa impulsionam o campo da lipidômica já que na análise espectrométrica de massa há três fenômenos: ionização do analito, separação de íons dependente da massa e detecção de íons. Esta separação pode ser

realizada por vários tipos de espectrômetros de massa como quadrupolos, setores magnéticos e/ou elétricos ou ressonância ciclotron de íons com transformada de Fourier (FTICR) e tempo de voo ou TOF (SETHI et al., 2017). Abaixo uma tabela (Tabela 2) demonstrando as vantagens e desvantagens das técnicas de MALDI –TOF/MS e RMN aplicada em lipidômica.

Tabela 2- Abordagens experimentais na área de lipidômica

Abordagem experimental	Área de lipídios cobertas	Vantagens	Desvantagens
RMN por H ¹	Todos os lipídios	Medição direta; não destrutivo; técnica poderosa para análise estrutural de compostos purificados	Baixa sensibilidade, espectros dominados por lipídios muito abundantes (colesterol, fosfatidilcolina).
RMN por P ³¹	Fosfolipídios	Medição direta; não destrutivo; quantitativo	Ampliação da linha de lipídios em soluções aquosas; baixa sensibilidade
Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)	Muitos lipídios, incluindo glicolipídios complexos.	Detecção direta por m/z ; contaminantes tampão e salinos geralmente bem tolerados; pode ser combinado com separação prévia por TLC.	Supressão da ionização, nomeadamente no caso de extratos brutos e quando se pretendem analisar espécies de baixa abundância; fundos de matriz.

Fonte: Adaptdo de Sethi, S., & Brietzke, E. (2017).

O RMN é uma ferramenta poderosa para identificar a estrutura e as interações lipídicas, no entanto, esta técnica apresenta baixa sensibilidade quando comparada ao MS. Outra desvantagem do RMN, é a dificuldade para interpretar os espectros obtidos principalmente em amostras complexas compostas por lipídios abundantes (colesterol, fosfatidilcolina) ocasionando a sobreposição de sinais (ROLIM et al., 2015; SETHI et al., 2017).

1.10 QUIMIOMETRIA AVANÇO TECNOLÓGICO PARA TRATAMENTO DE GRANDE CONJUNTO DE DADOS

A modernização dos instrumentos permite aos pesquisadores adquirirem um grande conjunto de dados de maneira fácil e mais automatizada, e quando mais de uma grandeza é medida para cada amostra, ou seja, composto por mais de uma variável, é possível defini-lo como um conjunto multivariado (IANNUCI, 2021). Um problema com

os dados multivariados está na dificuldade de observação de padrões (MILLER; MILLER, 2018).

O termo “*kemometri*” foi usado pela primeira vez em 1971, pelo cientista sueco Svant Wold que em inglês equivale a *chemometrics* e em português a quimiometria. A quimiometria pode ser definida como a ciência que descreve a interação de métodos estatísticos e matemáticos em processos químicos (KIRALJ; FERREIRA.,2006; KUMAR et al., 2014). Desta forma, a quimiometria surgiu como uma ferramenta para atender as necessidades de se estudar técnicas químicas que tinham uma maior complexidade nas medições e obtinham um maior conjunto de dados como espectrometria, espectroscopia, cromatografia (FERREIRA, 2015).

1.10.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta eficaz, por reduzir a dimensionalidade dos dados, facilitando a identificação de tendências e padrões no conjunto de dados. Isto ocorre, pois, a PCA consegue reduzir a quantidade de dados com alta correlação. Vale ressaltar que não é uma técnica útil se as variáveis não estiverem correlacionadas (MILLER, 2018). A PCA transforma um conjunto de dados com variáveis correlacionadas em um conjunto de componentes principais não correlacionados (PCs), obtidos como combinação linear de variáveis iniciais. As PCs são calculadas de forma que a parcela máxima da variância seja explicada pelo primeiro componente principal e, progressivamente, parcelas menores da variância sejam explicadas por cada componente subsequente (BRERETHON et al., 2017). A informação em um conjunto de dados determinado corresponde a variação total que ele contém, desta forma o objetivo da PCA é identificar componentes principais na qual a variação dos dados é máxima. Os componentes principais são conjuntos de dados com poucas variáveis novas que expressam as principais informações da tabela de dados multivariados (KASSAMBARA, 2017).

1.10.2. ANÁLISE DISCRIMINANTE DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLSDA)

A análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é um método de discriminação multivariada de dados com aplicações nas diferentes áreas das ciências

ômicas. A razão entre o número de amostras (**n**) e o número de variáveis (**m**) afeta o desempenho aparente do PLS-DA e o número de relações espúrias encontradas (ZONTOV, 2020; RUIZ-PEREZ, 2020)

A modelagem preditiva da análise discriminante de quadrados mínimos parciais abrange dois procedimentos principais: construção das PLS e ou redução da dimensão; construção do modelo de predição e ou análise discriminante (LEE; LIONG; JEMAIN, 2018). A análise desenvolvida no modelo da PLS-DA é a correlação do conjunto de treinamento X com um vetor Y na qual indica se a amostra pertence à classe correta (classe 1) ou às demais classes (valor 0). Após a otimização do modelo, um limite de discriminação (DT) é estimado baseado na dispersão dos valores de classe estimados obtidos para o conjunto de dados de treinamento com o efeito de minimizar a ocorrência de erros falso negativos e falso positivos (DUARTE et al., 2022). A PLS-DA transforma as variáveis categóricas em variáveis contínuas (ou seja, +1 e 0) e então calcula as variáveis latentes (LVs) para ajustar a fim de explorar a covariância na classificação binária, (LEE; LIONG; JEMAIN, 2018).

Na PLS-DA os algoritmos de cálculo fornecem diversas informações utilizadas para interpretar a importância e diferenças entre amostras variáveis, para avaliar e comparar modelos (DE QUEIROZ et al., 2022). Diante disto, é muito importante realizar as análises estatísticas descritas. Pois, estas são ferramentas essenciais que extraem informações relevantes dos dados. As análises multivariadas PCA (método não supervisionado) e PLS-DA (método supervisionado) conseguem classificar e discriminar os metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras realizadas pela avaliação do conjunto da matriz dos dados extraídos. Já nas análises univariadas os metabólitos são avaliados separadamente, os testes geralmente utilizados são a ANOVA, teste t de Student ou de Mann-Whitney U (CANUTO et al., 2018).

As ciências ômicas associadas a quimiometria e bioinformática é uma ótima ferramenta para compreender melhor sobre o metabolismo dos ruminantes. Como demonstra o trabalho de Alexandre e pesquisadores (2015) que descobriram que quando os bovinos Nelores possuem baixa eficiência alimentar (precisam consumir uma maior quantidade de comida para ganhar peso) pode estar relacionado a lesões no fígado.

Diante do exposto, este trabalho visa estudar as alterações das dietas de bovinos, e seu impacto no metabolismo destes, em especial o fígado. Busca-se identificar biomarcadores que estejam associados a mitigação de metano em bovinos. Para isso, utiliza-se uma investigação baseada em metabolômica global e lipidômica alvo. Assim, espera-se identificar e quantificar os metabólitos e contribuir com o hologenoma nelore.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é aplicar a metabolômica para compreender como alterações na alimentação podem influenciar o metaboloma do fígado de bovinos da raça Nelore, além de auxiliar na identificação de biomarcadores relacionados à mitigação da emissão de metano.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Identificar, quantificar e caracterizar o perfil de compostos apolares no fígado de bovinos Nelore por MALDI-TOF/MS
- Identificar, quantificar e Caracterizar o perfil de compostos polares no fígado de bovinos Nelore RMN H¹
- Correlacionar os dados obtidos de compostos polares e apolares com os fenótipos de emissão de metano para contribuir com a construção do Hologenoma dos animais;

3. METODOLOGIA

Para a realização do estudo, todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme os princípios éticos de bem-estar animal e abate humanitário adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da EMBRAPA, São Carlos, São Paulo (Protocolo n. ° 09/2016).

3.1 PRODUÇÃO DE ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRA

A obtenção das amostras biológicas e dados fenotípicos foram provenientes de 52 bovinos machos não castrados da raça Nelore (*Bos indicus*), nascidos no ano de 2014, abatidos em 2016 e provenientes de um grupo de progênies de 28 touros Nelore

comerciais com média de 1,78 filhos/touro. Para a realização do estudo os ruminantes foram confinados no Confinamento Experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos -SP, para serem avaliados durante todo o processo, este trabalho parte do Projeto de Pesquisa universal intitulada Pegada Hídrica dos Produtos de Carne e Leite (Processo CNPQ 40423/2013-4) que é coordenado pelo Dr. Júlio César Palhares.

Estes animais tinham em média de $329,5 \pm 34,2$ kg de peso corporal inicial e idade entre 20 e 21 meses, foram alocados em dois currais coletivos (dois grupos), durante 105 dias, sendo os primeiros 15 exclusivamente para adaptação animal, seguidos das fases de crescimento e terminação. Um grupo recebeu a dieta convencional e os outros animais receberam uma dieta de subprodutos composta por silagem de milho (72,8%), farelo de soja (3,06%), grãos de milho (21,4%), gordura protegida (1,19%), uréia (0,59%) e Confinatto N235 Agrocerec Multimix® (0,91%), duas vezes ao dia. As dietas de subprodutos da indústria agropecuária são uma alternativa diminuir os recursos hídricos, minimizando o uso desse recurso natural. Abaixo a tabela 2 e 3 especificando sobre as dietas experimentais.

Tabela 3 – Composição da dieta convencional de bovinos nelores confinados na Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos.

DIETA CONVENCIONAL			
<i>Ingredientes (% MS)</i>	<i>Fase 1 Adaptação</i>	<i>Fase 2 Crescimento</i>	<i>Fase 3 Finalização</i>
Silagem de milho	89,1	81,8	72,8
Milho	3,93	11,79	21,44
Farelo de soja	0,56	1,68	3,06
Gordura protegida	0,22	0,65	1,19
Confinatto N2351	0,17	0,5	0,91
Uréia	0,11	0,32	0,59
Farelo de soja	5,9	3,3	-

Fonte: autoria própria

Tabela 4 – Composição da dieta de subproduto de bovinos nelores confinados na Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos.

DIETA DE SUBPRODUTO			
<i>Ingredientes (% MS)</i>	<i>Fase 1 Adaptação</i>	<i>Fase 2 Crescimento</i>	<i>Fase 3 Finalização</i>
Silagem de milho	82,3	73,0	57,3
Gérmen de milho	6,68	12,6	22,59
Polpa cítrica	4,13	7,79	13,96
Farelo de amendoim	1,39	2,62	4,7
Confinatto N2351	0,34	0,64	1,15
Uréia	0,09	0,17	0,3
Farelo de amendoim	5,1	0,6	-

Fonte: autoria própria

3.2 AVALIAÇÃO DE PESO DIÁRIO E CONSUMO DE MATÉRIA SECA

A unidade de referência possui sistemas automáticos de alimentação GrowSafe® (GrowSafe Systems Ltd., Airdrie, Alberta, Canadá) e dessedentação (Intergado) que foram utilizados para coletar automaticamente dados de emissão de metano ao longo do período de confinamento.

3.3 COLETA DE AMOSTRAS

Os animais foram enviados para ao abate com o peso final de aproximadamente $477,3 \pm 41,5$ Kg aos 23 e 24 meses de idade, foi realizado de acordo com as diretrizes do *Humane Slaughter of Cattle.*, após a fase de finalização durante o abate as amostras de fígado foram coletadas de cada animal, imediatamente imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em -80 °C para a realização dos ensaios metabólicos. As amostras foram separadas em grupos experimentais de acordo com a dieta administrada ao longo do período de confinamento levando se em consideração a emissão de metano alta ou baixa emitidas por estes animais. Desta forma, foram analisadas um total de 24 amostras sendo 12 da dieta convencional (6 alta emissão e 6 baixa emissão) e 12 da dieta de subproduto (6 alta emissão e 6 baixa emissão). A Tabela 5 apresenta as amostras analisadas por RMN de H^1 com os respectivos dados de emissão de metano residual (RME).

Tabela 5-Classificação das amostras de fígado de bovinos de nelores e os valores de emissão de metano residual por cada ruminantes.

Código das amostras	Grupo	RME GC	Código das amostras	Grupo	RME GC
NB01	Conv_low	-33.072	NB27	Conv	14.102
NB02	Conv_low	-18.611	NB28	Sub	-16.897
NB03	Conv_low	-16.21	NB29	Sub	-13.759
NB04	Conv_low	-15.819	NB30	Sub	-18.101
NB05	Conv_low	-10.864	NB31	Sub	5.079
NB06	Conv_low	-8.886	NB32	Sub	-15.424
NB07	Conv_high	45.01	NB33	Conv	15.034
NB08	Conv_high	45.026	NB34	Sub	-15.99
NB09	Conv_high	59.324	NB35	Sub	8.76
NB10	Conv_high	23.339	NB36	Sub	-21.638
NB11	Conv_high	30.205	NB37	Conv	1.669
NB12	Conv_high	31.592	NB38	Conv	9.535
NB13	Sub_low	-62.475	NB39	Conv	19.285
NB14	Sub_low	-35.414	NB40	Conv	6.444
NB15	Sub_low	-34.527	NB41	Sub	9.092
NB16	Sub_low	-30.559	NB42	Sub	-6.013
NB17	Sub_low	-29.813	NB43	Conv	-3.233
NB18	Sub_low	-22.234	NB44	Conv	19.929
NB19	Sub_high	14.929	NB45	Conv	-1.812
NB20	Sub_high	16.356	NB46	Conv	15.489
NB21	Sub_high	43.762	NB47	Conv	-7.548
NB22	Sub_high	10.465	NB48	Sub	-8.572
NB23	Sub_high	11.353	NB49	Sub	0.978
NB24	Sub_high	11.354	NB50	Conv	-2.975
NB25	Conv	-2.371	NB51	Sub	-13.343
NB26	Conv	-7.87	NB52	Sub	5.92

Fonte: autoria própria (2023).

3.4 ANÁLISE METABOLÔMICA

3.4.1 Extração e Preparo de amostras

Para a análise de compostos polares e apolares, utilizou-se a metodologia descrita por Bacil et al. (2023). As amostras de fígado bovino dos 24 animais armazenadas em -80 °C foram colocadas em tubo de homogeneização livres de RNase e DNase de 2ml contendo grânulos de cerâmica com diâmetro de 1,4 mm (matriz D, MP Biomedicals, EUA).

Primeiramente 200 mg de amostras de fígado bovino foram utilizadas para a extração com 300 µL de clorofórmio, metanol, água destilada (1:2:1 v/v), a solução de extração foi adicionada a cada tubo e os tecidos foram então homogeneizados em um homogeneizador FastPrep-24 (MP Biomedicals, EUA) em dois ciclos a 4 m/s por 30 s com intervalo de pausa de 30 s entre os ciclos.

Após a homogeneização das amostras adicionou-se 200 µL de clorofórmio para separação de fases e centrifugou-se a 4 °C e 1500×g por 15 min, nesta etapa houve a separação das fases correspondendo às amostras polares e apolares, a fase aquosa hidroalcolica foi coletada e concentrada em um SpeedVac Vacuum Concentrator (Thermo Fisher Scientific, EUA) e armazenada a -80 °C até as análises metabolômicas. Já a fase orgânica foi coletada e concentrada em Speed Vacuum concentrator e armazenada a -80°C até as análises lipidômicas.

3.4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear por ¹H.

Os espectros de RMN foram obtidos a 298 K em um espectrômetro Agilent DD2 de 500 MHz (11,7 T) com uma sonda One RMN de 5 mm com capacidade de gradiente. Os espectros foram adquiridos para RMN de prótons usando a sequência de pulso PRESAT para a supressão do sinal de água residual, 32 K pontos de dados, com uma largura espectral de 14 ppm, com um tempo de aquisição de 4,0 s, foram adquiridos com um ganho fixo do receptor de 26 e um atraso de reciclagem de 20 s (5*T1), varreduras fictícias de 2 e um acúmulo de 128 transientes por 52 minutos e 12 segundos por análise (BACIL et al., 2023).

Os FIDs foram multiplicados por um exponencial de 0,3 Hz utilizou se a função de multiplicação antes da transformada de Fourier. As correções de fase e linha de base

foram realizadas dentro do software do instrumento e o sinal padrão de referência (TMSP D4) foi calibrado em δ 0,00 ppm. Os espectros 1D foram atribuídos usando o software Chenomx com um banco de dados, os picos dos metabólitos foram integrados e quantificados em relação a TMSP-D4 0,5 mM usando o software Chenomx para quantificação. Após o perfil de RMN, realizou-se uma análise de enriquecimento com o MetaboAnalyst 5.0 e o Matlab R 2022a.

3.4.3 Análise de lipídios por MALDI-TOF/MS

Os perfis lipídicos das 24 amostras de fígados de bovinos Nelores, foram obtidos por espectrometria de massa utilizando a técnica de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS), usando um espectrômetro de massa Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com um laser pulsado de Nd: YAG operando na 3th harmônica (355 nm). A amostra foi misturada com uma solução de matriz compreendendo 10 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético. Posteriormente, 0,5 μ L dessa mistura foi aplicado em uma placa de análise e seco à temperatura ambiente. Os espectros de massa foram adquiridos no modo de reflexão positiva e uma frequência de laser de 2000 Hz. A calibração externa foi realizada usando uma mistura padrão de lipídios. Os dados foram adquiridos usando o software Flex Control e os espectros foram processados usando o software Flex Analysis One (Versão 3.0, Bruker Daltonics). O pacote MALDIquant no software R foi utilizado para realizar a normalização dos espectros, alinhamento de base, centralização dos picos e criou-se uma lista dos picos mais significativos do espectro bruto (valores de m/z e respectiva intensidade. A identificação dos lipídios foi realizada nos softwares online CEU mass mediator (CMM, <http://ceumass.eps.uspceu.es>) que é uma ferramenta de pesquisa de metabólitos, lipídios em diferentes banco de dados Kegg, HMDB, LipidMaps, Metlin, NP Atlas, KNApSACk, MINE e uma biblioteca interna (GIL-DE-LA-FUENTE ET AL., 2018; DA SILVA ROCHA 2023).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise uni e multivariada, assim como a identificação das vias metabólicas dos compostos polares e apolares foi realizado com o auxílio do *software* MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) e MatlabR2022a. Antes do tratamento estatístico será

realizado um pré-tratamento no Chenomx das amostras polares. As análises que serão realizadas são: Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) teste t e ANOVA de uma via seguido por pós teste de Tukey) ($p < 0.05$). Os dados serão expressos em média \pm erro padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONJUNTO DE DADOS

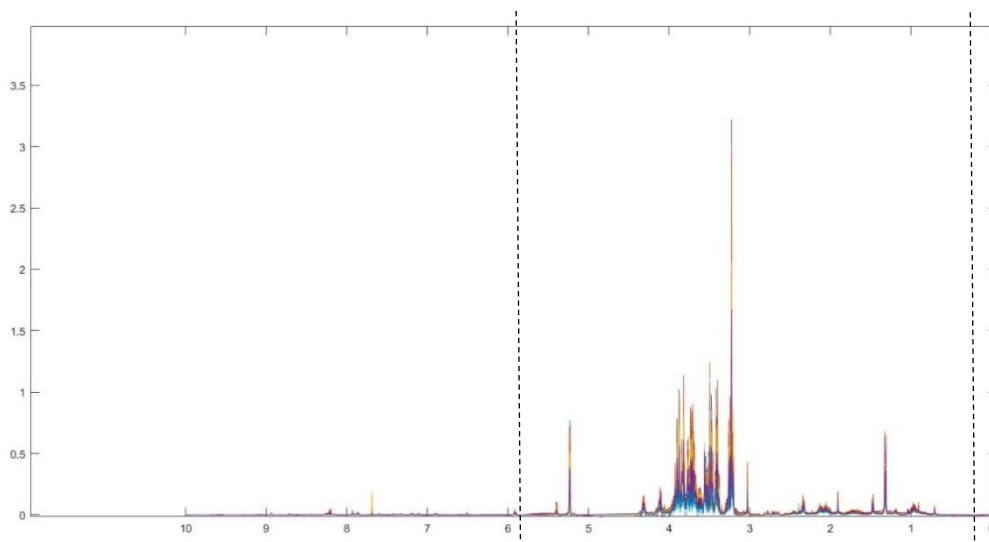
Para garantir a qualidade dos dados, estes foram analisados utilizando-se a metodologia *untargeted* tendo como objetivo medir e comparar o maior número de sinais em um conjunto de amostras. Em uma segunda etapa, foi realizada a atribuição desses sinais a IDs de metabólitos utilizando-se bancos de dados metabolômicos.

Estudos não direcionados tem como objetivo a identificação de metabólitos desconhecidos, especialmente quando eles são os biomarcadores de um estudo. Já as análises do tipo *targeted* concentram-se na identificação e quantificação precisas de um conjunto definido de metabólitos em amostras biológicas. Geralmente, esse conjunto de metabólitos é predeterminado pelo tamanho da biblioteca de metabólitos disponível no software utilizado para análise dos dados (WELJIE et al, 2006; BINGOL.,2018).

4.2 ANÁLISE UNTARGETED

Para a análise não direcionada realizou-se a análise de binning do conjunto de dados (figura 2). O binning ou bucketing é a divisão do espectro em janelas e a soma das intensidades pertencentes a cada uma delas. O tamanho de cada janela é otimizado, para produzir melhores resultados, o número de picos deve ser reduzido significativamente para que se relacione de forma mais efetiva com a discriminação desejada. Além disso, contorna os problemas de desalinhamento e filtra ruídos (FERREIRA, 2015).

Figura 2 – Espectro de RMN dos compostos polares das 24 amostras do fígado de bovinos nelores (Binning de 0,004).



Fonte: autoria própria

Inicialmente utilizou-se o conjunto de dados com binning de 0,004, para montar a matriz. Eliminaram-se as regiões que não havia sinal, mantendo-se a região de 0,5 ppm – 5,9 ppm. Com isso, a matriz de dados formada continha 24 linhas, correspondentes as amostras, por 1088 variáveis, correspondentes as regiões de binning (COBAS et al, 2006).

4.3 CLASSIFICAÇÃO DAS 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES

Foram consideradas para classificação os tipos de dieta (convencional e subproduto) no conjunto 1 e a emissão de gás metano alta e baixa (high e low) no conjunto 2. A análise multivariada (Matlab 2022a) considerando os tipos de dieta e produção de gás metano não continha amostras suficientes o que não possibilitou uma predição assertiva.

4.4 ANÁLISES DE DADOS DAS 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES

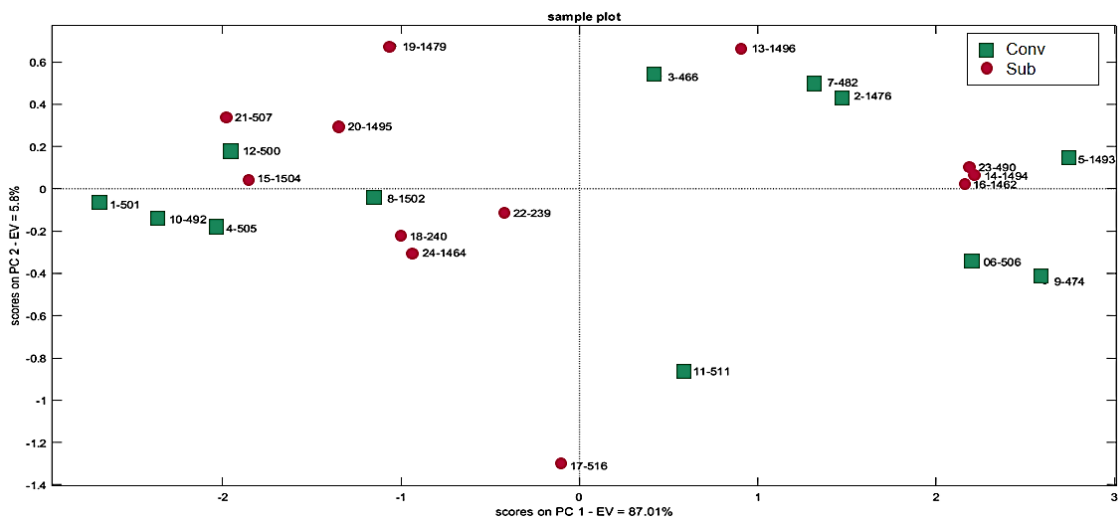
Ao analisar uma matriz de dados por binning é possível identificar regiões que são responsáveis pela separação de grupos das amostras estudadas. Essa é uma vantagem das análises *untargeted* em frente a *targeted* que permite encontrar biomarcadores não usuais para as condições estudadas.

Foram realizadas análises de PCA no conjunto de dados considerando as duas classificações (conv x sub; low x high). Como a PCA não considera as classes das amostras nos cálculos, a diferença em ambos gráficos ocorre na diferente classificação das amostras, mas a distribuição ao longo das PCs permanece a mesma. Entretanto, observa-se diferença nos resultados de PLS-DA com diferentes classificações. Ambas as análises foram realizadas utilizando o software Metaboanalyst 5.0.

4.4.1 Análise de Componentes Principais de 24 amostras de fígado de bovinos nelores do conjunto 1 avaliando as dietas distintas (convencional e subproduto).

A seleção de componentes traz vários benefícios, pois a influência da variação relacionada ao ruído é minimizada e a interpretação é significativamente suportada pela redução da dimensão dos dados (BALLABIO, 2015). O modelo ótimo de componentes principais foi calculado com 4 PCs, obtendo-se 97,1% de variância explicada. Os dados foram normalizados por mean centering, essa normalização minimiza a chance de seleção de variáveis em regiões de ruído. A figura 3 apresenta a análise de componentes principais do conjunto 1 (dieta).

Figura 3 – Gráfico de Scores de PCA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

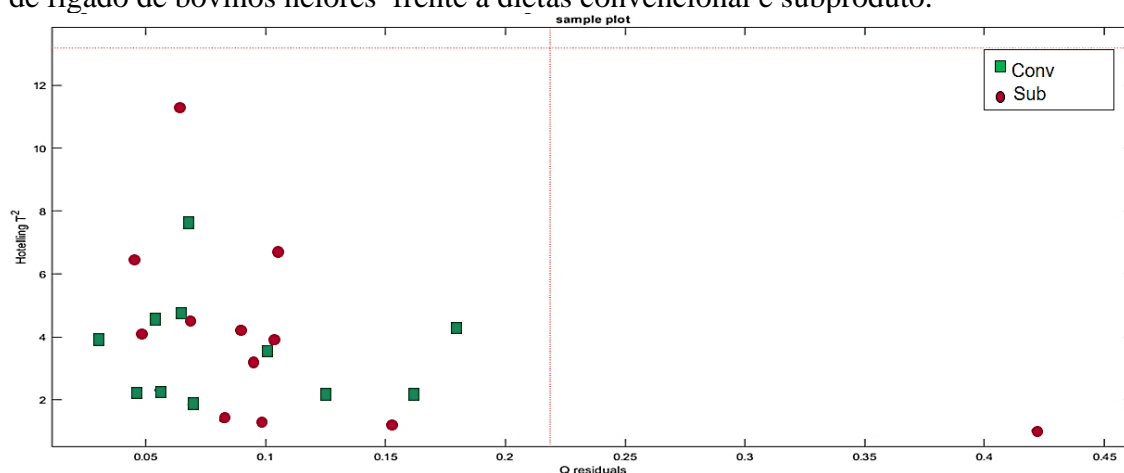
O gráfico dos scores da PCA demonstra a distribuição natural das amostras. No atual conjunto de dados as amostras não apresentaram tendência a agrupamentos. As PCs foram definidas maximizando a variância com base nas informações contidas nas

variáveis, ou seja, uma PC não está relacionada com as diferenças ente duas classes obrigatoriamente, portanto a PCA não possui a habilidade de dividir a variância dos dados e descrever as classes e diferença entre elas (FERREIRA,2015).

4.4.2 Análise de Q residuals Vs Hotelling T² de 24 amostras de fígado de bovinos nelores.

O gráfico de Q residuals vs Hotelling T² indica se há amostras que podem ser consideradas *outliers*. Os Q residuals são a porcentagem de informação não explicada de cada amostra e o Hotelling de T² é um cálculo que avalia a dispersão das amostras. Amostras com alto valor de Q e Hotelling T² são consideradas *outliers*, o que não foi observado nos dados abaixo (figura 4).

Figura 4 – Gráfico de Q residuals vs Hotelling T² de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto.



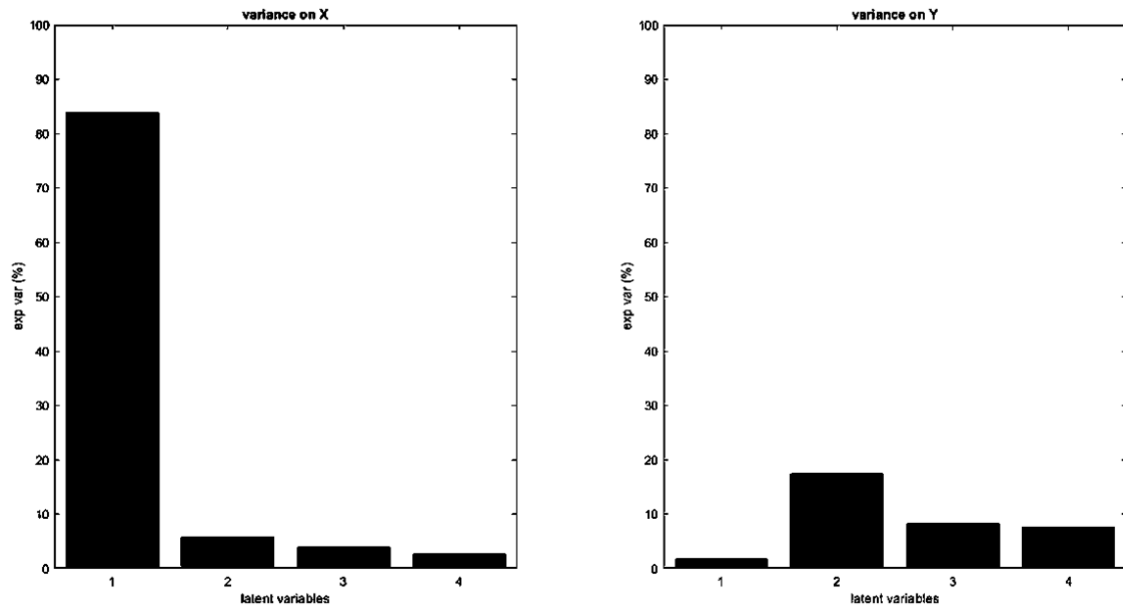
Fonte: autoria própria

4.4.3 Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos - PLS-DA do conjunto 1 dieta (convencional, subproduto).

A PLS-DA apresentou 4 variáveis latentes (LVs), com 96% da variância explicada e a taxa de erro de 4% . Já a taxa de erro da validação do conjunto de dados foi de 21 %. As chamadas LVs, são combinações lineares das variáveis originais que permitem a visualização gráfica e compreensão dos diferentes padrões de dados e relações por carregamentos da LV. Estes carregamentos podem ser designados como a influência de cada variável, já os escores representam as coordenadas das amostras projetadas no

hiperespaço (BALLABIO; CONSONNI, 2013). A figura 5 mostra a variância explicada para os eixos x e y.

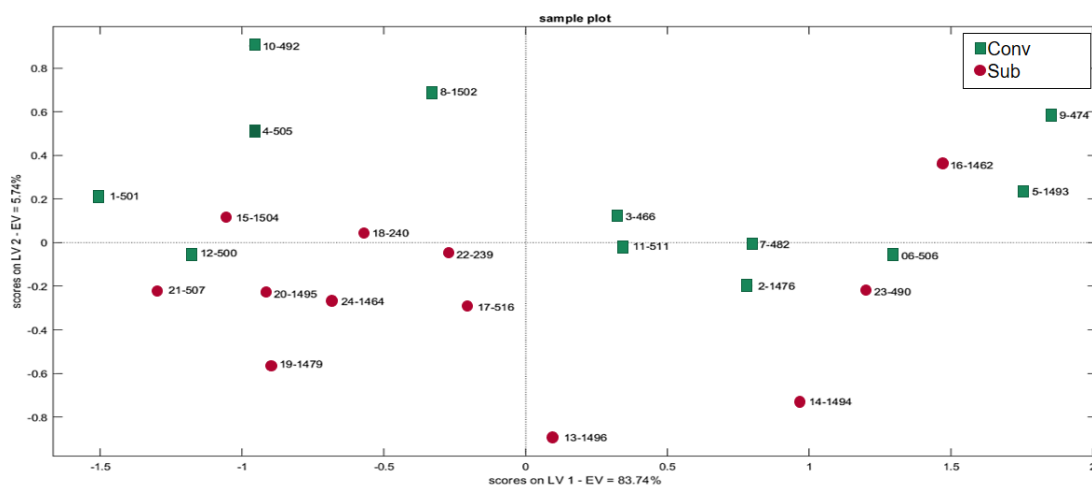
Figura 5 – Gráfico da variância explicada da análise de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto.



Fonte: autoria própria

A figura 5 demonstra quais LVs melhor descrevem o conjunto de dados em estudo. Enquanto a LV1 é a que mais explica as informações da matriz X, os dados espectrais, as LVs 2 e 3 são as que melhor explicam a matriz Y, matriz de classes (BALLABIO,2015; FERREIRA,2015). A figura 6 apresenta o gráfico de escores do PLS-DA na Lv1 e Lv2 .

Figura 6 – Gráfico de Scores de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore (com n° do brinco) com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (Scores nas LV 1 e 2).

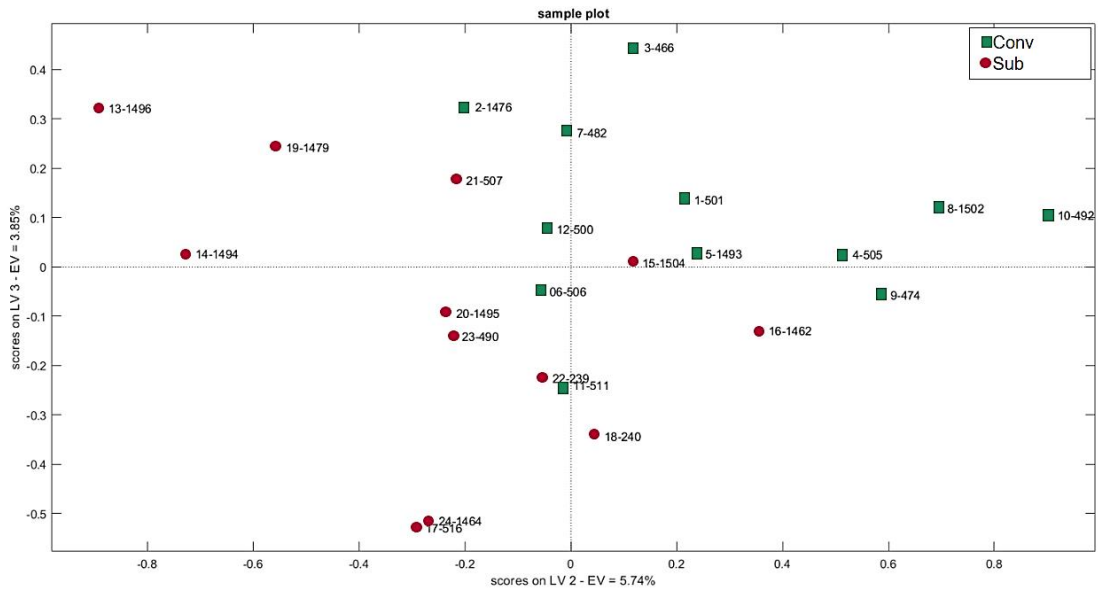


Fonte: autoria própria

A figura 6 demonstra como as amostras ficaram dispostas na PLS-DA. E estes scores demonstraram que não houve um agrupamento adequado, o grupo convencional tem uma tendência de apresentar valores negativos na LV2 e na LV1, sendo que das 12 amostras pertencentes a esta classe apenas três estão em LVs positivas. Já o grupo subproduto apresentou uma melhor distribuição, no entanto, não houve um agrupamento de classe, isto pode ser devido ao número de variáveis associadas as regiões espectrais que caracterizam as amostras, pois quando o modelo torna se muito dependente do conjunto de dados, pode apresentar baixa capacidade de generalização (ALMEIDA, 2021; RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2018).

As informações que a PLS-DA mostra que a figura 7 traz uma tentativa de separação de classes ou agrupamento, sendo que há 7 amostras do subproduto nas LVs negativas e 9 da dieta convencional nas LVs positivas. No entanto a variância explicada na LV2 é de 5,74 % e a LV3 é 3,85%, ou seja, o valor é muito baixo demonstrando o porquê não haver uma classificação de grupos eficiente.

Figura 7 – Gráfico de Scores de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (Scores nas LV 2 e 3).

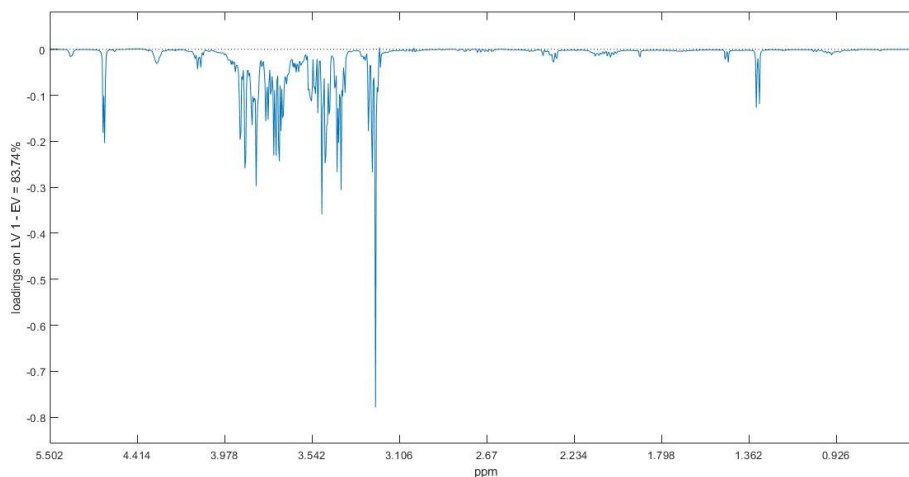


Fonte: autoria própria

4.4.4 Regiões de caracterização dos grupos de estudo

As figuras 8, 9 e 10 trazem informações sobre as regiões espectrais importantes para caracterizar este estudo, variando as LVs e mantendo a variável em ppm em cada uma delas, observam-se as regiões que se diferenciam para cada grupo.

Figura 8 – Gráfico de variáveis de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (loadings na LV1).

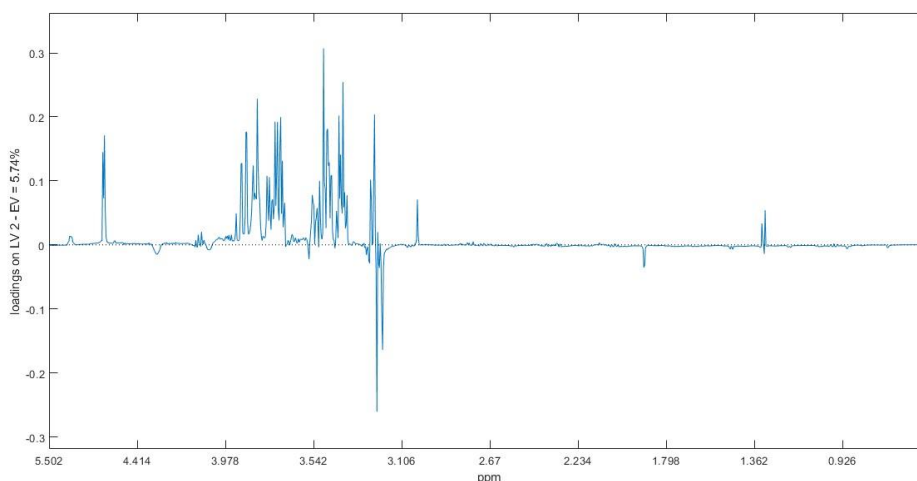


Fonte: autoria própria

A figura 8 apresenta os loadings com todas suas intensidades na LV1 negativa, ela não é eficaz para apontar regiões responsáveis pela separação de grupos, pois o

espectro é comum para os dois grupos. Enquanto as LV 2 e 3 apresentam regiões que melhor caracterizam os grupos em estudo (BALLABIO, CONSONNI,2013; BALLABIO,2015). A figura 9 que apresenta as variáveis na região negativa e positiva.

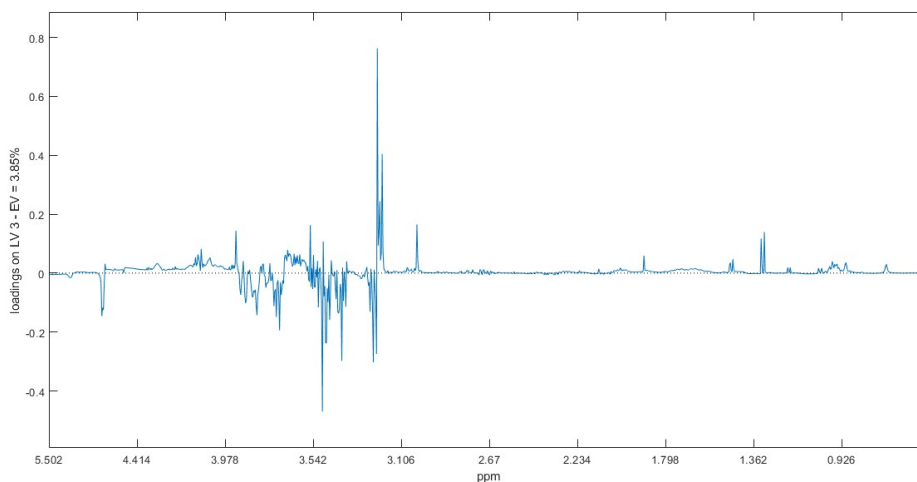
Figura 9 – Gráfico de variáveis de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (loadings na LV2).



Fonte: autoria própria

A figura 9 mostra que a região negativa demonstra os picos que fazem a dieta de subproduto se diferenciar da dieta convencional, possibilitando a identificação de biomarcadores e diferenciando os grupos. A região positiva são as regiões comuns aos dois grupos e que caracterizam principalmente o grupo convencional (BALLABIO, CONSONNI,2013; BALLABIO,2015). Já na figura 10 apresenta outras variáveis que caracterizam o grupo de subproduto.

Figura 10- Gráfico de variáveis de PLS-DA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com duas dietas alimentares distintas, convencional e subproduto para eficiência alimentar (loadings na LV3).



Fonte: autoria própria

Na figura 10 a variante latente demonstra novos picos na intensidade negativa que caracterizam o grupo subproduto, já a intensidade positiva caracteriza principalmente a dieta a convencional (BALLABIO, CONSONNI,2013; BALLABIO,2015).

4.4.5 Matriz de confusão

A matriz de confusão traz os resultados dos erros cometidos pelo classificador. A classe verdadeira é representada versus a classe estimada, sendo a classe verdadeira na coluna e a classe determinada pelo classificador, ou seja, pelo modelo construído (FERREIRA, 2015).

A tabela 6 demonstra que das doze amostras pertencentes a classe convencional, onze foram classificadas como convencional e uma amostra foi atribuída incorretamente a classe de subproduto. Já as amostras que pertencem a classe de subprodutos, quatro foram classificadas incorretamente como da classe de convencional e oito foram classificadas corretamente (BALLABIO,2015).

Tabela 6 – Matriz de confusão da validação do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional(class 1) e subproduto(class 2).

'real/prec'	'conventional'	'by product'	'not assigned'
'conventional'	'11'	'1'	'0'
'by product'	'4'	'8'	'0'

Fonte: autoria própria

A tabela 7 apresenta as classificações da matriz de confusão, contendo os parâmetros importantes como sensibilidade, especificidade, precisão do modelo de treinamento e validação.

Tabela 7 – Classificação da matriz de confusão do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto.

Training					Cross Validation				
Error rate:0.04	class	sens	spec	prec	Error rate:0.21	class	sens	spec	prec
Non error rate :0.96	Class 1	0.92	1.00	1.00	Non error rate :0.79	Class 1	0.92	0.67	0.73
Accuracy 0.96	Class 2	1.00	0.92	0.92	Accuracy 0.79	Class 2	0.67	0.92	0.89

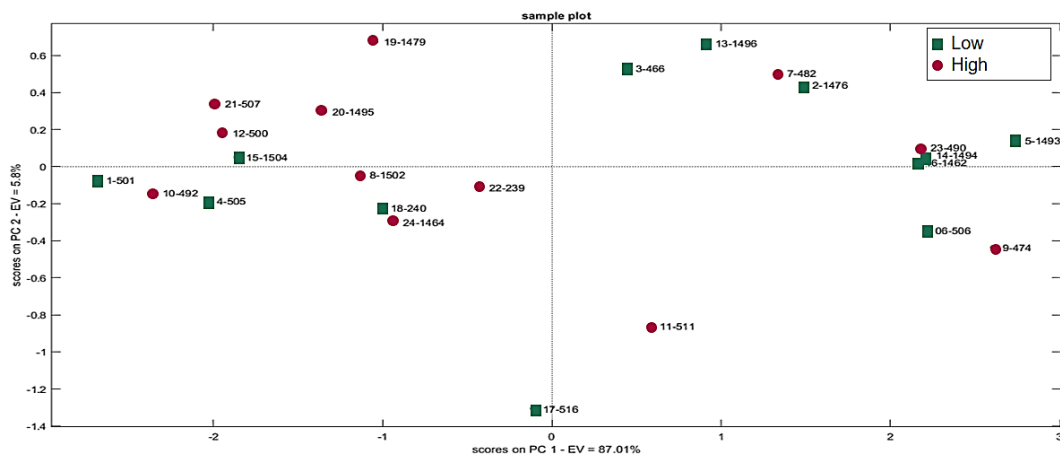
Fonte: autoria própria

A sensibilidade(sens) de classificação é a medida de quão bem o modelo é capaz de classificar as corretamente as amostras. A especificidade(spec) é a habilidade do modelo em identificar amostras que não são de uma classe e que foram corretamente classificadas como não sendo (BALLABIO,2015; FERREIRA, 2015). A precisão(pec) das classes avalia o quão preciso é o modelo com verdadeiros positivos em relação a falso positivos. A acurácia do modelo foi de 0.79 (79%), que representa a porcentagem de acertos do modelo (razão entre o número de acertos e o total de previsões feitas). Com essa informação, observou-se que o grupo convencional é melhor descrito que o subproduto. Para aumentar a sensibilidade do grupo subproduto é recomendável se avaliar mais amostras.

4.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PCA DE 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES DO CONJUNTO 2 (ALTA E BAIXA EMISSÃO DE METANO RESIDUAL).

Conforme pode ser observado na Figura 11, há uma alta correlação entre as variáveis. As amostras estão espalhadas ao longo da PC1, descrevendo as informações majoritárias contida no conjunto dados, com 87,01% de variância explicada. Já a PC2, descreve a fração restante da informação original de apenas 5,8 %.

Figura 11 – Gráfico de scores da PCA de compostos polares de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore com valores de emissão de metano residual alto (*high*) e baixo (*low*).



Fonte: autoria própria

Os espectros apresentam a mesma distribuição no espaço sendo a única variação as intensidades de emissão, que aumentam regularmente com o aumento da concentração de metano. Esta análise permitiu detectar amostras que apresentam um comportamento atípico, pois com a projeção de dados estas tendem a se tornar evidente (FERREIRA, 2015). A análise supervisionada se faz necessária, uma vez que o modelo para o conjunto de dados não foi capaz de classificar as amostras, mesmo com uma variância explicada de 87%. Com base nos dados acima, optou-se pelo emprego de análise por PLS-DA.

4.5.1 Análise discriminante pelo método de mínimos quadrados do conjunto 2 emissões de metano, baixa e alta (*low* e *high*).

O cálculo foi realizado com 4 LVs, onde se obteve 96% do modelo explicado, com uma taxa de erro do modelo e de validação de 13% e 42%, respectivamente. Sendo

classificado como um modelo sobre-ajustado (alto R^2 e baixo Q^2). Devido ao alto erro da validação, optou-se por não avaliar os *scores* e *loadings*. Abaixo seguem as métricas do modelo (Tabela 8).

Tabela 8 -Matriz de confusão da validação do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores com valores de emissão de metano residual alto (*high*) e baixo (*low*).

'real/predicted'	'high'	'low'	'not assigned'
'high'	'7'	'5'	'0'
'low'	'5'	'7'	'0'

Fonte: autoria própria

A tabela 8 indicou que dentre as 12 amostras de alta emissão, 5 foram erroneamente classificadas como sendo de baixa emissão. Nas amostras da baixa emissão, 5 foram classificadas como alta emissão e 7 foram classificadas corretamente. Este resultado demonstrou que as amostras de ambas as classes foram atribuídas incorretamente, ou seja, a sensibilidade e seletividade para este modelo são baixíssimas (BALLABIO, 2015; FERREIRA, 2015).

A classificação da matriz de confusão do conjunto 2 apresentado na tabela 9 demonstrou que não houve classificação adequada para as duas classes. Já que o valores de sensibilidade(*sen*) e especificidade(*spec*) são iguais. Os dados de *Cross Validation* indicam que o modelo não é capaz classificar as amostras de cada grupo, de informar quais amostras não fazem parte de qual grupo, além disso o erro do modelo apresentou um erro de 42% (BALLABIO,2015).

Tabela 9– Classificação da matriz de confusão da validação do modelo do conjunto de dados de compostos polares das 24 amostras de fígado de bovinos nelores com valores de emissão de metano residual alto (*high*) e baixo (*low*).

Training					Cross Validation				
Error rate:0.12	class	sens	spec	prec	Error rate:0.42	class	Sens	spec	prec
Non error rate :0.88	Class 1	0.92	0.83	0.85	Non error rate :0.58	Class 1	0.58	0.58	0.58
Accuracy 0.88	Class 2	0.83	0.92	0.91	Accuracy 0.58	Class 2	0.58	0.58	0.58

Fonte: autoria própria

Ademais, foi realizada uma regressão com os dois conjuntos de dados (dieta e emissão de metano). Foi observado que o conjunto de dieta apresentou melhores resultados, que foram analisados via *targeted* (BALLABIO, 2015).

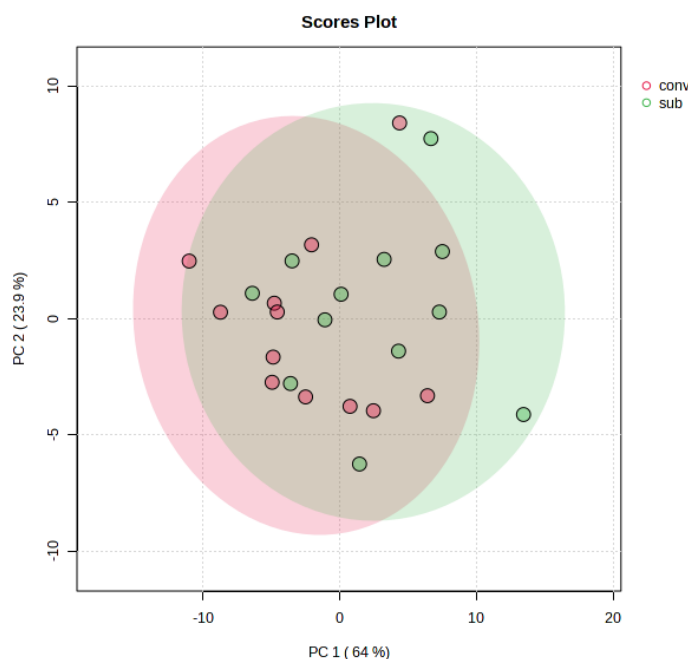
4.6. ANÁLISE TARGETED DAS 24 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

Nesta etapa, avaliou-se os compostos identificados no *Chenomix*. A matriz de dados dos cálculos foram considerando 24 amostras (12 amostras providas de dieta convencional e 12 amostras providas de dieta subproduto), resultando na identificação de 21 metabolitos. As concentrações de todos os metabolitos estavam em mg/dl e foram normalizadas pelo peso do fígado bovino extraído (mg). Devido a performance das classificações anteriores, optou-se por manter a normalização centrada na média, para obter uma distribuição homogênea das concentrações dos metabolitos. Os dados não estão auto escalonados, pois os torna adimensionais, ou seja, tornariam os valores invariantes com respeito a unidade utilizada originalmente. Este tratamento é adequado quando a faixa de variação dos dados é grande ou quando as variáveis apresentam diferentes unidades(MORTAZAVI-TABATABAEI et al., 2013; FERREIRA,2015).

4.6.1 Análise de Componentes Principais das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas para eficiência alimentar.

Foram necessários 5 PCs para descrever adequadamente o sistema em estudo, com 98% de variância do modelo explicado. Observa-se que na PCA (Figura 12) apresentou um limite de confiança de 95%. A primeira componente principal explica 64% da informação original dos dados e a PC2 apenas 23,9 % totalizando 87,9% da variância explicada. As amostras apresentam uma maior variância e demonstram que não há uma separação de classes efetiva (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020) dos metabólitos.

Figura 12 – Gráfico de scores da PCA de metabólitos de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

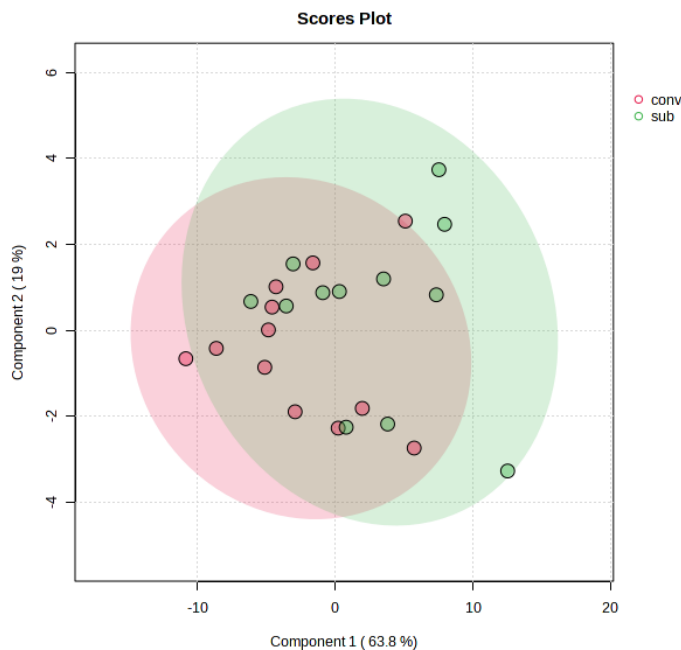
No trabalho de Londoño-Gil e pesquisadores (2023), foi demonstrado a avaliação genômica de 18 rebanhos comerciais com diferentes estruturas de pedigree em bovinos Nelore. De maneira análoga, a PC deste trabalho apresentou uma sobreposição, não havendo diferenças genômicas entre os grupos estudados (rebanhos registrados genotipados x rebanhos comerciais genotipados). Para contornar o problema, pesquisadores realizaram uma revisão da metodologia estatística para a análise de componentes principais, bem como outros métodos bioestatísticos.

Sun et al (2020) demonstrou como a multi-ômica revela mecanismos de genômicas e metabólitos funcionais da produção e qualidade do leite. Neste projeto, foram avaliadas 16 vacas leiteiras alimentadas com dietas distintas de subprodutos agrícolas, sendo identificados 270 metabólitos nas amostras de fígado. No trabalho de Conolly et al (2019), foi estudada a relação do metaboloma sanguíneo da carcaça no abate em novilhos mestiços *Wagyu*, em diferentes dias de alimentação. Como resultado, observou-se que os genótipos apresentaram influência significativa na concentração de dezesseis dos 35 metabólitos identificados. Com destaque a 3-hidroxitirato, acetato e propionato que foram os metabólitos mais promissores para prever a gordura intramuscular (Ribeiro et al., 2020).

4.6.2 Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais das 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dieta distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.

Na PLS-DA representada na Figura 13, o número ótimo de variáveis latentes no modelo final foi determinado pelas figuras de méritos, sensibilidade e seletividade. Com base nos resultados obtidos, o número ótimo de variáveis no modelo de classificação da PLS-DA é $n = 5$ com 97,5% da variância explicada (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020).

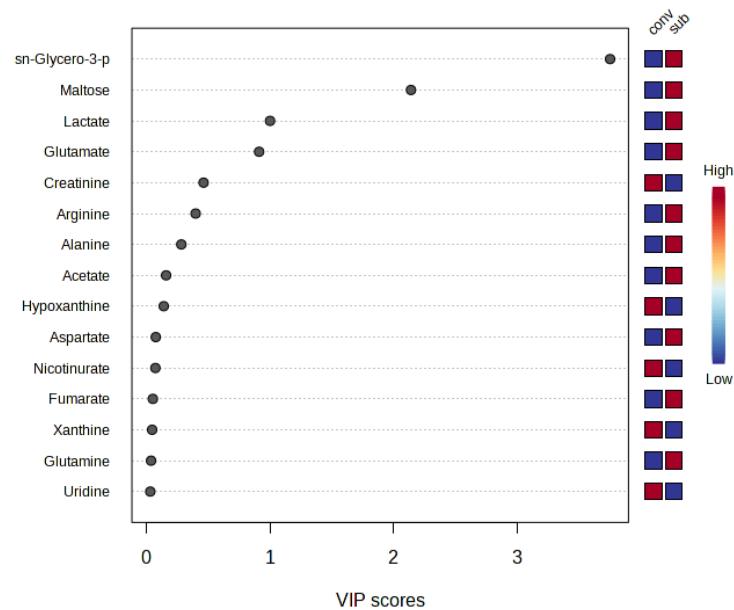
Figura 13– Gráfico de scores da PLS-DA de metabolitos de 24 amostras de fígado de bovinos Nelore frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

A primeira componente apresentou 63,8 % variância explicada, já a segunda componente 19%. Apesar de totalizar 82,8 % do modelo explicado, houve uma sobreposição entre os grupos, não sendo possível observar agrupamento entre os tratamentos. Isso pode indicar que o perfil metabólico apresentou poucas ou não variáveis expressas diferencialmente entre os tratamentos. Deste modo, o modelo não está bem explicado, contendo poucas informações para melhor descrever a classes das amostras (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020; POLIZEL et al., 2022). Os metabólitos de maior destaque no PLS-DA estão expressos abaixo (figura 14).

Figura 14- Gráfico da análise da importância da variável na projeção do conjunto de dados de metabolitos de 24 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



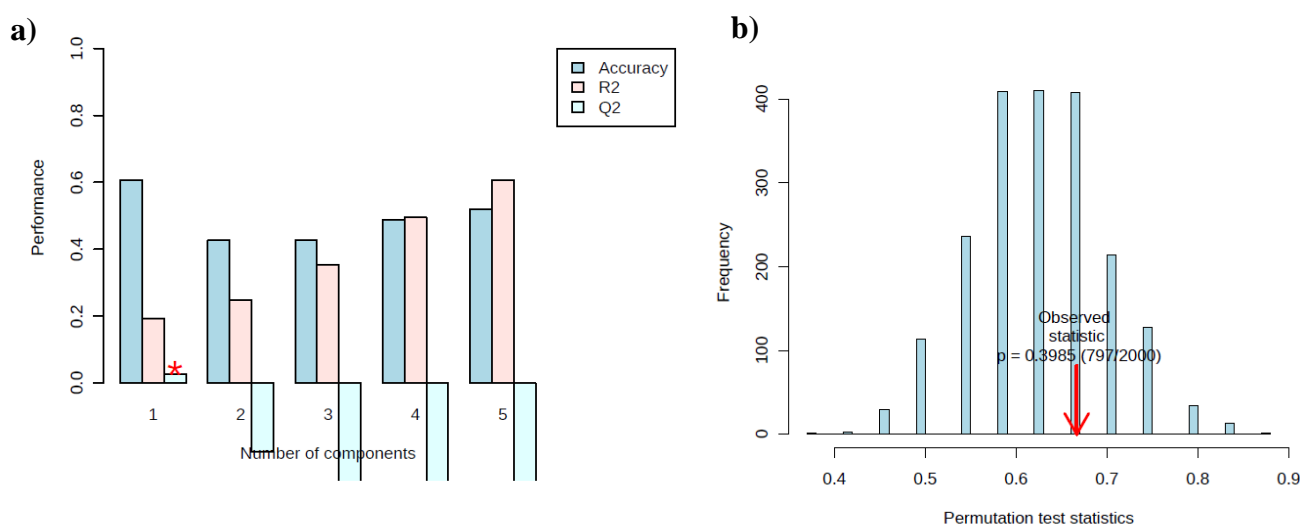
Fonte: autoria própria

O VIP é a soma ponderada dos quadrados das cargas PLS, que considera a quantidade de variância explicada de cada componente. Dentre os 22 metabólitos (acetato, alanina, arginina, aspartato, creatinina formato, fumarato, glicose, glutamina, glutamato, glycocholato, hypoxantine, lactato, maltose, nicotinurato, phenylalanina, S-adenosylhomocysteina, Sn-Glycero -3 phosphocoline, Tirosina, Uracil, Uridina e Xantina), 15 metabolitos foram os mais importantes. Dentre eles, o acetato foi relatado no trabalho de Malheiros e pesquisadores, que analisaram o fluido ruminal e fezes de bovinos Nelore. O acetato também foi um dos metabólitos mais abundantes do trabalho de (Xia et al; 2021).

Comparando com outros trabalhos, como de Malheiros et al (2021), o número de metabólitos polares anotados foram 49, o valor de compostos identificados neste estudo foi consideravelmente menor. O mesmo pode ser observado em comparação a outros trabalhos, como o de Sun et al (2020), onde 270 metabolitos foram encontrados em fígado de vacas, 28 metabólitos apresentaram abundância significativamente diferente no fígado (VIP > 1 e $P < 0,05$). Neste mesmo trabalho, os principais biomarcadores foram os metabolitos ácido hipúrico, leucina, cistina. Este estudo identificou um número menor de metabólitos e os biomarcadores em comparação aos descritos na literatura como propionato, butirato ou leucina, cistina, que não foram encontrados.

Como pode-se observar na figura 15, o número de amostras e metabolitos encontrados interferiu nas análises quimiométricas. Desta forma, os valores que obtidos pelos testes realizados, mostram informações sobre acurácia, R^2 , Q^2 e o valor de p, que não são os ideais. Um número limitado de amostras pode dificultar a amostragem das caudas, pois valores extremos da distribuição podem não ser detectados (SZYMAŃSKA et al, 2012).

Figura 15 - Gráfico de figuras de méritos do PLSDA de metabolitos de 24 amostras de fígado de bovinos nelores frente a duas dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.



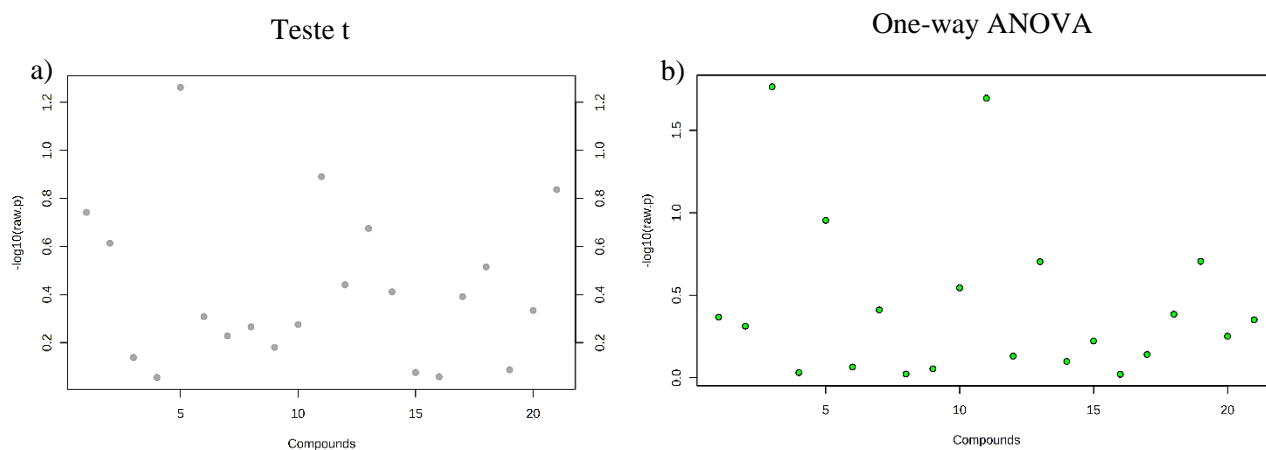
Fonte: autoria própria

Como observado na figura 15, o R^2 está baixo, que significa que o modelo não está bem ajustado. o R^2 é definido como o quadrado do coeficiente de correlação entre os valores observados e previstos em uma regressão, ou seja, é uma medida de quão bem o modelo ajusta um determinado conjunto de dados (ALEXANDER, et al 2015). Já o Q^2 , apresenta um baixo valor, portanto uma baixa capacidade preditiva, o Q^2 é baseado na avaliação do erro entre a variável categórica predita e o conhecido. O erro de predição é somado sobre todas as amostras e referido à soma total dos quadrados, desta forma avalia a capacidade de previsão do modelo e a validade dos dados. Esta validação consiste em uma permutação aleatória em que o valor de Q^2 para o modelo permutado tem que ser menor que o modelo original, após a repetição de N vezes, se o permutado tiver o Q^2 maior que o original o modelo não é considerado confiável (SZYMAŃSKA et al, 2012).

Já o teste de permutação p ou valor-p é definido como a probabilidade de se observar um valor da estatística de teste igual ou maior ao encontrado, desse modo este teste indica a probabilidade de se observar uma diferença tão grande ou maior do que a que foi observada sob a hipótese nula. O valor de corte para rejeitar a hipótese nula é de 0,05. Foi observado o valor de $p = 0,3985$, obtido na predição deste modelo representado na figura 15, que não demonstrou tendência de diferença entre grupos (FERREIRA; PATINO, 2015). Por isso, neste estudo aumentou-se o número de amostras de RMN passando de 24 para 52 com o objetivo de descrever as classes além dos valores de R^2 , Q2 e p.

Em seguida foi realizada análise estatística para cada conjunto 1 (dieta convencional e subproduto) e o conjunto 2 (convencional high, low e subproduto high e low). Para o conjunto 1 foi realizada o teste t já que, havendo a comparação entre 2 grupos. O conjunto 2 foi analisada pela Análise de Variância (ANOVA). A figura 16 apresenta a análise para avaliar se os conjuntos de dados eram significativos.

Figura 16- Análise Univariada dos metabólitos das 24 amostras de fígado de bovinos nelores a) análise estatística do conjunto 1 (dietas) Teste t b) análise estatística do conjunto 2 (emissão de metano residual).



Fonte: autoria própria

Os métodos de análise univariada são os métodos mais comuns para análise exploratória de dados, a Figura 16 A demonstra o teste t de Student do conjunto 1. Esta análise foi empregada para avaliar se os valores médios obtidos para cada grupo do conjunto eram significativamente diferentes ou não. Este teste estatístico fornece o p-valor, ou seja, o valor de probabilidade, se o p for menor que 0,05 os resultados são

estaticamente significantes. O teste realizado no metabonalyt demonstrou que as amostras não eram significativamente diferentes. Já para análise do conjunto 2, foi realizada a ANOVA unidirecional. Como a ANOVA apenas faz uma comparação entre as amostras, não foi possível observar a diferenças significativa entre os grupos. A importância das análises univariadas é que estas fornecem uma visão preliminar sobre características que são potencialmente significativos na discriminação das condições em estudo.

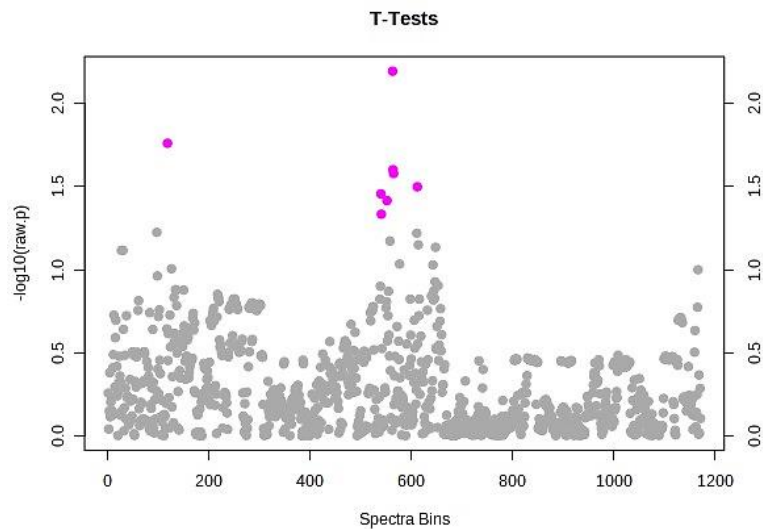
5. ANÁLISE UNTARGETED DE 52 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

Primeiramente utilizou-se o conjunto de dados com binning de 0,004, para montar a matriz. Foi avaliado o espectro e eliminaram-se as regiões que não havia sinal, mantendo a região de 0.5 ppm – 5.9 ppm. Com isso, a matriz de dados formada continha 52 linhas, correspondentes as amostras por 1331 variáveis, correspondentes as regiões de binning. A normalização utilizada para a análise univariada e multivariada foi a mediana, transformação de raiz cúbica e auto escalonamento, esses processamentos garantiram melhor normalização dos dados.

5.1 Análise por teste T de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.

O teste t de Student foi empregado para avaliar se os valores médios obtidos para cada grupo do conjunto de dados eram significativamente diferentes ou não. A figura 17 mostra o teste T para o conjunto de dados.

Figura 17- Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t considerando $p=0,05$ de compostos polares de 52 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria.

Os pontos rosas apresentam recursos acima do limite. Nota-se que os valores de p são transformados por $-\log_{10}$, para que os recursos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Abaixo, na tabela 11 são apresentados os espectros que foram considerados importantes para o conjunto de dados com 52 amostras.

Tabela 10 - Espectros importantes identificados pelo teste t de 52 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas.

	Spectra Bins	t. stat	p.value	-log10(p)	FDR
1	2.938	-2.8476	0.006375	2.1955	0.99995
2	5.554	-2.4619	0.017312	1.7616	0.99995
3	2.934	-2.311	0.024996	1.6021	0.99995
4	2.93	-2.2891	0.02633	1.5795	0.99995
5	2.742	-2.2105	0.031671	1.4993	0.99995
6	3.03	2.1684	0.034913	1.457	0.99995
7	2.982	-2.1276	0.038329	1.4165	0.99995
8	3.026	2.0436	0.046283	1.3346	0.99995

Fonte: autoria própria

Segundo os dados apresentados na tabela 11, observou-se que estes espectros são significativos para o conjunto de dados. A FDR é uma análise estatística para identificar falsos positivos, ou seja, quanto menor for o valor de FDR melhor, visto que significa poucos falsos positivos. Os valores da FDR para todas as amostras foi de 0.99995, o que pode ser considerado alto. Na literatura, valores que sejam aceitáveis para a FDR devem variar no máximo até 0.2 (REINER,2003; BENTO 2020).

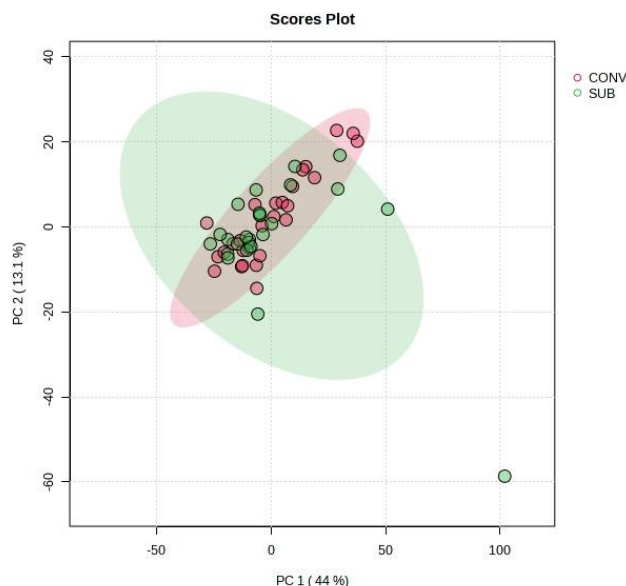
5.2 Análise multivariada de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dieta distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.

A PCA é um método não supervisionado que visa encontrar as direções que melhor explicam a variância em um conjunto de dados (X) sem consultar rótulos de classe (Y). Estes dados são resumidos em um número menor de variáveis chamadas pontuações, que são medias ponderadas das variáveis originais. Já os perfis de ponderação são chamados de cargas e o cálculo é baseado na decomposição de valores singulares (Metaboanalyst 5.0).

O número de componentes principais que são necessários para descrever adequadamente o conjunto de dados em estudo foram 5 PCs, com 75,3 % de variância do modelo explicado. Os dados estão auto escalonados, pois a faixa de variação dos dados é

alta, a Figura 18 apresenta a PCA deste conjunto de dados (MORTAZAVI-TABATABAEI et al., 2013; FERREIRA,2015).

Figura 18 – Gráfico dos scores da PCA de compostos polares das 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto pra eficiência alimentar (Binning 0,004).

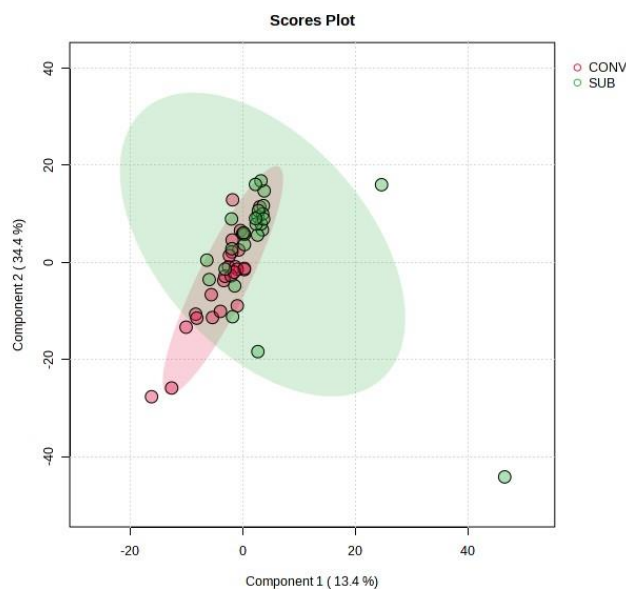


Fonte: autoria própria

No trabalho de Andrade e pesquisadores (2022), foram analisadas componentes das fezes e do microbioma ruminal, associados à emissão de metano e à eficiência alimentar em bovinos de corte Nelore. Foi observado que, nas análises de componentes principais houve a separação dos grupos. Isto ocorreu, pois, a composição da ração induziu diferenças significativas tanto na abundância quanto na riqueza das populações microbianas ruminais e fecais em ruminantes da raça Nelore. Além disso, realizaram o tratamento dietético baseado em subprodutos industriais em um grupo experimental, observou-se que houve influencia na diversidade do microbioma de bactérias e archaea. No entanto, alguns trabalhos demonstram também a sobreposição de grupos como a pesquisa de Conolly et al (2019) que realizou análises por RMN de amostras de sangue de bovinos Wagyu. A análise de componentes principais explicou na PC1 somente 11,61% da variabilidade dentro do conjunto de dados de 35 metabólitos identificados e a PC2 explicou 4,46% da variabilidade. Desta forma o gráfico de pontuação com PC1 e PC2 demonstrou que não houve agrupamento de animais, o que também ocorreu neste estudo.

Desta forma realizou-se a análise de PLS-DA para possibilitar uma separação entre as classes de fígado frente a dietas distintas convencional e subproduto. A PLS é um método supervisionado que utiliza técnicas de regressão multivariada para extrair através de combinação linear de variáveis originais (X) as informações que podem prever a que classe pertence cada grupo (Y). Na PLS-DA, o número ótimo de variáveis latentes no modelo final foi determinado pelas figuras de méritos, sensibilidade e seletividade pelo Metaboanalyst 5.0. Com base nos resultados obtidos, o número ótimo de variáveis no modelo de classificação da PLS-DA é $n = 5$ com 70,3% da variância explicada, conforme apresentada abaixo na Figura 19 (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020).

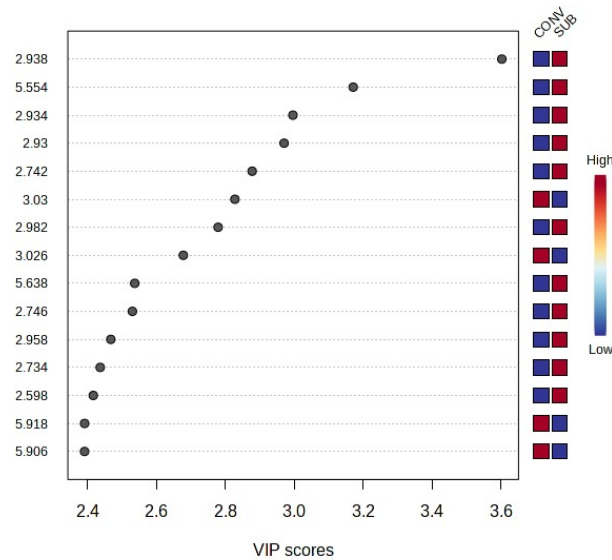
Figura 19 – Gráfico de scores de PLS-DA de compostos polares das 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar (*Binning* 0,004).



Fonte: autoria própria

A primeira componente tem 13.4 % variância explicada, já a segunda componente 34%. Desta forma totalizando 47,8% do modelo explicado, não sendo o melhor modelo para este conjunto de dados. A distribuição dos dados apresentou sobreposição entre os grupos, logo, não descreveu as classes de amostras. A baixa explicação indica que o perfil metabólico apresentou poucas variáveis que foram expressas diferentemente entre os tratamentos (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020; POLIZEL et al., 2022). A figura 20 mostra as regiões do espectro do binning das 52 amostras de maior destaque no PLS-DA, representada pelos VIPs scores.

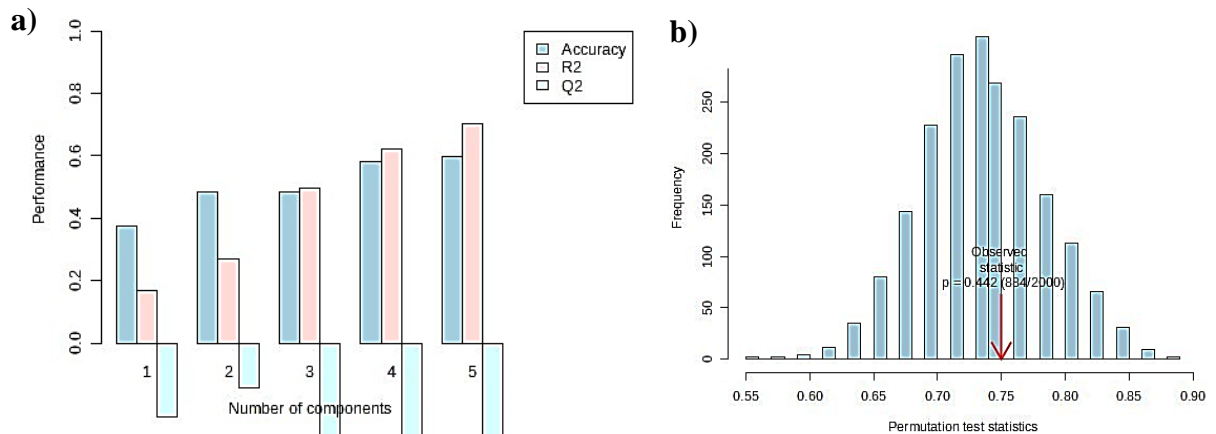
Figura 20 - Gráfico da análise da importância da variável na projeção do conjunto de dados de compostos polares de 52 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

O VIP é a soma ponderada dos quadrados da carga de PLS levando em consideração a quantidade de variância Y explicada na dimensão. As pontuações VIP foram calculadas para cada componente. Desta forma estas são as regiões do espectro mais importante para o conjunto de dados. Na figura 21, se encontram os valores que foram obtidos dos testes realizados, mostrando informações sobre acurácia, R^2 , Q^2 e o valor de p.

Figura 21 – Gráficos das figuras de méritos do PLS-DA de compostos de 52 amostras de fígado de bovinos frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar. a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.



Fonte: autoria própria

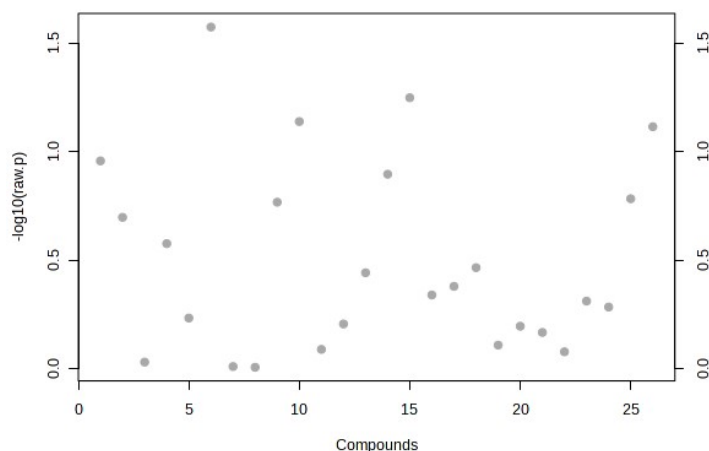
Os valores de performance do modelo demonstram que este conjunto de dados não obteve uma boa previsão (figura 21 a). Para que a predição seja correta, valor da relação R^2/Q^2 deveria ter sido > 0.7 . O conjunto de dados obtidos possui o Q^2 negativo, indicando que este modelo não é preditivo ou está super ajustado. Além disso, as 5 componentes não foram suficientes para prever o modelo com precisão ótima, esta acurácia informa a porcentagem de predições corretas; se for de 70 a 90% é uma predição real. No entanto não foi o caso deste conjunto de dados que apresentou acurácia de 60% (SZYMAŃSKA et al., 2012).

O valor de p indica o desempenho geral do modelo, a figura 21 b mostrou que o valor de p foi 0,442. Havendo só 834 predições de 2000 classificadas corretamente. O número de permutações realizadas foi de 2000, seguindo as recomendações necessárias relatadas nas pesquisas de Thompson (2016) e Szymanska et al. (2021). Para uma significância estatística adequada, o limite, mas baixo de permutações é ditado, ou seja, são necessárias 100 permutações para atingir se um valor de p igual a 0,01. No entanto, precisa-se de cautela, pois este número pode não ser suficiente para uma amostragem adequada das distribuições de caudas. Desta forma um número ótimo de permutações pode ser difícil de ser inferido.

5.3 Análise Targeted de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.

A matriz utilizada possuía 52 amostras e 26 compostos identificados. A normalização utilizada para a análise univariada foi a transformação de raiz cúbica e auto escalonamento, apresentando melhor distribuição normal. Para a análise univariada realizou se o Teste T de 52 amostras, desta forma, foi possível avaliar se os valores médios obtidos para cada grupo eram significativamente diferentes ou não, foi realizado o teste t que apresentado na figura 22.

Figura 22- Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de compostos polares de 52 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

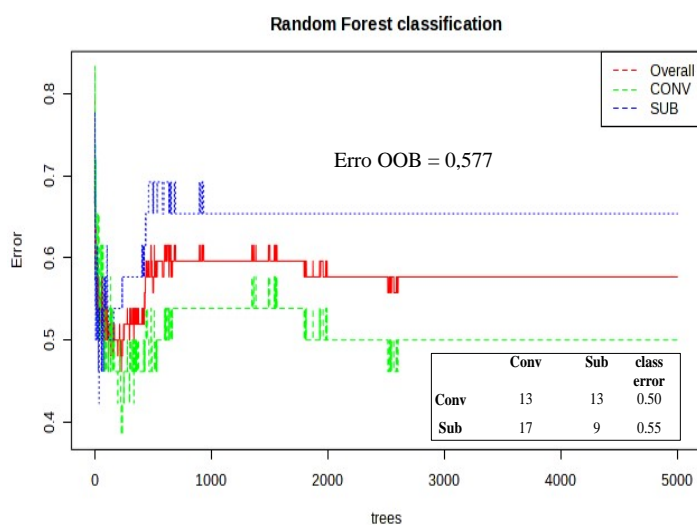
A Figura 22 mostrou que não há compostos significativamente diferentes ($p > 0,05$). Desta forma, este teste estatístico demonstrou que não há diferença na produção de nenhum dos 26 metabólitos identificados nas dietas convencional e de subproduto.

5.3.1 Análise Multivariada de 52 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas convencionais e subprodutos para a eficiência alimentar.

Para a análise multivariada a matriz utilizada possuía 52 amostras por 26 compostos, a normalização utilizada para a análise foi transformação de raiz cúbica e auto escalonamento, para melhor normalização dos dados. A classificação do conjunto de dados foi realizada pelo método de Random Forest (RF), utilizado por ser mais eficaz e robusto na busca de biomarcadores. É uma ferramenta de bioinformática mais eficaz quando as amostras apresentam uma grande variabilidade individual, devido a diversidade genética, condições patológicas e tratamentos (Souza, 2022).

O Random Forest é um método de combinação de preditores estruturados em árvores, seu desempenho é baseado em bootstrap, ou seja, amostragem aleatória com substituição. Cada árvore é cultivada usando a metodologia CART que consiste em classificação e regressão. O método de RF é considerado robusto quando comparado a diferentes métodos de classificação do PLS (CHEN et al., 2013; LEE; ULLAH; WANG 2020), a Figura 23 abaixo apresenta o modelo de classificação do Random Forest.

Figura 23 - Gráfico do Modelo de classificação do Random Forest para os compostos polares das 52 amostras de fígados de bovinos Nelores frente a dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

Este modelo representado na figura 23 foi analisado pela estimativa de erros. Utilizou-se o out of bag (OOB) a partir da matriz de confusão que indica o número de classes que foram atribuídas corretamente ou incorretamente a cada grupo analisado. Observou-se que das 52 amostras, 13 amostras da classe convencional foram classificadas como sendo da classe subproduto. Das 17 amostras da classe subproduto, 9 foram classificadas como classe convencional. O baixo acerto das classificações das amostras, juntamente com o alto erro de 0,50-0,55 demonstram que as classes foram atribuídas incorretamente, mostrando que o modelo tem baixa sensibilidade e seletividade. As análises de PCA e PLS-DA não foram realizadas, pois os grupos não apresentaram variáveis suficientes para a classificação (BALLABIO,2015; SOUZA ,2022).

5.4 ANÁLISE TARGETED DE 42 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

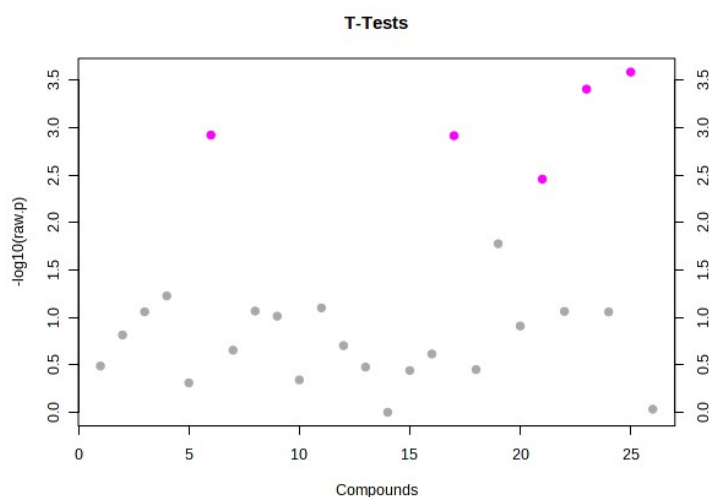
A matriz de confusão pelo teste de random forest das 52 amostras, não apresentaram informações suficiente para definir as classes e apresentavam baixa precisão e sensibilidade. Foram realizadas diversas normalizações. Foram realizadas análises de PCA, PLS-DA e matrizes de confusões, para a determinação dos possíveis *outliers*, afim de se encontrar o melhor modelo para o conjunto de dados. Sendo assim,

10 amostras que foram consideradas *outliers* para realização de análise univariada e multivariada dos metabólitos obtidos por RMN.

5.4.1 Análise Univariada Teste T de 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar.

A reavaliação dos dados do conjunto reduzido foi realizado pelo T, a fim de se avaliar se os valores médios obtidos para cada grupo do conjunto de dados eram significativamente diferentes ou não, conforme ilustrado na Figura 24.

Figura 24 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de metabólitos de 42 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

Os círculos rosas apresentam metabólitos acima do limite, os valores de p foram transformados por $-\log_{10}$ para que os recursos mais significativos com valores de p menores sejam plotados mais acima no gráfico. A Tabela 12 apresenta os metabólitos que foram considerados importantes para o conjunto de dados com 42 amostras.

Tabela 11- Metabolitos importantes identificados pelo teste t de 42 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.

Metabolitos	t.stat	p.value	$-\log_{10}(p)$	FDR
-------------	--------	---------	-----------------	-----

1	Xanthine	4.009	0.00025879	3.587	0.0050985
2	Uridine	3.8703	0.00039219	3.4065	0.0050985
3	Creatinine	3.4888	0.0011953	2.9225	0.0078926
4	Niacinamide	3.4833	0.0012143	2.9157	0.0078926
5	Tyrosine	3.1057	0.003483	2.458	0.018112

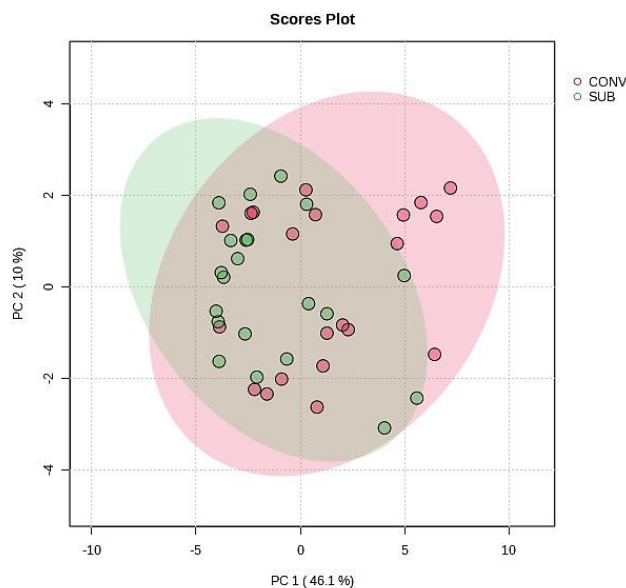
Fonte: autoria própria

Os dados apresentados na tabela 12 demonstram que estes metabolitos são significativos para o conjunto de dados já que o valor de $p > 0,05$. Além disso, o valor da FDR para as amostras variou entre 0.018 a 0.005, o que os torna dentro dos valores aceitáveis. O baixo valor de FDR indica que os dados são significativos e que não há falsos positivos (REINER, 2003; BENTO 2020).

5.5 ANÁLISE MULTIVARIADA DE 42 AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINOS FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

Na PCA, o número de componentes principais que foram necessários para descrever adequadamente o conjunto de dados em estudo foram 5 PCs, com 74,9 % de variância do modelo explicado. Os dados foram auto escalonados, devido a de grande variação dos dados. Na Figura 25, se encontra a PCA para o conjunto de dados.

Figura 25 - Gráfico de scores da PCA de metabólitos de 42 amostras de fígado de bovinos frente a dieta convencional e subproduto para eficiência alimentar.



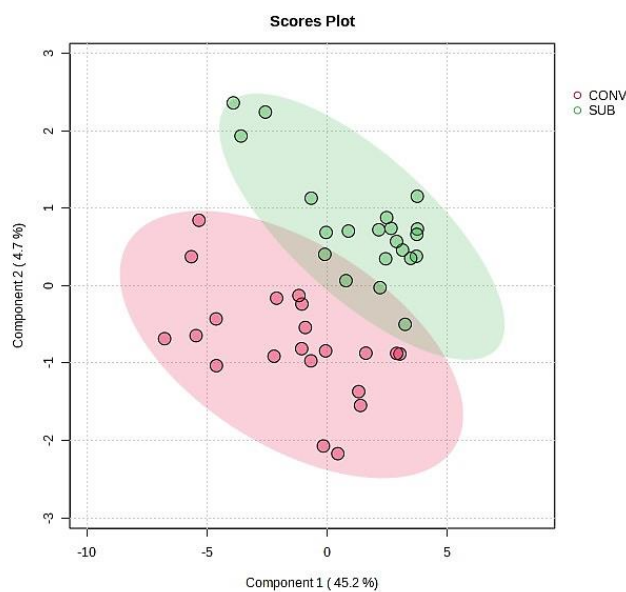
Fonte: autoria própria.

Na análise de componentes principais representada na figura 25, com limite de 95% de confiança, observou-se que não há uma separação de classes efetiva, pois há uma sobreposição entre os grupos. A primeira componente principal explica 46,1% e a segunda 10%, estas foram selecionadas via validação cruzada e para previsão de novas observações utilizou-se os loadings do conjunto de treinamento. Como as PCs maximizam as informações contidas nas variáveis, se o conjunto de dados não tiver informações suficientes a PC não irá diferenciar as classes. Já que esta não possui a habilidade de dividir a variância dos dados, diferenciando-as e as descrevendo (WITTEN; JAMES, 2013). Para que houvesse a separação entre os grupos realizou-se a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) abaixo na figura 26 que é um método supervisionado que maximiza a correlação entre as variáveis dependentes e os escores

No trabalho de Antonelo e pesquisadores (2022), foram analisados o perfil exploratório do metaboloma, e sua contribuição para a compreensão das diferenças no pH final da carne bovina. As PCs resultantes também apresentam sobreposição e não há uma separação evidentes entre os grupos. Sun et al (2015) demonstraram em sua pesquisa que, apesar das análises por RMN tenha sido amplamente utilizada na metabolômica devido à sua fácil preparação de amostras e baixo custo, a utilização do MS traz mais vantagens, sendo uma técnica sensível na detecção de metabólitos de baixa abundância.

Além disso a análises por GC-TOF/MS melhorou a detecção de metabólitos em vacas leiteiras em comparação com estudos anteriores identificando o triplo de metabólitos que eram identificados no rúmen de 46 para 165 metabólitos.

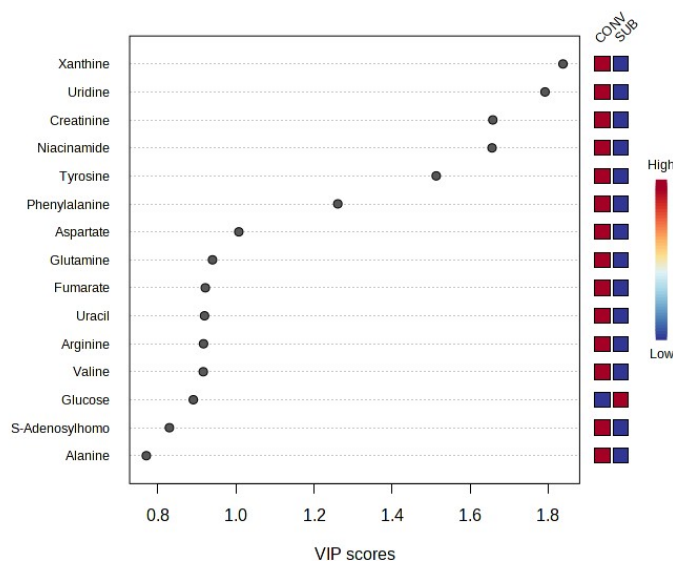
Figura 26 - Gráfico de Scores de PLS-DA de metabólitos de 42 amostras de fígado de bovinos de corte Nelores com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

A distribuição dos dados apresentou sobreposição entre os grupos, logo, não descreveu as classes de amostras. O perfil metabólico apresentou poucas variáveis expressas diferencialmente entre os tratamentos. A primeira componente tem 45.2 % da variância explicada, já a segunda componente 4.7%. Desta forma totalizando 49.9% do modelo explicado, menos de 50%, ou seja, representa que não foi o melhor modelo para este conjunto de dados (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020; POLIZEL et al., 2022). Os principais metabólitos para este conjunto de dados estão representados abaixo na figura 27.

Figura 27 - Gráfico da análise da importância dos metabolitos na projeção do conjunto de dados de 42 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

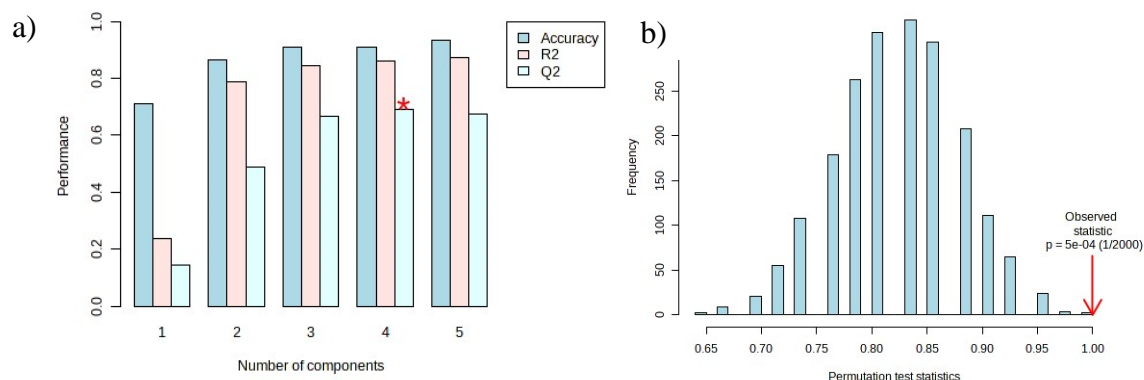
A figura 27 apresenta os 15 principais metabolitos para o conjunto de dados (Xanthine, Uridine, Creatinine, Niacinamide, Tyrosine, Phenylalanine, Aspartate, Glutamine, Fumurate, Uracil, Arginine, Valine, Glucose, S-adenosylhomocysteine e Alanine). O VIP é um método que seleciona os principais metabolitos isto ocorre, pois, as informações de um espaço de dados contendo um número maior de variáveis são projetadas num espaço contendo um número menor de variáveis. Os indicadores são as variáveis no espaço de dados desta forma com o número de indicadores extremamente reduzidos, as variações nos indicadores são mais prováveis de serem refletidas no vetor de resposta. Quanto as pontuações de cada modelo representam a importância de cada feature, ou seja, quanto mais alta, maior o efeito no modelo que está sendo usado para prever uma determinada variável. Neste conjunto de dados há uma variação de 0,5 a 2,0, deste modo o metabolito mais importante é a Xanthine (MUKHERJEE; SENGUPTA; SIKDA,2015).

No trabalho de Antonelo e pesquisadores (2022) observa se que a quantidade de metabolitos encontrados foi quase o dobro, 40 metabolitos foram identificados na carne bovina (*Longissimus thoracis*) alguns deles são acetato, fosfato, creatina, creatinina, glutamato, monofosfato de inosina, glicose, lactato, succinato, treonina, adenina

adenosina, fumarato, glicina e piruvato. Desata forma alguns destes metabolitos também foram encontrados neste estudo.

No trabalho de De Zawadzki e pesquisadores (2017) que analisaram o Extrato de erva-mate como aditivo alimentar para melhoria da qualidade da carne bovina (músculo *Longissimus thoracis et lumborum*) para o grupo de 48 bovinos nelores alimentado foi identificado e quantificado 19 metabólitos usando análise quantitativa de RMN de ^1H , alguns destes são acetato, adenosina, alanina, anserina, betaína, carnosina, colina, carnitina, creatina, glutamina, glicina, glicerol, glicose, isoleucina, lactato, leucina, metionina e valina. A quantidade de metabolitos encontrados assim como a identificação foi similar às encontradas no presente deste estudo. Já o trabalho de Sun et al (2020) demonstrou que a via do metabolismo dos aminoácidos foi mais significativa, ao analisar o fígado entre dois grupos de animais e revelaram um maior impacto do metabolismo da glicina, serina e treonina. Porém, estes três metabólitos não foram encontrados neste estudo. Na figura 28 os valores obtidos pelo conjunto de dados dos testes realizados trazem informações sobre acurácia, R^2 , Q^2 e valor de p.

Figura 28 – Gráfico de figuras de méritos do PLSDA dos metabolitos das 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.



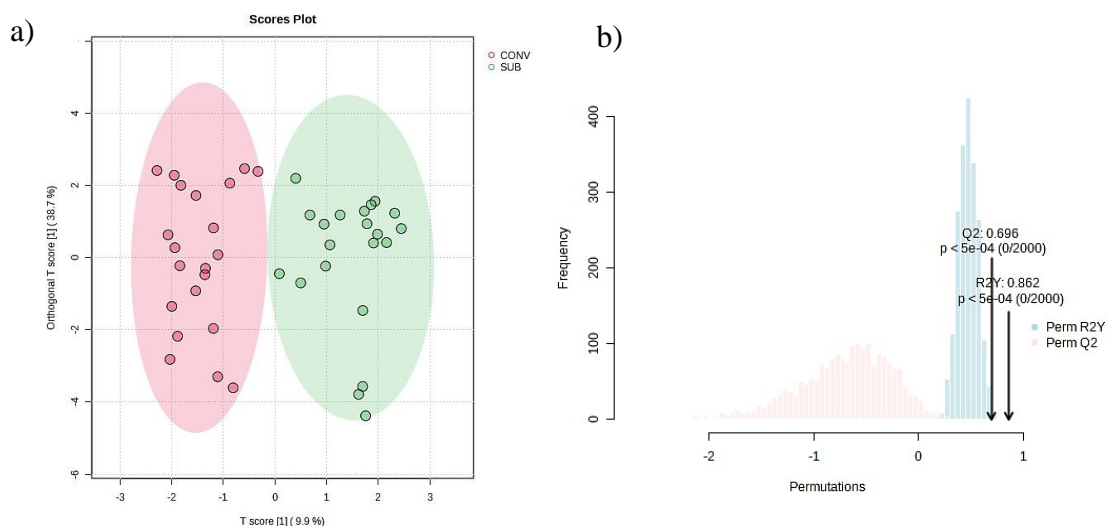
Fonte: autoria própria

Os valores de R^2 e acurácia na quarta componente foi de 0,86151 e 0,88 respectivamente apesar de ser maior que 0.7 a performance do modelo geral demonstrou que este conjunto de dados não obteve uma boa previsão, já que o valor da relação R^2/Q^2 deveria ter sido > 0.7 , o que não foi observado. No entanto, alguns pesquisadores afirmam que para experimentos biológicos valores de $Q^2 > 0,4$ e $R^2 > 0,7$ são aceitáveis o que se

enquadra neste estudo (GODZIEN et al., 2013; SOUZA, 2022). Além disso, as 4 componentes foram suficientes para prever o modelo com precisão ótima pois a acurácia informa a porcentagem de predições corretas como foi de 0,88 entre 70 a 90% é uma predição real. Quanto ao valor de R^2 demonstrou que o modelo está bem ajustado (SZYMAŃSKA et al.,2012). O valor de p indica o desempenho geral do modelo, a figura 28 b demonstra que o valor de p foi 0,0005, portanto está aceitável pois só 1 predição de 2000 foi corretamente classificada e quanto mais a direita classificação mais significativa é a separação entre dois grupos, portanto o poder preditivo do modelo (FATTUONI et al., 2016).

Para obter uma melhor visualização da discriminação entre as amostras utilizou se a Projeções Ortogonais para Análise Discriminante de Estruturas Latentes (OPLS-DA) esta é uma poderosa ferramenta de modelagem estatística que fornecem insights sobre separações entre grupos experimentais com base em medições espectrais de alta dimensão e a OPLS-DA é frequentemente usado como um método alternativo quando o PCA não consegue expor a separação de grupos (WORLEY; POWERS, 2016). A Figura 29 mostra o gráfico de escores e o teste de permutação do modelo metabolomico usando OPLS-DA.

Figura 29 - Gráfico do modelo de OPLS-DA de metabolitos de 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas calculado para discriminação entre os grupos Convencional e Subproduto (a). Resultado do teste de permutação do OPLS-DA (b).



Fonte: autoria própria

A figura 29 a demonstra que na primeira componente há uma explicação de 9.9% e a segunda componente 38.7 % com uma explicação total de 48.6% a distribuição dos

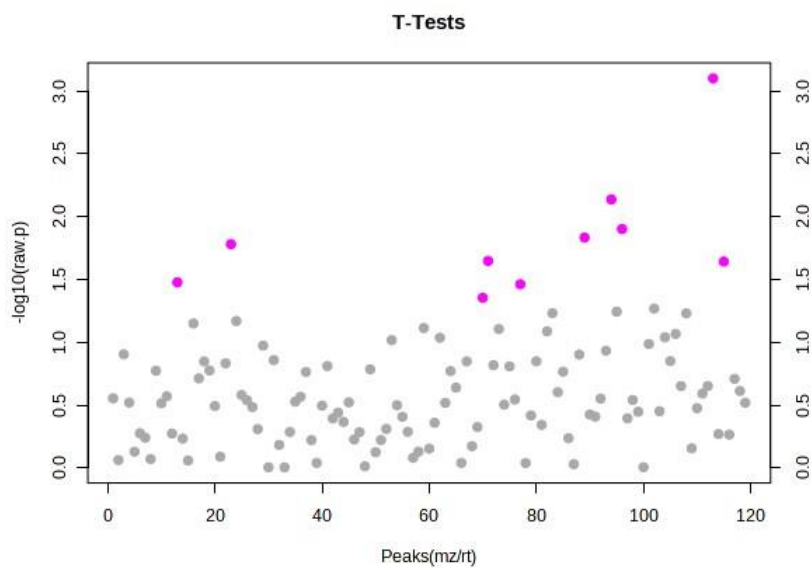
dados descreveu as classes de amostras. Na qual indica que o perfil metabólico apresentou variáveis expressas diferencialmente entre os tratamentos. Já a figura 29 b demonstra que os valores dos parâmetros do modelo $R^2 = 0,892$ e o $Q^2 = 0,696$ o que indicou um bom ajuste do modelo e previsibilidade aceitável. Para um modelo preditivo biológico é um valor aceitável de Q^2 é que seja superior a 0,4 (HRBEK et al., 2018 ; MA et al., 2020). A OPLS-DA como um método supervisionado é utilizado para obter uma melhor classificação e estabelecer os modelos discriminantes. Além disso, esta tem o poder de excluir mais facilmente variáveis independentes que não são relacionadas com a classificação e filtrar características variáveis das amostras (ARENDSSE et al., 2018). Quanto aos principais metabólitos do conjunto de dados da OPLS-DA foi igual ao da PLS-DA .Os resultados indicam que o modelo OPLS-DA pode ser utilizado para rastrear preliminarmente os metabólitos quantitativos específicos em amostras de fígado de bovino com diferentes tratamentos (KANG et al.,2022).

5.6 ANÁLISE UNTARGETED DE LIPÍDIOS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

Das 24 amostras analisadas por MALDI, duas foram descartadas, por não haver uma co-cristalização ideal. A matriz obtida possuía 22 amostras por 26 compostos, a normalização utilizada para a análise foi transformação log 10 e auto escalonamento, esta foi o modelo que apresentou melhor resultado.

Na análise Univariada foi realizada o teste t frente a dietas distintas convencional e subproduto para a eficiência alimentar. A figura 30 apresenta os principais recursos selecionados ($p < 0,05$).

Figura 30 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de lipídios de 22 amostras de fígado de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

Os círculos rosas apresentam picos acima do nível de significância, os valores de p foram transformados por $-\log_{10}$ para que os recursos mais significativos com valores de p menores sejam plotados mais acima no gráfico. Na tabela 13 estão apresentados os picos que foram considerados importantes para o conjunto de dados com 22 amostras.

Tabela 12- Recursos importantes identificados pelo teste t de 22 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.

	Peaks(mz/rt)	t.stat	p.value	-log10(p)	FDR
1	1058.5353	-3.9492	0.000792	3.1011	0.09428
2	786.6108	2.987	0.007285	2.1376	0.38651
3	788.6158	2.7432	0.012532	1.902	0.38651
4	758.5633	2.6715	0.014664	1.8338	0.38651
5	437.0811	-2.6162	0.016538	1.7815	0.38651
6	582.251.000	-2.4731	0.022489	1.648	0.38651
7	1216.7773	-2.4679	0.022736	1.6433	0.38651
8	388.8902	2.2862	0.033285	1.4778	0.45587
9	647.4396	-2.2692	0.034477	1.4625	0.45587
10	578.495.000	-2.1477	0.044175	1.3548	0.47603

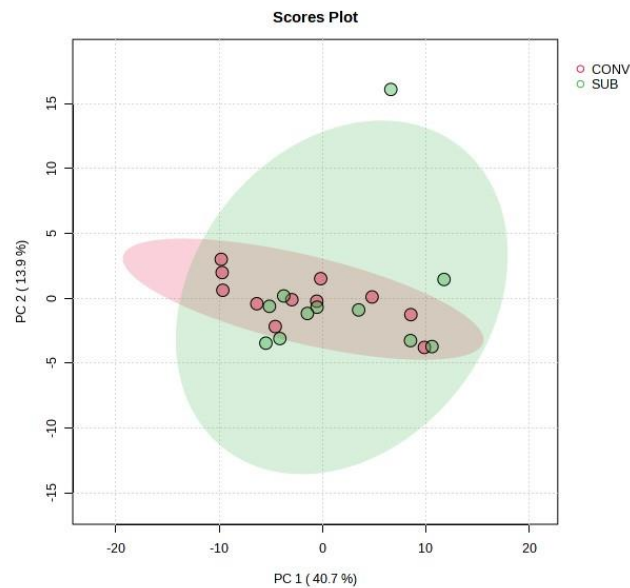
Fonte: autoria própria

Os valores da FDR para as amostras variaram entre 0.09428 a 0.47603, havendo a chance que haja falsos positivos, pois, o valor de FDR recomendado é até 0.2 (REINER, 2003; BENTO 2020).

5.7. ANALISE MULTIVARIADA DE 22 AMOSTRAS DE LIPÍDIOS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

Na PCA o número de componentes principais que foram necessários para descrever adequadamente o conjunto de dados em estudo foram 5 PCs, com 77,3 % de variância do modelo explicado. Os dados estão auto escalonados, para melhor distribuição dos dados. A figura 31 mostra a análise de componentes principais deste conjunto de dados.

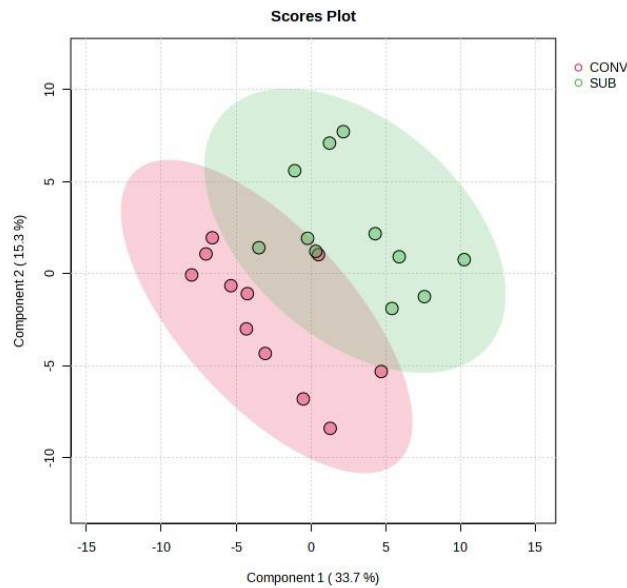
Figura 31- Gráfico de scores da PCA de lipídios de 22 amostras de fígado de bovinos frente a dieta distinta convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria.

Observa-se que a PCA tem limite de 95% de confiança quanto as componentes principais. A primeira explica 40.7 % da informação original dos dados e a segunda apenas 13,9 % totalizando 54,6 % da variância explicada. As massas observadas no MALADI apresentam uma maior variância, demonstrando que não há uma separação de classes efetiva (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020). A figura 32 apresenta o resultado da análise de PLS-DA, demonstrando que este método apresentou melhores resultados para diferenciar as classes.

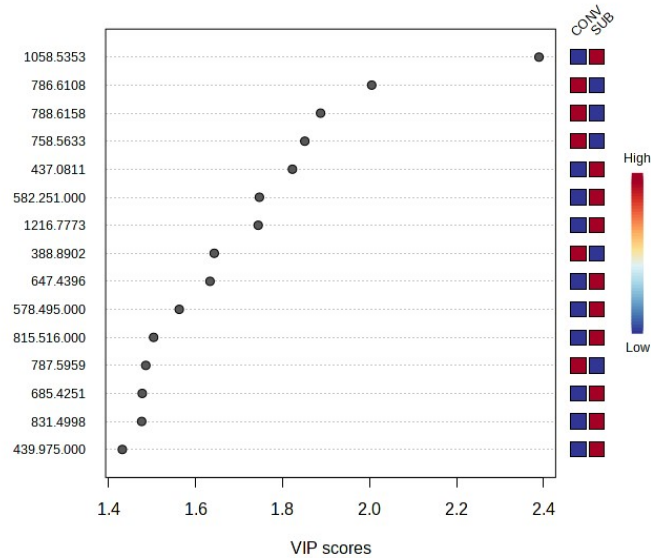
Figura 32 - Gráfico de Scores de PLS-DA de lipídios de 22 amostras de fígado de bovinos de corte Nelores com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria.

A figura 32 demonstrou que a distribuição dos dados apresentou sobreposição parcial entre os grupos. Esse resultado indica que poucas variáveis são expressas diferencialmente entre os tratamentos. A primeira componente tem 33,7 % da variância explicada, já a segunda componente 15,3%. Desta forma totalizando 49,9% do modelo explicado, menos de 49%, ou seja, não sendo o melhor modelo para este conjunto de dados (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020; POLIZEL et al., 2022). Os principais lipídios para este conjunto de dados estão representados abaixo na figura 33.

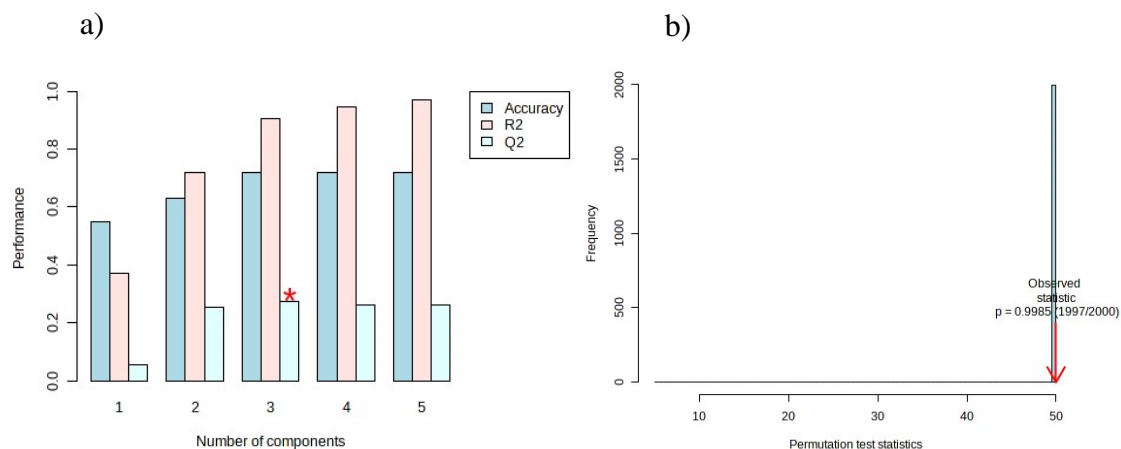
Figura 33 - Gráfico da análise da importância dos compostos apolares na projeção do conjunto de dados de 22 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

O VIP é a soma ponderada dos quadrados da carga de PLS levando em consideração a quantidade de variância Y explicada na dimensão. As pontuações VIP foram calculadas para cada componente. Desta forma estas são os íons do MALDI mais importante para o conjunto de dados. Na figura 34 os valores que foram obtidos pelo conjunto de dados dos testes realizados trazem informações sobre acurácia, R^2 , Q^2 e o valor de p.

Figura 34 — Gráfico de figuras de méritos do PLSDA dos compostos apolares das 22 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.



Fonte: autoria própria

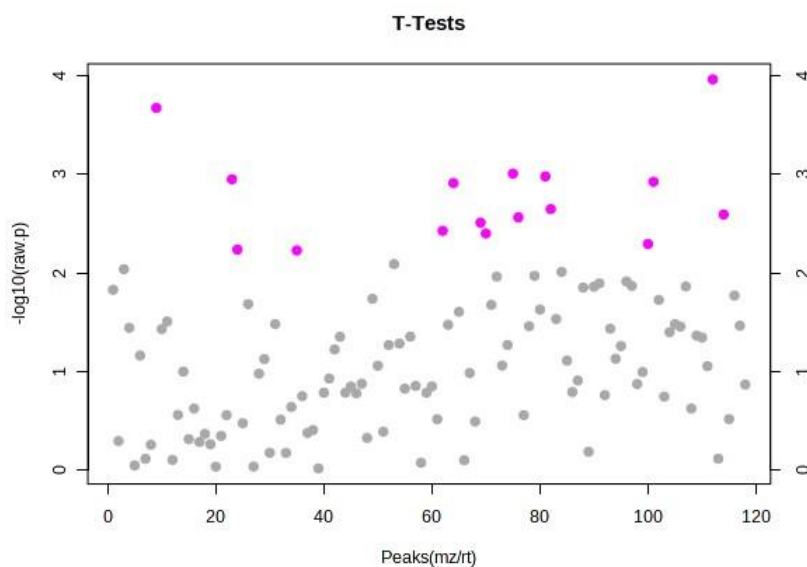
Os valores de R², Q², acurácia na terceira componente foi de 0,90625, 0,27411 e 0,72 respectivamente. A performance do modelo geral demonstrou que este conjunto de dados não obteve uma boa previsão, já que o valor da relação R²/Q² <0,7. Além disso alguns pesquisadores afirmam que para experimentos biológicos valores de Q² > 0,4 e R² > 0,7 são aceitáveis, no entanto, estes valores não foram encontrados neste estudo (GODZIEN et al., 2013; SOUZA, 2022). O modelo tem precisão ótima pois a acurácia informa a porcentagem de predições corretas como uma predição real. Quanto ao valor de R² demonstrou que o modelo está bem ajustado (SZYMAŃSKA et al.,2012). O valor de p indica o desempenho geral do modelo, a figura 35 b demonstra que o valor de p foi 0,9985, que informa que a classificação não foi significativa por isso não há separação entre os grupos (FATTUONI et al., 2016).

5.8 ANÁLISE TARGETED DAS 22 AMOSTRAS DE LÍPIDIOS DE FÍGADOS DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

Para a análise do conjunto de dados obtidos da análise de compostos apolares. Realizou-se diversas normalizações no metaboanalyst com a matriz de 22 amostras por 119 compostos e após a exclusão de algumas amostras (*outliers*) e manteve se o modelo que apresentou melhor resultado. A nova matriz, possuía 17 amostras por 119 compostos, a normalização utilizada para a transformação de dados: log 10 e auto escalonamento. Na análise univariada foi realizado o teste t com 17 amostras, para avaliar se os valores

médios obtidos para cada grupo do conjunto de dados eram significativamente diferentes ou não, representado abaixo na figura 35.

Figura 35 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria.

Os círculos rosas apresentam metabolitos acima do limite, os valores de p foram transformados por $-\log_{10}$ para que os lipídios mais significativos com valores de p menores sejam plotados mais acima no gráfico. Abaixo na tabela 14 é apresentado os lipídios que foram considerados importantes para o conjunto de dados com 17 amostras.

Tabela 13- Lipídios importantes identificados pelo teste t de 17 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.

N°	Lipídios	t.stat	p.value	-log10(p)	FDR
1	CDP-DG(18:1(11Z) 22:3(10Z,13Z,16Z))	-5.1997	0.0001078	3.9673	0.012397
2	Ovalitenona	-4.8547	0.0002101	3.6775	0.012397
3	PE-Cer(d14:2(4E,6E) 16:0(2OH))	-4.084	0.0009775	3.0099	0.020557
4	Zucchini factor B	-4.0511	0.0010449	2.9809	0.020557
5	Prodelphinidin B6	-4.0185	0.0011166	2.9521	0.020557
6	PI(P-16:0 18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	-3.99	0.0011831	2.927	0.020557
7	Tetrahydroaldosterone-3-glucuronide	-3.9751	0.0012195	2.9138	0.020557
8	PA(20:3(8Z,11Z,14Z) 15:0)	-3.6768	0.0022433	2.6491	0.032108
9	CDP-DG(i-24:0 i-24:0)	-3.6149	0.0025468	2.594	0.032108
10	PA(18:0 14:1(9Z))	-3.5826	0.002721	2.5653	0.032108
11	Cer(d18:0 16:0)	-3.5225	0.0030783	2.5117	0.033021
12	Achyranthoside D	-3.4287	0.0037311	2.4282	0.036031
13	PS(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z) 0:0)	-3.3986	0.0039696	2.4013	0.036031
14	PE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z) 22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	-3.2789	0.0050737	2.2947	0.042764
15	S-(1,2-Dichlorovinyl)glutathione	-3.2148	0.0057861	2.2376	0.043543
16	6,14,16-tribromo-5Z,7E,9E,13E,15Z-hexadecapentaenoic acid	-3.2049	0.0059041	2.2288	0.043543
17	Anabsinthin	-3.0486	0.0081264	2.0901	0.056407
18	N-(2R-hidroxiheicosanoil)-4R-hidroxi-14-metil-pentadecas nganina	-2.9892	0.0091714	2.0376	0.060124
19	PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z) 13:0)	-2.9592	0.0097484	2.0111	0.060543
20	PG(14:1(9Z) 14:1(9Z))	-2.9136	0.010694	1.9708	0.061253
21	PSA(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z) 0:0)	-2.9042	0.010901	1.9625	0.061253
22	PC(15:0 22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	-2.849	0.012191	1.914	0.06153
23	1-(6-[3]-ladderane-hexanoyl)-2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glicero-3-phospho-(1 - sn-glicerol)	-2.8267	0.012755	1.8943	0.06153
24	PI(P-16:0 16:1(9Z))	-2.7977	0.013521	1.869	0.06153
25	PI(16:1(9Z) 18:3(6Z,9Z,12Z))	-2.7908	0.013712	1.8629	0.06153
26	PS(20:1(11Z) 15:0)	-2.7884	0.013779	1.8608	0.06153
27	PC(18:2(9Z,12Z) 16:0)	2.7777	0.014079	1.8514	0.06153
28	N-(3E-hexadecenoyl)-deoxysphing-4-enine-1-sulfonate	-2.7522	0.014822	1.8291	0.062463
29	Ganglioside GM3 (d18:1 20:0)	-2.6854	0.016947	1.7709	0.068957
30	PE(10:0 10:0) 1,2-didecanoyl-sn-glicero-3-phosphoethanolamine	-2.6474	0.018285	1.7379	0.071504
31	PE(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z) 20:3(5Z,8Z,11Z))	-2.6339	0.018785	1.7262	0.071504
32	Axillarin 7-sulfate	-2.5847	0.020722	1.6836	0.07543
33	Calyxin A	-2.5757	0.021095	1.6758	0.07543
34	Cyanidin 3-(2 -glucuronosylglucoside)	-2.5202	0.023549	1.628	0.08173
35	PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z) 0:0)	-2.4936	0.024819	1.6052	0.083675
36	PE(18:2(9Z,12Z) 14:1(9Z))	-2.4072	0.029409	1.5315	0.095299
37	N-(2-hidroxihexacosanoil)-eicosas nganina	-2.378	0.031132	1.5068	0.095299
38	1-Phosphatidyl-1D-myo-inositol 3-phosphate	-2.3469	0.033074	1.4805	0.095299
39	PI-Cer(d20:0 16:0(2OH))	2.3462	0.033123	1.4799	0.095299
40	Cinnassiol A 19-glucoside	-2.3381	0.033647	1.4731	0.095299
41	Fucalpa1-2Galalpha1-3Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1 20:0)	-2.3264	0.034419	1.4632	0.095299
42	NAD	-2.3208	0.034792	1.4585	0.095299
43	PS(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z) 22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	-2.3165	0.035084	1.4549	0.095299
44	CerP(d18:0 16:0)	-2.3015	0.036121	1.4422	0.095299
45	PE(22:1(11Z) 17:1(9Z))	2.2907	0.036881	1.4332	0.095299
46	2-O-Acetyl-trans-coutaric acid	-2.2869	0.03715	1.43	0.095299

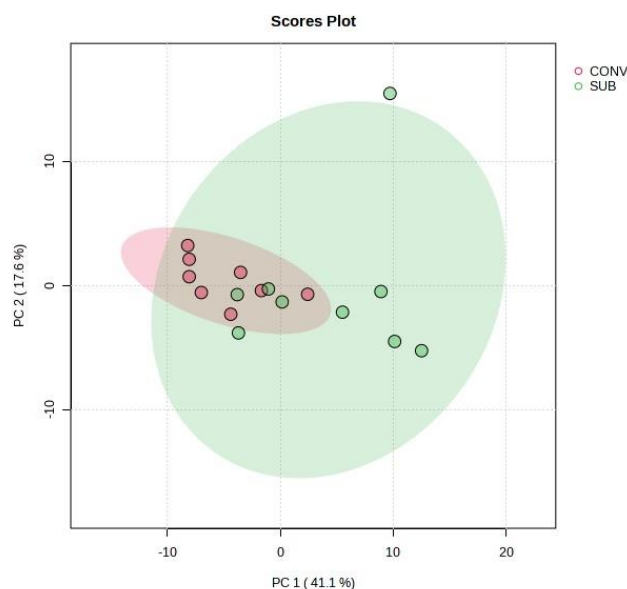
Fonte: autoria própria

Os dados apresentados na tabela 14 demonstram que 46 lipídios foram significativos para o conjunto de dados ($p < 0,05$). Quanto aos valores de FDR para as amostras variou entre 0,012 a 0,09. Desta forma, todos os dados são significativos já que não há falsos positivos (REINER, 2003; BENTO 2020). O trabalho de Antonelo et al (2022) que avaliou o lipidoma de bovinos empregando o teste t de Student, sendo consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$ e marginalmente significativas quando $0,05 \leq P \leq 0,10$. O que corrobora com os dados desse estudo.

5.9 ANÁLISE MULTIVARIADA DE 22 AMOSTRAS DE LIPÍDIOS DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO PARA A EFICIÊNCIA ALIMENTAR.

Na análise de componentes principais do conjunto de dados de lipídios de 17 amostras de fígado de nelores, foram necessárias 5 componentes principais representada com limite 83,1% de confiança para a construção do modelo. A PCA está representada na figura 36 abaixo. Observou-se que não há uma separação de classes efetiva, pois há uma sobreposição entre os grupos (figura 36) a normalização utilizada foi log de 10 e auto escalonamento.

Figura 36 - Gráfico de Scores de PCA de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria.

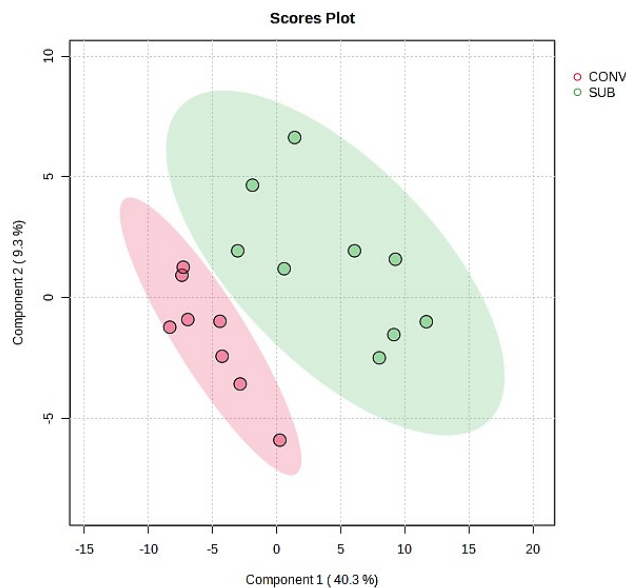
A primeira componente principal explica 41,1% e a segunda 17,6 %, mesmo com a retirada de *outliers* não foi possível a separação de classes. O que indica que o conjunto

de dados não continham informações suficientes. Já que a PCA maximiza as informações contidas nas variáveis, pois não possui a habilidade de dividir a variância dos dados, diferenciando as e as descrevendo (WITTEN; JAMES, 2013). Por isso, foi realizada a PLS-DA na figura 37. No trabalho de Antonelo et al (2022) observou se que as PCAs do método lipídico tiveram sobreposição. No entanto, eles observaram que as PCAs demonstravam que algumas amostras apresentavam agrupamentos que eram relativos ao pH e a ao horário da coleta de amostras após abate, demonstrando que diversos fatores influenciam na análise, que foram melhor visualizadas no agrupamento por métodos hierárquicos.

Já na pesquisa de Sun et al 2020, foram analisados a co-expressão gênica e análise de *splicing* alternativo de tecidos metabólicos da composição de ácidos graxos em bovinos. Observou que o gráfico PCA mostrou que os perfis de expressão dos locais de *splicing* em diferentes amostras foram agrupados por tecido (rúmen, fígado, músculo, e tecidos de gordura dorsal), e não houve separação entre as três raças, isso ocorreu, pois, uma vez que as três raças diferentes (Angus, Charolês e Kinsella) eram todas raças de gado de corte (para produção de carne) e criadas sob a mesma dieta e condições de manejo. Além disso o tecido ruminal apresentou os perfis de expressão do local de *splicing* mais diferentes e significativos quando comparado aos tecidos do fígado.

Já no trabalho de Alexandre et al (2015), foi analisado as redes transcriptômicas hepáticas em processos biológicos associados à eficiência alimentar em bovinos de corte de 98 touros nelores (sendo 16 amostras de extremos, 8 amostras de alta eficiência alimentar e 8 para baixa eficiência alimentar). Observaram que animais com baixa eficiência alimentar apresentam transcriptoma hepático associado a inflamação. Isto ocorre devido ao estresse gerado pela alteração do metabolismo lipídico e/ou devido ao aumento da infecção bacteriana devido ao maior consumo de ração.

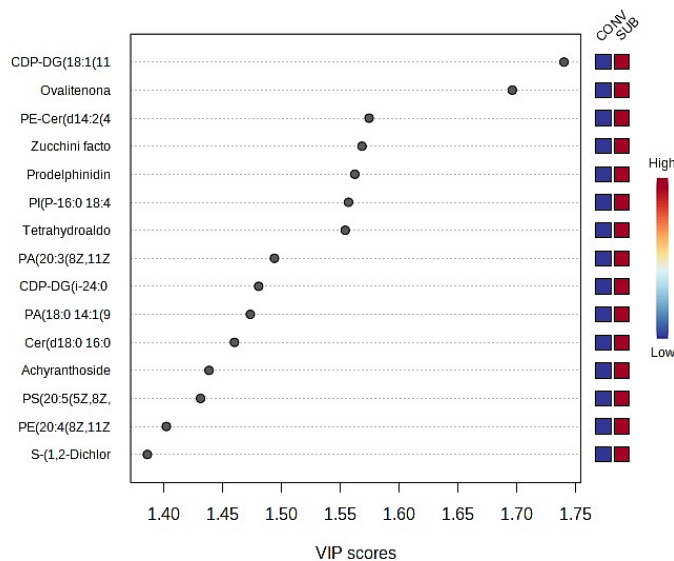
Figura 37 - Gráfico de Scores de PLS-DA de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos de corte Nelore com duas dietas alimentares distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria.

A distribuição dos dados não apresentou sobreposição entre os grupos, logo, este modelo descreveu as classes de amostras. Na qual indica que o perfil metabólico apresentou variáveis expressas diferencialmente entre os tratamentos. A primeira componente tem 40.4 % da variância explicada, já a segunda componente 10%. Desta forma totalizando 49,6 % do modelo explicado, quase 50% ou seja, representa que este modelo é aceitável para este conjunto de dados (OLIVERI; MALEGORI; CASALE, 2020; POLIZEL et al., 2022). Os principais metabólitos para este conjunto de dados estão representados abaixo na figura 38.

Figura 38 - Gráfico da análise da importância dos lipídios na projeção do conjunto de dados de 17 amostras de fígados de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

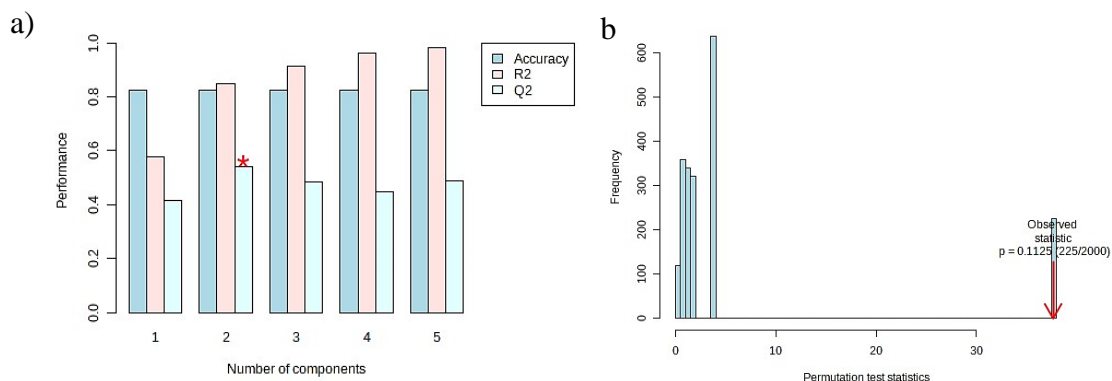
A figura 38 demonstrou os 15 principais lipídios para o conjunto de dados. Os indicadores são as variáveis no espaço de dados, com o número de indicadores extremamente reduzidos, as variações nos indicadores são mais prováveis de serem refletidas no vetor de resposta. Quanto as pontuações de cada modelo representam a importância de cada *feature*, ou seja, quanto mais alta, maior o efeito no modelo que está sendo usado para prever uma determinada variável. Neste conjunto de dados, houve uma variação de 1,3 a 1,8, deste modo, o metabolito mais importante é a CDP-DG (18:1(11Z)) /22:3(10Z,13Z,16Z), que foi encontrado em alta concentração em amostras de dieta de subprodutos. Segundo o HMDB, este é um glicerolfosfolipideo, além disso, um importante intermediário de ramificação na biossíntese de fosfolipídios eucarióticos e pode ser uma molécula reguladora chave no metabolismo dos fosfolipídios (MUKHERJEE; SENGUPTA; SIKDA,2015). Na figura 39, estão expressos os valores de acurácia, R^2 , Q^2 e o valor de p que foram obtidos pelos testes realizados no conjunto de dados.

No trabalho de Antonelo e pesquisadores (2022), os grupos de lipídios encontrados no músculo *Longissimus thoracis* relatados foram ceramidas, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, esfingomielina, acil-

carnitina, diacilglicerídeo, ácidos graxos livres e triacilglicerídeo. Desta forma este estudo demonstrou ser eficiente já que também encontrou a maioria dos grupos lipídicos.

Figura 39 - Gráfico de Figuras de méritos do PLSDA de lipídios das 42 amostras de fígado de bovinos frente a dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.

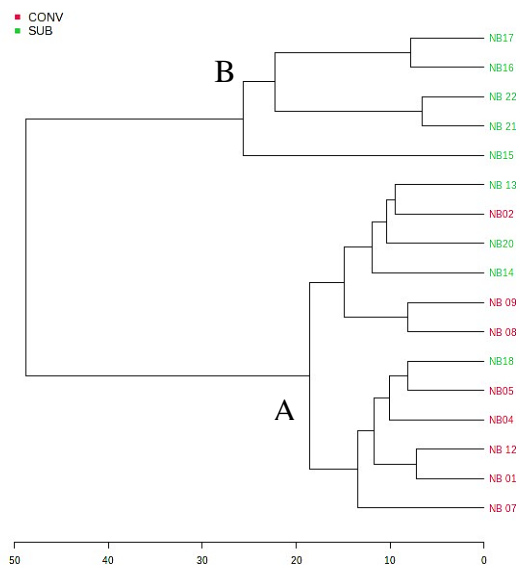
a) Valores de performance do modelo b) teste de permutação.



Fonte: autoria própria

Como pode se observar na figura 39 a, os valores de Q^2 foi satisfatório na segunda componente igual a 0,54025, portanto este modelo tem uma capacidade preditiva. Em amostras biológicas, o Q^2 maior que 0,4 são aceitáveis, portanto é confiável. Já os valores de R^2 e acurácia foram 0,84718 e 0,82353 respectivamente. Desta forma, o modelo está bem ajustado, e demonstra que as 2 componentes foram suficientes para prever o modelo com precisão ótima, ou seja, uma predição real. (SZYMAŃSKA et al, 2012; GODZIEN et al., 2013; SOUZA, 2022). Já a figura 39 b demonstra que o valor de p foi 0,1125, somente 225 predições de 2000 foi corretamente classificada e, portanto, aceitável. Já que o número de amostras é relativamente pequeno, quanto mais à direita classificação, mais significativa é a separação entre dois grupos, portanto o poder preditivo do modelo (FATTUONI et al., 2016). Na figura 40 abaixo mostra outro método não supervisionado que são recomendados para reconhecer padrões entre os grupos de amostras a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos HCA (FERREIRA,2015).

Figura 40 - Gráfico da análise de agrupamentos por métodos hierárquicos de lipídios de 17 amostras de fígado de bovinos nelores frente a duas dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

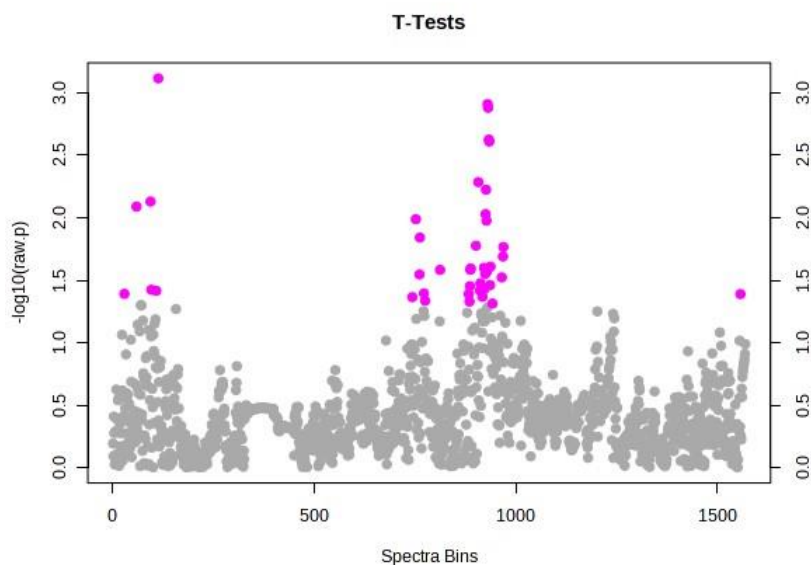
Ao se analisar a HCA da figura 40 observa-se que o grupo mais relevante é o que apresenta maior índice de similaridade e que expõe ramos pequenos nos galhos mais distantes da árvore. Desta forma o tronco longo que une os grupos A e B demonstra que estes estão distantes entre si. O grupo A está mais espalhado e é constituído de dois grupos que são similares ao se comparar com o grupo B. Já o B é relativamente mais compacto (FERREIRA,2016).

5.10 ANÁLISE UNIVARIADA DA CORRELAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS COMPOSTOS POLARES (METABÓLITOS) E APOLARES (LIPÍDIOS) DE FÍGADO DE BOVINOS NELORES FRENTE A DIETAS DISTINTAS CONVENCIONAL E SUBPRODUTO.

O modelo de classificação será construído com os binnings das análises de ¹H RMN e MALDI-TOF/MS de 22 amostras de fígado de bovinos nelores, como este conjunto dos testes é bastante pequeno, qualquer diagnóstico resultante terá uma elevada incerteza e deve ser avaliado com cautela (BRO RASMUS et al., 2013). Quanto a normalização utilizada no Metaboanalyst 5.0 foi escolhido o métodos de raiz cúbica e auto escalonamento comparando com a segunda melhor normalização log 10 e auto

escalonamento, a única diferença foram os valores estatísticos da oPLS-DA. A primeira análise realizada foi o teste t (figura 41).

Figura 41 - Gráfico de recursos importantes selecionados por testes t com limite de 0,05 da correlação de dados de compostos polares e apolares de 22 amostras de fígado de bovinos nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



Fonte: autoria própria

Os círculos rosas apresentam os recursos acima do limite, os valores de p foram transformados por $-\log_{10}$ para que os lipídios e metabólitos mais significativos com valores de p menores sejam plotados mais acima no gráfico. De acordo com a figura apenas 41 compostos (polares e apolares) foram significativos de 1569. Abaixo na tabela 15 é apresentado os lipídios que foram considerados importantes para o conjunto de dados com 22 amostras.

Tabela 14-Tabela de recursos importantes identificados pelo teste t da correlação de dados de compostos polares e apolares de 22 amostras de fígados de bovinos Nelores com dietas distintas convencional e subproduto para eficiência alimentar.

	spectra bins	t.sat	p.value	-log10(P)	FDR
1	1058.5353	-3.9638	0.0007657	3.116	0.68867
2	2.558	-3.7615	0.0012281	2.9108	0.68867
3	2.554	-3.7316	0.0013168	2.8805	0.68867
4	2.546	-3.4793	0.0023658	2.626	0.77018
5	2.542	-3.4634	0.0024544	2.6101	0.77018
6	2.65	-3.1375	0.0051842	2.2853	0.83806
7	2.574	-3.0757	0.0059641	2.2245	0.83806

8	786.6108	2.9791	0.0074164	2.1298	0.83806
9	553.1352	-2.9375	0.0081414	2.0893	0.83806
10	2.578	-2.8755	0.0093518	2.0291	0.83806
11	3.27	-2.8331	0.010276	1.9882	0.83806
12	2.57	-2.821	0.010554	1.9766	0.83806
13	3.23	-2.6793	0.014415	1.8412	0.83806
14	2.674	-2.6106	0.016739	1.7763	0.83806
15	2.402	-2.5991	0.017161	1.7655	0.83806
16	2.406	-2.5176	0.020448	1.6894	0.83806
17	2.53	-2.4299	0.024642	1.6083	0.83806
18	2.594	-2.4203	0.025152	1.5994	0.83806
19	2.726	-2.414	0.025487	1.5937	0.83806
20	2.73	-2.4031	0.026077	1.5837	0.83806
21	3.03	2.4015	0.026165	1.5823	0.83806
22	2.566	-2.3869	0.02698	1.569	0.83806
23	2.582	-2.3658	0.028205	1.5497	0.83806
24	3.234	-2.3618	0.028438	1.5461	0.83806
25	2.418	-2.3357	0.030031	1.5224	0.83806
26	2.63	-2.2828	0.033519	1.4747	0.83806
27	2.534	-2.2669	0.034636	1.4605	0.83806
28	2.734	-2.2573	0.035331	1.4518	0.83806
29	2.59	-2.2317	0.037239	1.429	0.83806
30	788.6158	2.2251	0.037743	1.4232	0.83806
31	2.634	-2.2183	0.03827	1.4171	0.83806
32	831.4998	-2.2156	0.038485	1.4147	0.83806
33	3.19	-2.192	0.040383	1.3938	0.83806
34	455.0718	-2.1881	0.040701	1.3904	0.83806
35	2.746	-2.1869	0.040802	1.3893	0.83806
36	0.05	-2.1859	0.040882	1.3885	0.83806
37	2.61	-2.1617	0.042941	1.3671	0.83806
38	3.306	-2.1586	0.043211	1.3644	0.83806
39	3.178	-2.1262	0.046126	1.3361	0.83806
40	2.738	-2.1178	0.046914	1.3287	0.83806
41	2.51	-2.0992	0.048694	1.3125	0.83806

Fonte: autoria própria

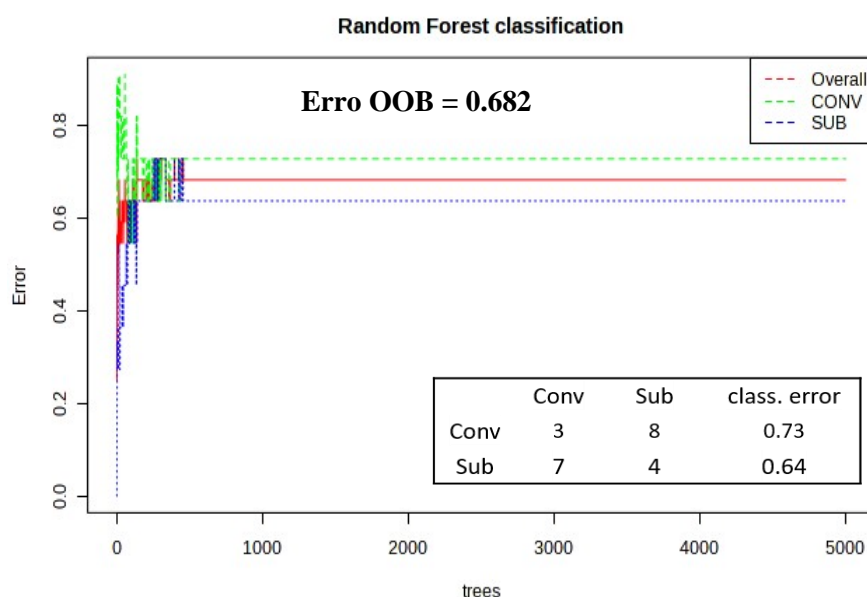
Os dados apresentados na tabela 15 demonstram que 41 compostos foram significativos para o conjunto de dados. Todos apresentaram o valor de $p < 0,05$. A maioria dos recursos selecionados foram compostos polares. Quanto aos valores de FDR para as amostras variou entre 0,6 a 0,8 ou seja estes valores não está de acordo com o

recomendado na literatura (máximo 0,2). O que representa que neste conjunto de dados possa ter falsos positivos (REINER, 2003; BENTO 2020).

5.11 Análise multivariada da correlação dos dados obtidos compostos polares (metabólitos) e apolares (lipídios) de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas convencional e subproduto.

Para a busca de biomarcadores a utilização do Random Forest se faz necessário, já que este é eficaz e robusto para conjunto de amostras que possuem uma grande variabilidade de dados (Souza,2022). A figura 42 abaixo apresenta o modelo de classificação do Random Forest.

Figura 42- Gráfico do Modelo de classificação do Random Forest para a correlação dos compostos (polares e apolares) das 22 amostras de fígados de bovinos nelores frente a dietas convencional e subproduto para eficiência alimentar.



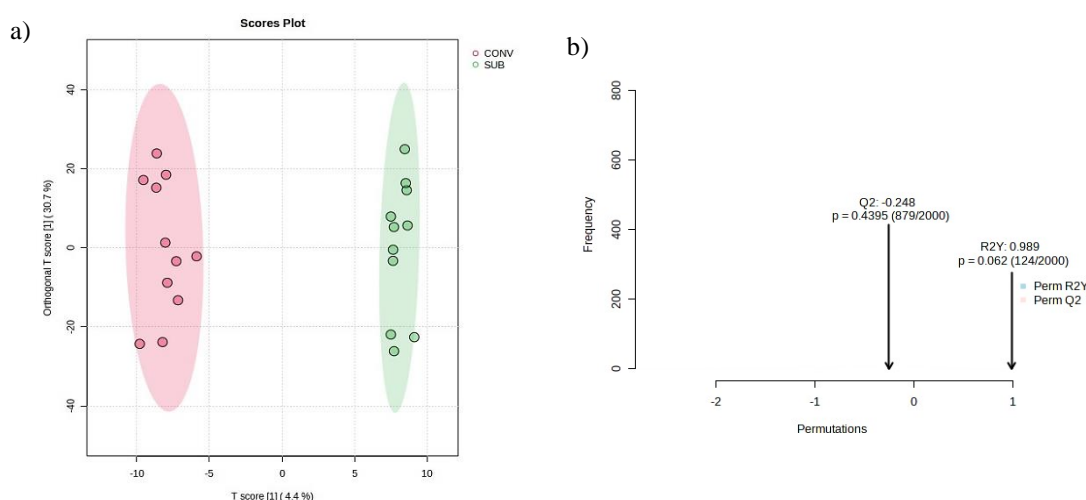
Fonte: autoria própria.

Este modelo representado na figura 42 foi analisado pela estimativa de erros, utilizou-se o *out of bag* (OOB) a partir da matriz de confusão esta indica o número de classes que foram atribuídas corretamente ou incorretamente a cada grupo analisado. O erro OOB foi alto 0,682 já o erro de classificação da classe convencional e subproduto 0,773 e 0,64 respectivamente, este resultado demonstra que as classes foram atribuídas incorretamente. Logo este modelo tem baixa sensibilidade e seletividade. Este método é confiável pois usa a metodologia CART que consiste em classificação e regressão, o método de RF é considerado robusto quando comparado a diferentes métodos de classificação do PLS (CHEN et al., 2013; LEE; ULLAH; WANG 2020). Por isso não irá

se realizar análise de PCA e PLSDA, já que os grupos não têm variáveis suficientes para a classificação (BALLABIO,2015; SOUZA ,2022).

No trabalho de Acharjee, et al., (2016) que estudaram a integração de dados metabolômicos, lipidômicos e clínicos usando um método de aprendizado de máquina o random forest foi utilizado para fusão de dados, que é um método de conjunto de aprendizado de máquina em conjunto com vários algoritmos de aprendizado para obter melhor desempenho preditivo, a diferença está no software utilizado (R). Na figura 43 abaixo é apresentada a figura de escores e o teste de permutação do modelo de OPLS-DA este método conseguiu separar as amostras conforme o tratamento e dietas.

Figura 43 - Gráfico do modelo de OPLS-DA de metabolitos de 42 amostras de fígado de bovinos nelores frente a dietas distintas calculado para discriminação entre os grupos Convencional e Subproduto (a). Resultado do teste de permutação do OPLS-DA (b).



Fonte: autoria própria.

A figura 43 a demonstra que na primeira componente há uma explicação de 4,4% e a segunda componente 30,7 % com uma explicação total de 35,1% a distribuição dos dados descreveu as classes de amostras. Observa-se que há a separação das dietas, desta forma apresentou variáveis expressas diferencialmente entre os tratamentos. Já a figura 43 b demonstra que os valores dos parâmetros do modelo $R^2 = 0,989$ e o $Q^2 = -0,248$, no entanto este método não indicou um bom ajuste do modelo e previsibilidade aceitável. (HRBEK et al., 2018 ; MA et al., 2020).

No trabalho de Lobo (2023) que avaliou intensidade de emissão de metano, fermentação e dinâmica ruminal de 40 bovinos nelores, demonstrou que há uma variação da emissão de metano nas diferentes estações do ano, assim como nos diferentes sistemas

de pastejos (degradada, irrigada, florestal, siqueiro e/ou moderda e lotada). Além disso foram encontrados biomarcadores de metano no rúmen que já são relatados na literatura acetato propionato e butirato e para análise das amostras utilizaram a cromatografia gasosa que é mais sensível ao se comparar com o RMN. Já Oliveira e pesquisadores (2018) ao analisarem o efeito da intensificação do sistema de pastoreio no crescimento e na qualidade da carne (*Longissimus thoracicus*) de bovinos de corte nelores no bioma Mata Atlântica brasileira intensificação dos sistemas de pastejo melhora o crescimento e o desenvolvimento muscular de bovinos Nelore de corte.

A pesquisa de Fonseca et al (2019) demonstrou que o metabolismo hepático alterado e a inflamação hepática pronunciada em animais com baixa eficiência alimentar, que o aumento da carga bacteriana é, pelo menos em parte, responsável pelas lesões hepáticas e inflamação nestes animais. Por isso é necessário o estudo de eficiência alimentar o trabalho de Honan et al (2021), demonstra que os aditivos alimentares nas dietas de bovinos atuam inibindo a metanogênese ou modificando o ambiente ruminal, de modo que a produção de CH₄ (g/dia) é reduzida. Já no estudo de Cassiano (2017) que consiste na adição de nitrato de cálcio na dieta de bovinos, observou se que este não foi eficiente para diminuir as emissões de metano, sendo que o fator genético foi o que mais interferiu sobre os parâmetros avaliados.

6. CONCLUSÃO

As análises por RMN permitiram identificar as regiões importantes para a caracterização do grupo de estudo, assim como identificar e quantificar os metabolitos das 52 amostras do fígado de bovinos Nelore em fase de separação polar. Já as análises de MALDI permitiram identificar os lipídios da fase apolar. Foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos (dietas convencional e subproduto). No entanto não foi possível encontrar biomarcadores a fim de promover a associação com as vias metabólicas e a mitigação de emissão metano. Sendo estes, influenciados por diversos fatores: genótipos e fenótipos dos bovinos nelores, peso e tempo após abate. Deve-se considerar também que a técnica de RMN não é tão sensível ao se comparar com outras técnicas mais empregadas, como o GC-MS. Por fim, com este estudo foi possível contribuir com o hologenoma nelore já que traz informações (identificação e quantificação) de compostos que compõe o fígado destes ruminantes.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas para o estudo, pretende-se aumentar o número de amostras após a identificação das 28 amostras que já foram analisadas por MALDI. Com isso espera-se obter um número maior de informações para descrever as classes para serem realizadas análises estatísticas, univariada e multivariada. Pretende-se ainda, correlacionar os dados obtidos e espera-se encontrar os possíveis biomarcadores para a mitigação de emissão metano. Após realizar uma seleção mais eficiente de todos os fenótipos. Além do uso dos softwares Matlab e R para que tenha melhorias na análise e também realizar os diagnósticos propostos no artigo de (BRO RASMUS et al., 2013).

8. REFERÊNCIAS

ACHARJEE, A.; AMENT, Z.; WEST, J. A.; STANLEY, E.; GRIFFIN, J. L. Integration of metabolomics, lipidomics and clinical data using a machine learning method. **BMC Bioinformatics**, London, v. 17, n. 15, p. 37-49, 2016.

ALEXANDER, D. L.; TROPSHA, A.; WINKLER, D. A. Beware of R 2: simple, unambiguous assessment of the prediction accuracy of QSAR and QSPR models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, DC, v. 55, n. 7, p. 1316-1322, 2015.

ALEXANDRE, P. A.; KOGELMAN, L. J.; SANTANA, M. H.; PASSARELLI, D.; PULZ, L. H.; FANTINATO-NETO, P.; SILVA, P. L.; LEME, P. R.; STREFEZZI, R. F.; COUTINHO, L. L.; FERRAZ, J. B.; ELER, J. P.; KADARMIDEEN, H. N.; FUKUMASU, H. Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genomics**, London, v. 16, p. 1-13, 2015.

ALMEIDA, L. S **Investigação de sibilância recorrente e não recorrente em lactentes usando metabonômica baseada em RMN de 1H**. 2021. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

ANDRADE, B. G.; BRESSANI, F. A.; CUADRAT, R. R.; CARDOSO, T. F.; MALHEIROS, J. M.; DE OLIVEIRA, P. S.; PETRINI, J.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L.; REECY, J. M.; KOLTES, J. E.; NETO, A. Z.; R DE MEDEIROS, S.; BERNDT, A.; PALHARES J. C. P.; AFLI, H.; REGITANO, L. C. Stool and ruminal microbiome components associated with methane emission and feed efficiency in Nelore beef cattle. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 13, p. 812828, 2022.

ANGELO, C.; RITTL, C. **Análise das emissões brasileiras de gases de efeito estufa e suas implicações para as metas do Brasil, 1970-2018**. [S. l.]: SEEG, 2019. p. 1-33.

ANTONELO, D. S.; DOS SANTOS-DONADO, P. R.; FERREIRA, C. R.; COLNAGO, L. A.; OCAMPOS, F. M.; RIBEIRO, G. H.; VENTURA, R. V.; GERRARD, D. E.; DELGADO, E.F.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; BALIEIRO, J. C. Exploratory lipidome and metabolome profiling contributes to understanding differences in high and normal ultimate pH beef. **Meat Science**, Amsterdam, v. 194, p. 108978, 2022.

ARENDSE, E.; FAWOLE, O. A.; MAGWAZA, L. S.; NIEUWOUDT, H.; OPARA, U. L. Evaluation of biochemical markers associated with the development of husk scald and the use of diffuse reflectance NIR spectroscopy to predict husk scald in pomegranate fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 232, p. 240-249, 2018.

ARMSTRONG, D. G. Evaluation of artificially dried grass as a source of energy for sheep: II. The energy value of cocksfoot, timothy and two strains of rye-grass at varying stages of maturity. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 62, n. 3, p. 399-416, 1964.

ARTEGOITIA, V. M.; FOOTE, A. P.; LEWIS, R. M.; FREETLY, H. C. Metabolomics profile and targeted lipidomics in multiple tissues associated with feed efficiency in beef steers. **ACS Omega**, Washington, DC, v. 4, n. 2, p. 3973-3982, 2019.

ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; JOHNSTON, D. J.; HERD, R. M.; RICHARDSON, E. C.; PARNELL, P. F. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 79, n. 11, p. 2805-2811, 2001.

BACIL, G. P.; ROMUALDO, G. R.; PIAGGE, P. M.; CARDOSO, D. R.; VINKEN, M.; COGLIATI, B.; BARBISAN, L. F. Unraveling hepatic metabolomic profiles and morphological outcomes in a hybrid model of nash in different mouse strains. **Antioxidants**, Basel, v. 12, n. 2, p.290, 2023.

BALLABIO, D. A MATLAB toolbox for principal component analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 149, p. 1-9, 2015.

BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**. New York, v. 5, n. 16, p. 3790-3798, 2013.

BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; AALHUS, J. L.; OKINE, E. K.; SNELLING, W. M.; LYLE, K. L. Residual feed intake and body composition in young growingcattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 2, p. 189-204, 2003.

BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L.; BUCHOLTZ, H. F. Propionate production in the rumen of cows fed either a control or high-grain, low-fiber diet. **Journal of Dairy Science**, New York, Champaign, v. 54, n. 9, p. 1282-1287, 1971.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 83, n. 3, p. 653-661, 2005.

BENTO, B. C. **Análise estatística de dados de metabolómica: identificação dos compostos envolvidos na resposta das plantas à simbiose com fungos ectomicorrízicos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Bioestatística) – Faculdade de Ciências. Departamento de Estatística e Investigação Operacional, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2020.

BINGOL, K.; BRUSCHWEILER-LI, L.; LI, D.; ZHANG, B.; XIE, M.; BRÜSCHWEILER, R. Emerging new strategies for successful metabolite identification in metabolomics. **Bioanalysis**, London, v. 8, n. 6, p. 557-573, 2016.

BINGOL, K.; BRÜSCHWEILER, R.; Multidimensional approaches to NMR-based metabolomics. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 86, n. 1, p. 47-57, 2014.

BLAXTER, K. L.; WAINMAN, F. W. The utilization of the energy of different rations by sheep and cattle for maintenance and for fattening. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 63, n. 1, p. 113-128, 1964.

BRASIL. Decreto nº N.º 11.075, de 19 de maio de 2022, Art. 7º, de 19 de maio de 2022. Planos setoriais de mitigação das mudanças climáticas, institui o Sistema Nacional de Redução de Emissões de Gases de Efeito Estufa. Mitigação das mudanças climáticas: coletânea de legislação e jurisprudência. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, Edição Extra - A, 19 maio 2022. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2022/decreto-11075-19-maio-2022-792682-publicacaooriginal-165314-pe.html>. Acesso em: 15 ago. 2023.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 12.187, de 29 de dezembro de 2009.** Institui a Política Nacional sobre Mudança do Clima - PNMC e dá outras providências. Brasília, 2010. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/Lei/L12187.htm. Acesso em: 15 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Ministério das Relações Exteriores. **Intended Nationally Determined Contribution towards achieving the objective of the United Nations Framework Convention on Climate Change.** Brasília, DF, MCTI, 2015.

BRERETON, R. G.; JANSEN, J.; LOPES, J.; MARINI, F.; POMERANTSEV, A.; RODIONOVA, O.; ROGER, J. M.; WALCZAK, B.; TAULER, R. Chemometrics in analytical chemistry—part I: history, experimental design and data analysis tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 409, p. 5891-5899, 2017.

BRO, R.; NIELSEN, H. J.; SAVORANI, F.; KJELDAHL, K.; CHRISTENSEN, I. J.; BRÜNNER, N.; LAWAETZ, A. J. Data fusion in metabolomic cancer diagnostics. **Metabolomics**, New York, v. 9, p. 3-8. 2013.

BUSZEWSKA-FORAJTA, M.; POMASTOWSKI, P.; MONEDEIRO, F.; KRÓL-GÓRNIAK, A.; ADAMCZYK, P.; MARKUSZEWSKI, M. J.; BUSZEWSKI, B. New approach in determination of urinary diagnostic markers for prostate cancer by MALDI-TOF/MS. **Talanta**, Amsterdam, v. 236, p. 122843, 2022.

CANUTO, G. A.; COSTA, J. L. D.; DA CRUZ, P. L.; SOUZA, A. R. L. D.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; TAVARES, M. F. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, p. 75-91, 2018.

CARVALHO, M. E.; GASPARIN, G.; POLETI, M. D.; ROSA, A. F.; BALIEIRO, J. C. C.; LABATE, C. A.; COUTINHO, L. L. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 1318-1324, 2014.

CASSIANO, E. C. O. **Nitrato de cálcio como mitigador da emissão de metano em bovinos.** 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

CHATTERJEE, S.; SINGH, B.; DIWAN, A.; LEE, Z.R.; ENGELHARD, M. H.; TERRY, J.; TOLLEY, H. D.; GALLAGHER, N. B.; LINFORD, M. R. A perspective on two chemometrics tools: PCA and MCR, and introduction of a new one: Pattern Recognition Entropy (PRE), as applied to XPS and ToF-SIMS depth profiles of organic and inorganic materials. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 433, p. 994-1017, 2018.

CHEN, H. K.; WANG, L. H.; CHEN, W. N. U.; MAYFIELD, A. B.; LEVY, O.; LIN, C. S.; CHEN, C. S. Coral lipid bodies as the relay center interconnecting diel-dependent lipidomic changes in different cellular compartments. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

CHEN, T.; CAO, Y.; ZHANG, Y.; LIU, J.; BAO, Y.; WANG, C.; JIA, W.; ZHAO, A. Random forest in clinical metabolomics for phenotypic discrimination and biomarker selection. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, p.1-11, 2013.

- CHRISTOPHERSEN, C. T.; WRIGHT, AD G.; VERCOE, P. E. In vitro methane emission and acetate: propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 384-389, 2008.
- COBAS, J. C.; BERNSTEIN, M. A.; MARTÍN-PASTOR, M.; TAHOSES, P. G. A new general-purpose fully automatic baseline-correction procedure for 1D and 2D NMR data. **Journal of Magnetic Resonance**, Maryland Heights, v. 183, n. 1, p. 145-151, 2006.
- CONNOLLY, S.; DONA, A.; WILKINSON-WHITE, L.; HAMBLIN, D.; D'OCCHIO, M.; GONZÁLEZ, L. A. Relationship of the blood metabolome to subsequent carcass traits at slaughter in feedlot Wagyu crossbred steers. **Scientific Reports**, London, v.9, n. 1, p.15139, 2019.
- CÔNSOLO, N. R. B.; FERRARI, V. B.; MESQUITA, L. G.; GOULART, R. S.; SILVA, L. F. P. Zilpaterol hydrochloride improves beef yield, changes palatability traits, and increases calpain-calpastatin gene expression in Nelore heifers. **Meat Science**, Amsterdam, v. 121, p. 375-381, 2016.
- CORBETT, J. L.; LANGLANDS, J. P.; MCDONALD, I.; PULLAR, J. D. Comparison by direct animal calorimetry of the net energy values of an early and a late season growth of herbage. **Animal Science**, Cambridge, v. 8, n. 1, p.13-27, 1966.
- CROOK, A. A.; POWERS, R. Quantitative NMR-based biomedical metabolomics: current status and applications. **Molecules**, Alban Anlage, v. 25, n. 21, p. 5128, 2020.
- DANGAL, S. R.; TIAN, H.; ZHANG, B.; PAN, S.; LU, C.; YANG, J. Methane emission from global livestock sector during 1890–2014: magnitude, trends and spatiotemporal patterns. **Global Change Biology**, Chichester, v. 23, n. 10, p. 4147-4161, 2017.
- DA SILVA ROCHA, R.; DE OLIVEIRA, L. B.; DO BRASIL MORAIS, S. T.; SOUTELINO, M. E. M.; SILVA, M. C.; DE FREITAS, M. Q.; JUNIOR, S. B.; PIMENTEL, T. C.; ESMERINO, E. A.; DA CRUZ, A. G. Effect of ohmic heating in bioactive peptides, volatile compounds, and fatty acid profile in a high-protein vanilla flavoured milk drink. **International Dairy Journal**, Oxford, p.105733, 2023.
- DE HAAS, Y.; PSZCZOLA, M.; SOYEURT, H.; WALL, E.; LASSEN, J. Invited review: Phenotypes to genetically reduce greenhouse gas emissions in dairying. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 100, n. 2, p. 855-870, 2017.
- DE HAAS, Y.; VEERKAMP, R. F.; DE JONG, G.; ALDRIDGE, M. N. Selective breeding as a mitigation tool for methane emissions from dairy cattle. **Animal**, Amsterdam, v. 15, p. 100294, 2021.
- DE LIMA, A. O.; KOLTES, J. E.; DINIZ, W. J.; DE OLIVEIRA, P. S.; CESAR, A. S.; TIZIOTO, P. C.; REGITANO, L. C. Potential biomarkers for feed efficiency-related traits in nelore cattle identified by co-expression network and integrative genomics analyses. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 11, p. 189, 2020.
- DEMEYER, D. I. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. *In*: MCDONALD, W.; WARNER, A. C. I. (ed.). **Digestion and metabolism**

in the ruminant. Armidale: The University of New England Publishing Unit, 1975. p. 366-382.

DE OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. D. U.; BORGES, A. D. S. **Nelore:** base genética e evolução seletiva no Brasil. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 54 p.

DE QUEIROZ BADDINI, A. L.; DE PAULA SANTOS, J. L. V.; TAVARES, R. R.; DE PAULA, L. S.; DA COSTA ARAÚJO FILHO, H.; FREITAS, R. P. PLS-DA and data fusion of visible Reflectance, XRF and FTIR spectroscopy in the classification of mixed historical pigments. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Oxford, v. 265, p. 120384, 2022.

DE ZAWADZKI, A.; ARRIVETTI, L. O.; VIDAL, M. P.; CATAI, J. R.; NASSU, R. T.; TULLIO, R. R.; BERNDT, A.; OLIVEIRA, C. R.; FERREIRA, A. G.; NEVES-JUNIOR, L. F.; COLNAGO, L. A.; SKIBSTED, L. H.; CARDOSO, D. R. Mate extract as feed additive for improvement of beef quality. **Food Research International**, Amsterdam, v. 99, p. 336-347, 2017.

DOS SANTOS MAGAÇO, F.; DUARTE, E. R. Interação microbiana e metanogênese em ruminantes—uma revisão. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v. 13, n. 1, p. 88-95, 2019.

DUARTE, J. M.; SALES, N. G. S.; BRAGA, J. W. B.; BRIDGE, C.; MARIC, M.; SOUSA, M. H.; DE ANDRADE GOMES, J. Discrimination of white automotive paint samples using ATR-FTIR and PLS-DA for forensic purposes. **Talanta**, Amsterdam, v. 240, p. 123154, 2022.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 40, n. 1, p. 387-426, 2011.

EDISON, A. S.; COLONNA, M.; GOUVEIA, G. J.; HOLDERMAN, N. R.; JUDGE, M. T.; SHEN, X.; ZHANG, S. NMR: unique strengths that enhance modern metabolomics research. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 93, n. 1, p. 478-499, 2020.

EMWAS, A. H.; ROY, R.; MCKAY, R. T.; TENORI, L.; SACCENTI, E.; GOWDA, G. A. N.; WISHART, D. S. NMR spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**, Basel, v. 9, p. 123, 2019.

ENGEL, K. M.; PRABUTZKI, P.; LEOPOLD, J.; NIMPTSCH, A.; LEMMNITZER, K.; VOS DRN, HOPF, C.; SCHILLER, J. A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 86, p. 101145, 2022.

FATTUONI, C.; PALMAS, F.; NOTO, A.; BARBERINI, L.; MUSSAP, M.; GRAPOV, D.; DESSÌ, A.; CASU, M.; CASANOVA, A.; FURIONE, M.; AROSSA, A.; SPINILLO, A.; BALDANTI, F.; FANOS, V.; ZAVATTONI, M. Primary HCMV infection in pregnancy from classic data towards metabolomics: an exploratory analysis. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 460, p. 23-32, 2016.

FERREIRA, G. C. V.; MIZIARA, F.; COUTO, V. R. M. Pecuária em Goiás: análise da distribuição espacial e produtiva. **REDE - Revista Eletrônica do PRODEMA**, v. 13, n. 2, p. 21-39, 2020.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. What does the p value really mean? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 5, p. 485, 2015.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

FIGHN, O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.

FISCHER, A.; EDOUARD, N.; FAVERDIN, P. Precision feed restriction improves feed and milk efficiencies and reduces methane emissions of less efficient lactating Holstein cows without impairing their performance. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 103, n. 5, p. 4408-4422, 2020.

FITZSIMONS, C.; KENNY, D. A.; DEIGHTON, M. H.; FAHEY, A. G.; MCGEE, M. Methane emissions, body composition, and rumen fermentation traits of beef heifers differing in residual feed intake. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 91, n. 12, P. 5789-5800, 2013.

FLAY, H. E.; KUHN-SHERLOCK, B.; MACDONALD, K. A.; CAMARA, M.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; DONAGHY, D. J.; ROCHE, J. R. Hot topic: selecting cattle for low residual feed intake did not affect daily methane production but increased methane yield. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 102, n. 3, p. 2708-2713, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Dados de uso da água**. Rome: FAO, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Reducing enteric methane for improving food security and livelihoods**. Rome: FAO, 2016. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca4334en/ca4334en.pdf>. Acesso em: 01 set. 2023

FONSECA, L. D. **Caracterização proteômica do fígado de bovinos Nelore divergentes para eficiência alimentar**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

FONSECA, L. D.; ELER, J. P.; PEREIRA, M. A.; ROSA, A. F.; ALEXANDRE, P. A.; MONCAU, C. T.; SALVATO, F.; ROSA-FERNANDES, L.; PALMISANO, G.; FERRAZ, J. B. S.; FUKUMASU, H. Liver proteomics unravel the metabolic pathways related to feed efficiency in beef cattle. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 5364, 2019.

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 80, p. 1-10, 2010.

GERBER, P. J.; STEINFELD, H.; HENDERSON, B.; MOTTET, A.; OPIO, C.; DIJKMAN, J.; FALCUCCI, A.; TEMPIO, G. **Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities**. Rome: FAO, 2013.

GIL-DE-LA-FUENTE, A.; GODZIEN, J.; SAUGAR, S.; GARCIA-CARMONA, R.; BADRAN, H.; WISHART, D. S.; BARBAS, C.; OTERO, A. CEU mass mediator 3.0: a metabolite annotation tool. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 18, n. 2, p. 797-802, 2018.

GODZIEN, J.; CIBOROWSKI, M.; ANGULO, S.; BARBAS, C. From numbers to a biological sense: how the strategy chosen for metabolomics data treatment may affect final results. A practical example based on urine fingerprints obtained by LCMS. **Electrophoresis**, Hoboken, v. 34, n. 19, p. 2812–2826, 2013.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica veterinária**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2017. p. 55.

GOIS, G.C; VOLTOLINI, T. V; NOGUEIRA, G. H. M. S. M. F; AMORIM, J. S; SANTOS, R. N; PEREIRA, J. S; LIMA, A. E. S. Desafios para a mitigação da emissão de metano entérico no semiárido brasileiro. *In*: QUEIROZ, M. A. Á.; MELO, J. B.; CAVALCANTE, I. H. L. (org.). **Avanços e desafios da pesquisa em ciências agrárias e veterinárias no semiárido brasileiro**. Petrolina: UNIVASF, 2019. v. 1, p. 1-17.

GOWDA, G. N.; RAFTERY, D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? **Journal of Magnetic Resonance**, Maryland Heights, v. 260, p. 144-160, 2015.

GRIFFITHS, W. J.; WANG, Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 38, n. 7, p. 1882-1896, 2009.

HAN, X.; YANG, K.; GROSS, R. W. Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses. **Mass Spectrometry Reviews**, Hoboken, v. 31, n. 1, p. 134-178, 2012.

HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; JANSSEN, P. H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 1, p. 14567, 2015.

HIGGINS, M. G.; KENNY, D. A.; FITZSIMONS, C.; BLACKSHIELDS, G.; COYLE, S.; MCKENNA, C.; WATERS, S. M. The effect of breed and diet type on the global transcriptome of hepatic tissue in beef cattle divergent for feed efficiency. **BMC Genomics**, London, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2019.

HONAN, M.; FENG, X.; TRICARICO, J. M.; KEBREAB, E. Feed additives as a strategic approach to reduce enteric methane production in cattle: modes of action effectiveness and safety. **Animal Production Science**, Clayton, v. 62, p. 1303-1317, 2021.

HOOK, S. E.; WRIGHT, A. D. G.; MCBRIDE, B. W. Methanogens: methaneproducers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, London, v. 2010, 2010.

HUNGATE, R. E. Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. **Archiv für Mikrobiologie**, Heidelberg, v. 59, p. 158-164, 1967.

HUNGATE, R. E.; SMITH, W.; BAUCHOP, T.; YU, I.; RABINOWITZ, J. C. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 102, n. 2, p. 389-397, 1970.

HRBEK, V.; REKTORISOVA, M.; CHMELAROVA, H.; OVESNA, J.; HAJŠLOVA, J. Authenticity assessment of garlic using a metabolomic approach based on high resolution mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 67, p. 19-28, 2018.

IANNUCCI, L. Chemometrics for data interpretation: application of principal components analysis (pca) to multivariate spectroscopic measurements. **IEEE Instrumentation & Measurement Magazine**, Piscataway, v. 24, n. 4, p. 42-48, 2021.

IBERDROLA. COP26: Iberdrola na Conferência do Clima 2021. Disponível em: <https://www.iberdrola.com/sustentabilidade/contra-mudancasclimaticas/cop26>. Acesso em 21 jul. 2023.

IBGE. **Pesquisa trimestral do abate de animais**: principais resultados. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9203-pesquisas-trimestrais-do-abate-de-animais.html#:~:text=Cresce%20o%20abate%20de%20bovinos,o%20de%20suínos%20caiu>. Acesso em: 10 maio 2023.

IPCC. **Climate change 2007**: synthesis report. Geneva: IPCC, 2008. 112 p.

IPCC. **Climate change 2014**: synthesis report. Geneva, IPCC, 2015. 151 p.

JAMES, G.; WITTEN, D.; HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R. **An introduction to statistical learning with applications in R**. New York: Springer, 2013. p. 18.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, n.1-2, p.1-22, 2010.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 12, p. 3619-3625, 2008.

JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 17, n. 7, p. 451-459, 2016.

KANG, C.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; QI, J.; ZHAO, W.; GU, J.; GUO, W.; LI, Y. Screening of specific quantitative peptides of beef by LC-MS/MS coupled with OPLS-DA. **Food Chemistry**, Oxford, v. 387, p. 132932, 2022.

KASSAMBARA, A. **Practical guide to principal component methods in R**: PCA, M (CA), FAMD, MFA, HCPC, factoextra. [S. l.]: Sthda, 2017.

KEOGH, K.; KENNY, D. A.; CORMICAN, P.; KELLY, A. K.; WATERS, S. M. Effect of dietary restriction and subsequent re-alimentation on the transcriptional profile of hepatic tissue in cattle. **BMC genomics**, London, v. 17, p. 1-16, 2016.

KIM, M.; MASAKI, T.; IKUTA, K.; IWAMOTO, E.; NISHIHARA, K.; HIRAI, M.; ROH, S. Physiological responses and adaptations to high methane production in Japanese Black cattle. **Scientific Reports**, London, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2022.

KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. The past, present, and future of chemometrics worldwide: some etymological, linguistic, and bibliometric investigations. **Journal of Chemometrics: a journal of the chemometrics society**, Chichester, v. 20, n. 6-7, p. 247-272, 2006.

KNAPP, J. R.; LAUR, G. L.; VADAS, P. A.; WEISS, W. P.; TRICARICO, J. M. Invited review: enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 97, n. 6, p. 3231-3261, 2014.

KOHLER, I.; VERHOEVEN, M.; HASELBERG, R.; GARGANO, A. F. Hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry for metabolomics and proteomics: state-of-the-art and current trends. **Microchemical Journal**, Philadelphia, v. 175, p. 106986, 2022.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: an overview. **Talanta**, Amsterdam, v. 123, p. 186-199, 2014.

LANGNER, L. L.; JOYCE, L. A.; WEAR, D. N.; PRESTEMON, J. P.; COULSON, D. P.; O'DEA, C. B. Future scenarios. *In*: US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOREST SERVICE, ROCKY MOUNTAIN RESEARCH STATION. **A technical document supporting the USDA Forest Service 2020 RPA Assessment**. Washington, DC, 2020.

LEE, L. C.; LIONG, C.; JEMAIN, A. A. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. **Analyst**, Cambridge, v. 143, n. 15, p. 3526-3539, 2018.

LEE, T. H.; ULLAH, A.; WANG, R. Bootstrap aggregating and random forest. *In*: FULEKY, P. (ed.). **Macroeconomic forecasting in the era of big data: theory and practice**. Cham: Springer, 2020. p. 389-429.

LEE, M. R. F.; HARRIS, L. J.; MOORBY, J. M.; HUMPHREYS, M. O.; THEODOROU, M. K.; MACRAE, J. C.; SCOLLAN, N. D. Rumen metabolism and nitrogen flow to the small intestine in steers offered *Lolium perenne* containing different levels of water-soluble carbohydrate. **Animal Science**, Cambridge, v. 74, n. 3, p. 587-596, 2002.

LEME, P. R.; SILVA, S. D. L.; PEREIRA, A. S. C.; PUTRINO, S. M.; LANNA, D. P. D.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar em dietas

com elevada proporção de concentrados para novilhos Nelore em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 1786-1791, 2003.

LEOPOLD, J.; POPKOVA, Y.; ENGEL, K. M.; SCHILLER, J. Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids. **Biomolecules**, Basel, v. 8, n. 4, p. 173, 2018.

LI, D. W.; LEGGETT, A.; BRUSCHWEILER-LI, L.; BRÜSCHWEILER, R. **COLMARq**: a Web Server for 2D NMR peak picking and quantitative comparative analysis of cohorts of metabolomics samples. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 94, n. 24, p. 8674-8682, 2022.

LIEBISCH, G.; FAHY, E.; AOKI, J.; DENNIS, E. A.; DURAND, T.; EJSING, C. S.; FEDOROVA, M.; FEUSSNER, I.; GRIFFITHS, W. J.; KÖFELER, H.; MERRILL JR, A. H.; MURPHY, R. C.; O'DONNELL, V. B.; OSKOLKOVA, O.; SUBRAMANIAM, S.; WAKELAM, M. J. O.; SPENER, F. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. **Journal of Lipid Research**, Amsterdam, v. 61, n. 12, p.1539-1555, 2020.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: a primer. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 42, n. 4, p. 274-284, 2017.

LOBO, A. A. G. **Intensidade de emissão de metano, fermentação e dinâmica ruminal de bovinos Nelore em sistemas de pastejo intensificado e integrado nas diferentes estações do ano**. 2023. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

LONDOÑO-GIL, M.; CARDONA-CIFUENTES, D.; ESPIGOLAN, R.; PERIPOLLI, E.; LÔBO, R. B.; PEREIRA, A. S.; AGUILAR, I.; BALDI, F. Genomic evaluation of commercial herds with different pedigree structures using the single-step genomic BLUP in Nelore cattle. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 95, 2023.

LØVENDAHL, P.; DIFFORD, G. F.; LI, B., CHAGUNDA; M. G. G.; HUHTANEN, P.; LIDAUER, M. H.; LASSEN, J; LUND, P. Selecting for improved feed efficiency and reduced methane emissions in dairy cattle. **Animal**, Amsterdam, v. 12, n. s2, p. s336-s349, 2018.

MA, Q., CHEN, X., ZHANG, K., YAO, D., YANG, L., WANG, H.; BULEMASI, S.; HUANG, J.; WANG, J. Chemical fingerprint analysis for discovering markers and identifying *Saussurea involucrata* by HPLC coupled with OPLS-DA. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, London, 2020.

MAGNABOSCO, C. D. U.; CORDEIRO, C. M. T.; TROVO, J. B. D. F.; MARIANTE, A. D. S.; LÔBO, R. B. **Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: raça Nelore**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1997.

MALHEIROS, J. M.; CORREIA, B. S. B.; CERIBELI, C.; CARDOSO, D. R.; COLNAGO, L. A.; BOGUZ, JUNIOR, S.; REGITANO, L. C. D. A. Comparative untargeted metabolome analysis of ruminal fluid and feces of Nelore steers (*Bos indicus*). **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 12752, 2021.

MALHEIROS, J. M.; CORREIA, B. S. B.; CERIBELI, C.; BRUSCADIN, J. J.; DINIZ, W. J. S.; BANERJEE, P.; VIEIRA, D. S.; CARDOSO, T. F.; ANDRADE, B. G. N.; PETRINI, J.; CARDOSO, D. R.; COLNAGO, L. A.; BOGUSZ JUNIOR, S.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L.; PALHARES, J. C. P.; DE MEDEIROS, S. R.; BERNDT, A.; DE ALMEIDA REGITANO, L. C. Ruminal and feces metabolites associated with feed efficiency, water intake and methane emission in Nelore bulls. *Scientific Reports*, London, v. 13, n. 1, p. 18001, 2023.

MANZANILLA-PECH, C. I. V.; VENDAHN, P. L.; GORDO, D. M.; DIFFORD, G. F.; PRYCE, J. E.; SCHENKEL, F.; WEGMANN, S.; MIGLIOR, F.; CHUD, T. C.; MOATE, P. J.; WILLIAMS, S. R. O.; RICHARDSON, C. M.; STOTHARD, P.; LASSEN, J. Breeding for reduced methane emission and feed-efficient Holstein cows: an international response. *Journal of Dairy Science*, New York, v. 104, n. 8, p. 8983-9001, 2021.

MARKLEY, J. L.; BRÜSCHWEILER, R.; EDISON, A. S.; EGHBALNIA, H. R.; POWERS, R.; RAFTERY, D.; WISHART, D. S. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, Oxford, v. 43, p. 34-40, 2017.

MCDONNELL, R. P.; HART, K. J.; BOLAND, T. M.; KELLY, A. K.; MCGEE, M.; KENNY, D. A. Effect of divergence in phenotypic residual feed intake on methane emissions, ruminal fermentation, and apparent whole-tract digestibility of beef heifers across three contrasting diets. *Journal of Animal Science*, Oxford, v. 94, n. 3, p. 1179-1193, 2016.

MILLER, JAMES; MILLER, JANE C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6. ed. Essex: Pearson Education, 2018.

MOORE, S. S.; MUJIBI, F. D.; SHERMAN, E. L. Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. *Journal of Animal Science*, Oxford, v. 87, n. suppl_14, p. E41-E47, 2009.

MOMBACH, M. A.; PEDREIRA, B.; PEREIRA, D. H.; CABRAL, L. D. S.; RODRIGUES, R. **Emissão de metano entérico por bovinos: o que sabemos e que podemos fazer?** SIMPÓSIO DE PECUÁRIA INTEGRADA, 2., 2016, Sinop. *Anais [...]*. Cuiabá: Fundação Uniselva, 2016. p. 181-202.

MOSS, A. R.; GIVENS, D. I.; GARNSWORTHY, P. C. The effect of supplementing grass silage with barley on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep at two levels of intake. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 55, n. 1-2, p. 9-33, 1995.

MOULD, F. L.; KLIEM, K. E.; MORGAN, R. Alternative methodologies – stretching the in vitro box. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 123-124, p. 501-515, 2005.

MOULD, F. L.; KLIEM, K. E.; MORGAN, R.; MAURICIO, R. M. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 123-124, p. 31-50, 2005.

- MORTAZAVI-TABATABAEI, S. A.; FATHI, F.; EKTEFA, F.; TAFAZZOLI, M.; REZAEI-TAVIRANI, M.; ZALI, M. R.; ROSTAMI, K. Investigation of metabonomics technique by analyze of NMR data, which method is better? Mean center or auto scale? **Archives of Advances in Biosciences**, Oxford, v. 4, n. 1, 2013.
- MOTTET, A.; DE HAAN, C.; FALCUCCI, A.; TEMPIO, G.; OPIO, C.; GERBER, P. Livestock: on our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/fooddebate. **Global Food Security**, Amsterdam, v. 14, p. 1-8, 2017.
- MUDADU, M. A.; PORTO-NETO, L. R.; MOKRY, F. B.; TIZIOTO, P. C.; OLIVEIRA, P. S.; TULLIO, R. R.; REGITANO, L. C. Genomic structure and marker-derived gene networks for growth and meat quality traits of Brazilian Nelore beef cattle. **BMC Genomics**, London, v. 17, p. 1-16, 2016.
- MUÑOZ, C.; YAN, T.; WILLS, D. A.; MURRAY, S.; GORDON, A. W. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 6, p. 3139–3148, 2012.
- MUKHERJEE, R.; SENGUPTA, D.; SIKDAR, S. K. Selection of sustainable processes using sustainability footprint method: a case study of methanol production from carbon dioxide. **Computer Aided Chemical Engineering**. Amsterdam, v. 36, p. 311-329, 2015.
- NASCIMENTO, M. L.; SOUZA, A. R. D. L.; CHAVES, A. S.; CESAR, A. S. M.; TULLIO, R. R.; MEDEIROS, S. R.; LANNA, D. P. D. Feed efficiency indexes and their relationships with carcass, non-carcass and meat quality traits in Nelore steers. **Meat Science**, Amsterdam, v. 116, p. 78–85 2016.
- NAKAMURA, M.T.; NARA, T.Y. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 145-150, 2003.
- NAYERI, S.; STOTHARD, P. Tissues, metabolic pathways and genes of key importance in lactating dairy cattle. **Springer Science Reviews**, Dordrecht, v. 4, p. 49-77, 2016.
- NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J. A.; MOORE, S. S. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 84, n. 1, p. 145-153, 2006.
- OLHOFF, A.; CHRISTENSEN, J. **Emissions Gap Report 2021**. The heat is on. A world of climate promises not yet delivered. Nairobi: United Nations Environment Programme, 2021.
- OLIJHOEK, D. W.; LØVENDAHL, P.; LASSEN, J.; HELLWING, A. L. F.; HÖGLUND, J. K.; WEISBJERG, M. R.; NOEL, S.J.; MCLEAN, F.; HØJBERG, O.; LUND, P.; LUND, P. Methane production, rumen fermentation, and diet digestibility of Holstein and Jersey dairy cows being divergent in residual feed intake and fed at 2 forage-to-concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 101, n. 11, p. 9926-9940, 2018.

- OLIVEIRA, P. P. A.; CORTE, R. R. S.; SILVA, S. D. L.; RODRIGUEZ, P. H. M.; SAKAMOTO, L. S.; PEDROSO, A. F.; TULLIO, R. R.; BERNDT, A. The effect of grazing system intensification on the growth and meat quality of beef cattle in the Brazilian Atlantic Forest biome. **Meat Science**, Amsterdam, v.139, p.157-161, 2018.
- OLIVERI, P.; MALEGORI, C.; CASALE, M. Chemometrics: multivariate analysis of chemical data. *In*: CHEMICAL analysis of food. Hoboken: Academic Press, 2020. p. 33-76.
- OPIO, C.; GERBER, P.; MOTTET, A.; FALCUCCI, A.; TEMPIO, G.; MACLEOD, M.; STEINFELD, H. **Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains—a global life cycle assessment**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.
- PAULINO, M. F.; FIGUEIREDO, D. D.; MORAES, E. H. B. K.; PORTO, M. O.; SALES, M. F.; ACEDO, T. S.; VALADARES FILHO, S. D. C. Suplementação de bovinos em pastagens: uma visão sistêmica. *In*: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 4., 2004, Viçosa. **Anais [...]**. Viçosa: UFV, 2004. p. 93-139.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEYRAUD, J. L.; ASTIGARRAGA, L.; FAVERDIN, P. Digestion of fresh perennial ryegrass fertilized at two levels of nitrogen by lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-4, p. 155-171, 1997.
- POTENZA, R. F.; QUINTANA, G. O.; CARDOSO, A. M.; TSAI, D. S. CREMER, M. S.; SILVA, F. B.; CARVALHO, K.; COLUNA, I.; SHIMBP, J.; SILVA, C.; SOUZA, E.; ZINBRES, B.; ALENCAR, A.; ANGELO, A.; AZEVEDO, T. **Análise das emissões brasileiras de gases de efeito estufa e suas implicações para as metas climáticas do Brasil 1970-2020**. [S. l.]: SEEG, 2021. Disponível em: <https://energiaambiente.org.br/produto/analise-das-emissoes-brasileiras-de-gases-de-efeito-estufa-e-suas-implicacoes-para-as-metas-climaticas-do-brasil-1970-2020>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- RAMÍREZ, J. F.; POSADA OCHOA, S.; NOGUERA, R. Metanogênese ruminal e estratégias para a sua mitigação. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Medelin, v. 9, n. 2, p. 307-323, 2014.
- REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, P. S. N.; ANDRADE, B. G. Hologenoma ruminante: caracterização da população de microrganismos do trato digestivo de ruminantes e seu impacto sobre o genoma funcional do hospedeiro, desempenho, qualidade do produto e impacto ambiental. *In*: SOTTA, E. D.; SAMPAIO, F. G.; MARZALL, K.; SILVA, W. G. **Estratégias de adaptação às mudanças do clima dos sistemas agropecuários brasileiros**. Brasília, DF: MAPA, 2021.
- REINER, A.; YEKUTIELI, D.; BENJAMINI, Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. **Bioinformatics**, Oxford, v.19, n. 3, p.368–375, 2003.

RENAND, G.; VINET, A.; DECRUYENAERE, V.; MAUPETIT, D.; DOZIAS, D. Methane and carbon dioxide emission of beef heifers in relation with growth and feed efficiency. **Animals**, Basel, v. 9, n. 12, p. 1136, 2019.

RIBEIRO, D. M.; SALAMA, A. A.; VITOR, A. C.; ARGÜELLO, A.; MONCAU, C. T.; SANTOS, E. M.; CAJA G, DE OLIVEIRA, J. S.; BALIEIRO, J. C. C.; HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E.; ZACHUT, M.; POLETI, M.D.; CASTRO, N.; ALVES, S. P.; ALMEIDA, A. M. The application of omics in ruminant production: a review in the tropical and sub-tropical animal production context. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 227, p.103905, 2020.

RITCHIE, H.; ROSADO, P.; ROSER, M. **Meat and dairy production**. [S. l.]: Our World in Data, 2019. Disponível em: <https://ourworldindata.org/meat-production>. Acesso em: 07 fev.2023.

ROJAS-DOWNING, M. M.; NEJADHASHEMI, A. P.; HARRIGAN, T.; WOZNICKI, S. A. Climate change and livestock: impacts, adaptation, and mitigation. **Climate Risk Management**, Amsterdam, v. 16, p. 145-163, 2017.

ROLIM, A. E. H.; HENRIQUE-ARAÚJO, R.; FERRAZ, E. G.; DULTRA, F. K. D. A. A.; FERNANDEZ, L. G. Lipidomics in the study of lipid metabolism: current perspectives in the omic sciences. **Gene**, Amsterdam, v. 554, n. 2, p. 131-139, 2015.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept. **MBio**, Washington, DC, v. 7, n. 2, p. e01395-15, 2016.

RUIZ-PEREZ, D.; GUAN, H.; MADHIVANAN, P.; MATHEE, K.; NARASIMHAN, G. So you think you can PLS-DA? **BMC Bioinformatics**, London, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2020.

SAUNOIS, M.; STAVERT, A. R.; POULTER, B.; BOUSQUET, P.; CANADELL, J. G.; JACKSON, R. B.; ZHUANG, Q. The global methane budget 2000–2017. **Earth System Science Data**, Gottingen, v. 12, n. 3, p. 1561-1623, 2020.

SERNA, J.; GARCÍA-SEISDEDOS, D.; ALCÁZAR, A.; LASUNCIÓN, M. Á.; BUSTO, R.; PASTOR, Ó. Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. **Chemistry and Physics of Lipids**, Clare, v. 189, p. 7-18, 2015.

SETHI, S.; BRIETZKE, E. Recent advances in lipidomics: analytical and clinical perspectives. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, New York, v. 128, p. 8-16, 2017.

SETHI, S.; HAYASHI, M.A.; SUSSULINI, A.; TASIC, L.; BRIETZKE, E. Analytical approaches for lipidomics and its potential applications in neuropsychiatric disorders. **The World Journal of Biological Psychiatry**, Abingdon, v. 18, n. 7, p. 506-520, 2017.

SISTEMA DE ESTIMATIVAS DE EMISSÕES E REMOÇÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA. **Desafios e oportunidades para redução das emissões de metano no Brasil.** [S. l.]: SEEG, 2022. Disponível em: https://seeg.eco.br/wpcontent/uploads/2023/03/SEEG_METANO_2022_FINAL.pdf. Acesso em: 15 jul. 2023.

SOUZA, H. M. R. **Papel filtro como alternativa de coleta de urina na doença de Pompe:** desenvolvimento do método para determinação do tetrassacarídeo de glicose e busca por novos biomarcadores. 2022. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2022.

STEPHENSON, D. J.; HOEFERLIN, L. A.; CHALFANT, C. E. Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. **Translational Research**, New York, v. 189, p. 13-29, 2017.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, Philadelphia, v. 5, n. 6, p. 463, 2010.

SUN, H. Z.; WANG, D. M.; WANG, B.; WANG, J. K.; LIU, H. Y.; GUAN, L. L.; LIU, J. X. Metabolomics of four biofluids from dairy cows: potential biomarkers for milk production and quality. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v.14, n. 2, p.1287-1298, 2015.

SUN, H. Z.; ZHOU, M.; WANG, O.; CHEN, Y.; LIU, J. X.; GUAN, L. L. Multi-omics reveals functional genomic and metabolic mechanisms of milk production and quality in dairy cows. **Bioinformatics**, Oxford, v. 36, n. 8, p.2530-2537, 2020.

SUN, H. Z.; ZHU, Z.; ZHOU, M., WANG; J., DUGAN; M. E.; GUAN, L. L. Gene co-expression and alternative splicing analysis of key metabolic tissues to unravel the regulatory signatures of fatty acid composition in cattle. **RNA Biology**, Philadelphia, v. 18, n. 6, p.854-862, 2021.

SZYMAŃSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, New York, v. 8, p. 3-16, 2012.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, S.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. J. R. C. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1988.

TAWHEEL, H. Z.; TAS, B.M.; SMIT, H. J.; ELGERSMA, A.; DIJKSTRA, J.; TAMMINGA, S. Effects of feeding perennial ryegrass with an elevated concentration of water-soluble carbohydrates on intake, rumen function and performance of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 121, n. 3-4, p. 243-256, 2005.

TRIVEDI, D. K.; HOLLYWOOD, K. A.; RATTRAY, N. J.; WARD, H.; TRIVEDI, D. K.; GREENWOOD, J.; GOODACRE, R. Meat, the metabolites: an integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef withpork. **Analyst**, Cambridge, v. 141, n. 7, p. 2155-2164, 2016.

UNITED NATIONS. Framework Convention on Climate Change. Conference of the Parties. **Report of the Conference of the Parties on its twenty-first session, held in Paris from 30 November to 13 December 2015**. Disponível em: <http://efaidnbmnnnibpcjpcglclefindmkaj/https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/10.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2023.

USDA. **The Brazilian bovine genetics market and US Exports**. Brasília, DF: USDA 2021. Disponível em: https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2021/03/The-Brazilian-Bovine-Genetics-Market-and-US-Exports_Brasilia_Brazil_03-01-2021-1.pdf. Acesso em: 10 mar.2023.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. D.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, p. 3583- 3597, 1991.

VELAZCO, J. I.; HERD, R. M.; COTTLE, D. J.; HEGARTY, R. S. Daily methane emissions and emission intensity of grazing beef cattle genetically divergent for residual feed intake. **Animal Production Science**, Clayton, v. 57, n. 4, p. 627-635, 2016.

VERGARA, D.; SIMEONE, P.; TAGLIAFERRO, L.; MAFFIA, M. Le scienze omiche tra vecchio e nuovo millennio. **Biologi Italiani**, Rome, 2014.

VIRGILI, E.; EMILI, R.; HAMMARBERG FERRI, I.; PALERMO, F.; CALZA, L.; GARDARELLI, M.; SPINA, M. Lipidomics and nutrylipidomics in oncology: review of the Literature. **Journal of Bioinformatics and Systems Biology**, Houston, v. 1, n. 1, p. 11-14, 2018.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A.; PHESATCHA, K.; KANG, S. Dietary sources and their effects on animal production and environmental sustainability. **Animal Nutrition**, Beijing, v. 1, n. 3, p. 96-103, 2015.

WELJIE, A. M.; NEWTON, J.; MERCIER, P.; CARLSON, E.; SLUPSKY, C. M. Targeted profiling: quantitative analysis of 1H NMR metabolomics data. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 78, n. 13, p. 4430-4442, 2006.

WENK, M. R. Lipidomics: new tools and applications. **Cell**, Cambridge, v. 143, n. 6, p. 888-895, 2010.

WHITE, H. M.; CARVALHO, E. R.; KOSER, S. L.; SCHMELZ-ROBERTS, N. S.; PEZZANITE, L. M.; SLABAUGH, A. C.; DONKIN, S. S. Regulation of hepatic gluconeogenic enzymes by dietary glycerol in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 99, n. 1, p. 812-817, 2016.

WISHART, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 15, n. 7, p. 473-484, 2016.

WISHART, D. S.; CHENG, L. L.; COPIÉ, V.; EDISON, A. S.; EGHBALNIA, H. R.; HOCH, J. C.; GOUVEIA, G. J.; PATHMASIRI, W.; POWERS, R.; SCHOCK, T. B.; SUMNER, L. W.; UCHIMIYA, M. NMR and metabolomics-a roadmap for the future. **Metabolites**, Basel, v. 12, n. 8, p. 678, 2022.

WMO GREENHOUSE GAS BULLETIN. **The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2018**. Geneva: WMO, 2019. Disponível em: <https://library.wmo.int/records/item/58687-no-15-25-november-2019?offset=4>. Acesso em: 15 jul. 2023.

WMO GREENHOUSE GAS BULLETIN. **The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2019**. Geneva: WMO, 2020. Disponível em: <https://reliefweb.int/report/world/wmo-greenhouse-gas-bulletin-state-greenhouse-gases-atmosphere-based-global-1>. Acesso em: 01 set. 2023.

WORLEY, B.; POWERS, R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. **Current Metabolomics**, Oak Park, v.4, n.2, p.97-103, 2016.

XIA, J.; WISHART, D. S. Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using MetaboAnalyst. **Current Protocols in Bioinformatics**, Hoboken, v. 34, n. 1, p. 14.10. 1-14.10. 48, 2011.

YANG, K.; HAN, X.L. Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 41, n. 11, p. 954-969, 2016.

ZAMBONIN, C. Maldi-tof mass spectrometry applications for food fraud detection. **Applied Sciences**, Basel, v. 11, n. 8, p. 3374, 2021.

ZAMORA-OBANDO, H. R.; ROCHA, S.; DALLAQUA, M.; BAPTISTÃO, M.; FERNANDESA, M. C. V.; LIMA, M. F.; SIMIONATO, A. V. C. Biomarcadores moleculares de doenças humanas: conceitos fundamentais, modelos de estudo e aplicações clínicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 45, p. 1098-1113, 2022.

ZONTOV, Y. V.; RODIONOVA, O. Y.; KUCHERYAVSKIY, S. V.; POMERANTSEV, A. L. PLS-DA—A MATLAB GUI tool for hard and soft approaches to partial least squares discriminant analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 203, p. 104064, 2020.