

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**RASTREABILIDADE DE FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL EM OVOS DE  
POEDEIRAS COMERCIAIS PELA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DO  
CARBONO ( $\delta^{13}\text{C}$ ) E DO NITROGÊNIO ( $\delta^{15}\text{N}$ )**

JULIANA CÉLIA DENADAI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU – SP  
Março – 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**RASTREABILIDADE DE FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL EM OVOS DE  
POEDEIRAS COMERCIAIS PELA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DO  
CARBONO ( $\delta^{13}\text{C}$ ) E DO NITROGÊNIO ( $\delta^{15}\text{N}$ )**

JULIANA CÉLIA DENADAI  
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS DUCATTI

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Doutor.

BOTUCATU – SP  
Março – 2008

*Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,  
Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem  
Foram conquistadas do que parecia impossível.*

**Charles Chaplin**

*À Deus, pois, “Dirige os meus passos nos teus caminhos, para que as minhas  
pegadas não vacilem” (Sl 17. 5).*

*Aos meus pais, Admir Denadai e Alice de Souza Denadai por me ensinarem a lutar e  
estarem sempre nos bastidores de minha vida.*

*À minha filha, Isabela jóia rara que enfeita minha vida, princesa linda, fonte de imensa  
alegria.*

*Aos meus irmãos, Alexandre, Simone e Renata, pelo amor e incentivo para que eu  
pudesse percorrer esse caminho.*

*Às minhas sobrinhas, Ana Carolina, Maria Eduarda e Amanda, princesas da tia.*

*Mãe e Pai, muito obrigada, pelo cuidado dispensado à Isa, vocês são os  
melhores avós que ela poderia ter.*

*Meu muito obrigado ao professor **Dr. Carlos Ducatti** pelos valiosos ensinamentos durante todos os anos de convívio e orientação. Exemplo de dedicação à pesquisa, seriedade e competência, semeador de conhecimentos, mostrando a importância do trabalho em grupo.*

*Aos meus queridos amigos, **Fabiana Ribeiro Caldara, Ricardo Pinto de Oliveira, Waldmaryan Bianchini, Cleusa Móri, André Moreira Bordinhon, Rosana Gottmann e Mariela Akie Okino Mituo**, pela infinita paciência, sempre dispostos a me ouvir e a colaborar com a execução do trabalho.*

*Aos amigos e funcionários do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do IB – UNESP - Botucatu, **Evandro, Cibele, Silvia e Felipe**, pela amizade, convivência e auxílio na realização das análises isotópicas.*

## **Agradecimentos**

- À FMVZ – UNESP/Botucatu; por ser a fonte dos meus conhecimentos e amizades desde 1997.
  - Ao Professor Dr. Antonio Celso Pezzato, pela orientação, amizade e estímulo durante o desenvolvimento da tese;
  - Ao Professor Dr. Edivaldo Antonio Garcia, por disponibilizar as instalações experimentais para execução do projeto;
- Ao Professor Dr. José Roberto Sartori, pela amizade, companheirismo e colaboração na realização dos experimentos;
- Ao Professor Dr. Francisco Stefano Wechsler, pela atenção, disposição e auxílio com as análises estatísticas;
- Aos secretários da Seção de Pós-Graduação da FMVZ, Seila e Danilo, pela atenção dispensada;
- Aos funcionários da Fábrica de Ração e do Setor de Aves pela ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos;
  - À SUPREMAIS, pela doação dos suplementos vitamínico e mineral;
  - À BIORIGIN, pela doação das leveduras;
- Ao Abatedouro de aves FRANGOESTE, pela doação das farinhas de origem animal;
  - À CAPES, pela bolsa de estudo concedida;
  - À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido;
  - À FUNDUNESP, pelo auxílio financeiro concedido;
- A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
Considerações iniciais .....	2
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA .....	2
3. RASTREABILIDADE.....	4
4. ISÓTOPOS ESTÁVEIS.....	6
5. ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA CERTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS.....	8
CAPÍTULO 2.....	17
RASTREABILIDADE DA FARINHA DE CARNE E OSSOS BOVINA EM OVOS DE POEDEIRAS COMERCIAIS PELA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DO CARBONO E NITROGÊNIO.....	17
Resumo .....	18
Abstract .....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4. CONCLUSÕES.....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
CAPÍTULO 3.....	37
RASTREABILIDADE DAS FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL EM OVOS DE POEDEIRAS COMERCIAIS E SUAS FRAÇÕES (GEMA E ALBÚMEN) PELA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DO CARBONO E NITROGÊNIO.....	37
Resumo .....	38
Abstract .....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4. CONCLUSÕES.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
CAPÍTULO 4.....	56

RASTREABILIDADE DE INGREDIENTES ALTERNATIVOS PARA POEDEIRAS À FARINHA DE CARNE E OSSOS BOVINA DETECTADA PELA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS EM OVOS .....	56
Resumo .....	57
Abstract .....	58
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
4. CONCLUSÕES.....	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
CAPÍTULO 5.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
Considerações Finais .....	77
CAPÍTULO 6.....	78
APÊNDICE .....	78
Apêndice.....	79
1. SISTEMA DE EQUAÇÕES .....	79
2. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS.....	86
3. FRACIONAMENTO ISOTÓPICO .....	88
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do ovo de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n = 12)..... 30
- Figura 2** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  da gema de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n = 12)..... 31
- Figura 3** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do albúmen de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n = 12)..... 32

### CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do ovo de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n = 12)..... 49
- Figura 2** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  da gema de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n = 12)..... 50
- Figura 3** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do albúmen de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n = 12)..... 51

### CAPÍTULO 4

- Figura 1** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do ovo de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n=12)..... 68
- Figura 2** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do albúmen de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n=12)..... 69
- Figura 3** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  da gema de cada tratamento quando comparados ao tratamento controle (n=12)..... 70

**CAPÍTULO 6**

<b>Figura 1</b> – Modelo do sistema de equações.....	81
<b>Figura 2</b> – Regressão linear do carbono-13 e nitrogênio-15 para o ovo. ....	82
<b>Figura 3</b> – Regressão linear do carbono-13 e nitrogênio-15 para o albúmen. ....	83
<b>Figura 4</b> – Regressão linear do carbono-13 e nitrogênio-15 para a gema.....	84
<b>Figura 5</b> - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do albúmen de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 4, n = 6, n = 8 e n = 10). ....	87

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1** – Composição percentual e níveis nutricionais calculados das dietas experimentais ..... 23

**Tabela 2** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão das dietas (n=2), ovos e suas frações (n=12) ..... 26

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1** – Composição percentual e níveis nutricionais calculados das dietas experimentais ..... 43

**Tabela 2** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão (n = 2) dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais ..... 46

**Tabela 3** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão das dietas (n = 2), ovos e suas frações (n = 12) ..... 46

### CAPÍTULO 4

**Tabela 1** – Composição percentual e níveis nutricionais calculados das dietas experimentais ..... 62

**Tabela 2** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão das dietas (n=2), ovos e suas frações (n=12) ..... 65

**Tabela 3** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão (n = 2) dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais ..... 66

### CAPÍTULO 6

**Tabela 1.** Nível de inclusão de farinha de carne e osso bovina calculado pelo sistema de equações nas diferentes frações dos ovos ..... 85

**Tabela 2** – Fator de fracionamento isotópico entre fração e dieta, de ovos e suas frações de poedeiras submetidas às dietas experimentais (CAPÍTULO 2) ..... 88

**Tabela 3** – Fator de fracionamento isotópico entre fração e dieta, de ovos e suas frações de poedeiras submetidas às dietas experimentais (CAPÍTULO 3) ..... 88

**Tabela 4** – Fator de fracionamento isotópico entre fração e dieta, de ovos e suas frações de poedeiras submetidas às dietas experimentais (CAPÍTULO 4) ..... 89

**CAPÍTULO 1**  
**CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## **Considerações iniciais**

### **1. INTRODUÇÃO**

As características que permitem ao ovo gerar uma nova vida fazem dele alimento de excelente qualidade, de alto valor biológico, fonte de vitaminas, aminoácidos e minerais (Englert, 1998; Puppini, 2004). De acordo com Romanoff & Romanoff (1949), comparado ao ovo da galinha, nenhum outro alimento de origem animal é consumido e degustado por tantos e diversos povos ao redor do mundo. Sua popularidade justifica-se não somente à sua fácil obtenção e eficiência econômica, mas também porque é praticamente incomparável em sua excelência nutritiva.

O Brasil tem a avicultura comercial mais produtiva do mundo, tornando-se em 2006 o maior produtor e exportador de carne de frangos (USDA, 2007), além disso, a avicultura de postura apresentou produção de 24,25 trilhões de ovos em 2007, queda de 8,13% em relação a 2006 (UBA, 2007).

Apesar de todo crescimento experimentado pela avicultura no país, evidências sugerem que o setor ainda pode crescer mais. Impulsionado pela busca cada vez maior do consumidor por informações acerca dos produtos alimentícios, em consequência aos últimos acontecimentos no mundo relacionados aos produtos de origem animal e vegetal, dentre os quais se podem citar a Crise da Dioxina na Bélgica em 1999 e Alemanha em 2000/2001 e diversos casos de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) em diversos países europeus, Canadá, Estados Unidos e Japão (Fernandes Filho & Queiroz, 2001; Cerutti, 2002; Gomes, 2006).

A indústria de ovos utiliza a farinha de carne e ossos bovina (FCOB) como fonte de proteínas e principalmente minerais (neste caso, cálcio e fósforo) a fim de diminuir os custos com a alimentação. Sem restrições no mercado interno quanto ao uso dos subprodutos de origem animal na alimentação de poedeiras, a criação comercial tem sido realizada com e sem a inclusão de farinha de carne e ossos bovina nas dietas.

### **2. ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA**

A crise da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), mais conhecida como “mal da vaca louca”, ocorrida principalmente em países da Comunidade Européia e Japão e, mais recentemente, no Canadá, tornou-se um dos principais aspectos relacionados

ao controle da produção de produtos de origem animal e à certificação de sua origem (Hargin, 1996).

A EEB é uma doença neurodegenerativa que afeta o bovino doméstico e tem como característica ser causada por um tipo de proteína alterada, chamada príon: “proteinaceous infectious particles”, que adquire característica de agente infeccioso transmissível (Prusiner *et al.*, 1984). Esta encefalopatia faz parte do grupo de doenças priônicas que acometem a maioria dos mamíferos (ovinos, caprinos, ratos, gato doméstico, puma, guepardo e antílope), o homem e avestruz (Hart, 1995; Moreno Chan & Valdes, 1996).

Nas ovelhas, a doença é chamada *scrapie* e está presente há mais de 200 anos na Grã Bretanha e outros países. Caracteriza-se pelo surgimento de prurido constante, seguido por queda de lã e desenvolvimento de dermatite, com evolução progressiva para ataxia, paralisia motora, tremores e finalmente a morte (McGowan, 1922; Balter, 2001).

A EEB surgiu por volta 1985 na Inglaterra, quando pecuaristas visando o aumento da produtividade começaram a utilizar resíduos de carcaças do próprio gado a fim de elevar o teor protéico das rações. Estudo epidemiológico foi realizado para conhecer os fatores comuns a todos os rebanhos afetados que pudessem ser imputados como causas da doença, para monitorar sua incidência dentro de cada rebanho e entre os rebanhos das diferentes regiões do Reino Unido. Os pesquisadores concluíram que a EEB estava associada ao uso de apenas um produto: a farinha de carne e ossos utilizada nas rações dos rebanhos afetados (Adam, 2001).

A doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) é a enfermidade priônica característica do homem, que no modo clássico pode apresentar-se de três formas distintas, uma externa, onde a proteína defeituosa é transmitida pela ação médica, seja pela utilização de medicamentos ou de implantes, e geneticamente de duas formas: hereditária ou por mutação (Ironsides, 1998). Em 1995, nova moléstia neurológica que se assemelha a CJD foi confirmada em homens que consumiam grande quantidade de carne bovina. Investigações sobre as características biológicas, morfológicas e moleculares dos príons da EEB e da nova variante da Creutzfeldt-Jakob (vCJD) mostraram ser o mesmo agente e transmitida a seres humanos pela ingestão de carne bovina (Pocchiari, 1998; Coulthart & Cashman, 2001).

Foi a partir desse momento que o controle da EEB se tornou imprescindível e surgiram as normas protecionistas na União Européia. Assim, a Comunidade Européia (CE) fez modificações em suas normas sanitárias, estabelecendo regime de

identificação, registro e rotulagem da carne e de produtos à base de carne bovina (CE nº. 1760/2000). Outra modificação foi a restrição do uso de subprodutos de origem animal em rações de animais da mesma espécie (CE nº. 1774/2002).

Segundo Dale (2002), não há motivos para a suspensão do uso de subprodutos de origem animal para aves, pois no continente americano não se tem notícia da ocorrência de enfermidades como o “mal da vaca louca”, tendo em vista que esta síndrome também nunca foi observada em aves. Todavia, Dobson (2001) afirma que tecidos animais de outras origens, como suíno e aviário, podem também apresentar risco de transmissão das doenças priônicas, devido à reciclagem de proteína animal nas criações modernas.

A inexistência aparente de casos em suínos e aves utilizados na alimentação humana pode ser em decorrência apenas do abate precoce ou da subnotificação de doenças nesses animais, o que piora o quadro, porque os animais mortos antes do período de abate podem ser reciclados como ração, criando retroalimentação positiva e podendo levar a infecção maciça desses animais (Lupi, 2003).

### **3. RASTREABILIDADE**

Segurança alimentar é uma das características valorizada pelo consumidor no processo de escolha de determinado produto. Os consumidores desejam transparência quanto às condições e aos métodos de produção do alimento e estão interessados em saber como e onde os animais são criados, com isso, surgiu o conceito de rastreabilidade.

Por definição, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1994), pela norma NBR ISO 8402, rastreabilidade é a habilidade de descrever a história, aplicação, processos ou eventos e localização de um produto, a uma determinada organização, por meios de registros e identificação.

É um sistema preventivo que permite a empresa controlar seus riscos antes de se expor ao mercado, satisfazendo o consumidor (Gomes, 2006). É ferramenta chave, no processo de certificação de produtos de origem animal, essencial para a sobrevivência e o sucesso das empresas no mercado competitivo e exigente.

No Brasil, o único sistema de rastreabilidade oficialmente implantado é o denominado SISBOV - Sistema Brasileiro de Identificação e Certificação de Origem Bovina e Bubalina, específico para a cadeia de bovinos e bubalinos. Criado pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2006) como resposta do governo brasileiro às pressões da União Européia, que exigia um programa oficial de rastreabilidade para a cadeia de bovinos.

A avicultura ainda não dispõe de sistema de identificação oficial como a pecuária de corte, mas já utiliza diversas ferramentas de gestão e controle de qualidade em sua cadeia, como o APPCC (Análise de Perigo em Pontos Críticos de Controle) ou o BPF (Boas Práticas de Fabricação), além de atuar no sentido de definir normas para outros pontos da cadeia produtiva (Cerutti, 2002).

Seria desejável que houvesse na indústria avícola, além dessas ferramentas de gestão e controle de qualidade, análise de contra prova que auxiliasse atestar a veracidade das informações constantes no histórico alimentar de lotes de produtos diferenciados (carne de frango e ovos provenientes de aves alimentadas com dieta estritamente vegetal), que pudesse monitorar o processo de rastreabilidade e fornecer laudos técnicos para as auditorias, como instrumento de confiabilidade (Oliveira, 2005).

Muitos métodos têm sido propostos para identificar a presença de subprodutos de origem animal em rações para animais, tais como, hibridização de DNA, ELISA e PCR (Bloch Junior, 2002). A hibridação de DNA consiste na extração do DNA animal da ração e sua amplificação pela reação de polimerase em cadeia. O método de ELISA é um ensaio imuno-enzimático de anticorpos para os subprodutos de origem animal na ração e o método de PCR consiste em testar *primers* específicos para o gene do citocromo B do DNA mitocondrial de bovinos e suínos e do gene de colágeno para detecção de aves em rações animais.

No entanto, a técnica estabelecida como padrão para detecção de proteína animal em rações é a microscopia por sedimentação, capaz de identificar a presença de farinha de carne e ossos em concentrações de 0,1% e se baseia na identificação de fragmentos de ossos presentes na ração (Wobeto *et al.*, 2006).

Nenhum destes métodos é realizado no produto final, ou seja, carne, ovos, leite, etc., o que deixa brechas para fraudes e torna possível que indústrias inescrupulosas enviem para inspeção rações sem adição de subprodutos de origem animal. De maneira que, após essa inspeção troquem a ração por outra com inclusão de farinhas de origem animal e, deste modo, terão seu produto final certificado como livres de produtos de origem animal quando na verdade não são.

A espectrometria de massas, por meio da análise da razão isotópica para o elemento químico carbono, tem sido usada com sucesso para testar a autenticidade e



a qualidade de vários produtos tais como sucos de frutas (Bricout & Koziat, 1987; Koziat *et al.*, 1993), vinhos (Martin *et al.*, 1988), méis (Brookes *et al.*, 1991; White *et al.*, 1998) e produtos lácteos (Rossmann *et al.*, 2000; Manca *et al.*, 2001). Além da caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos Ibéricos, possibilitando a classificação dos animais de acordo com o tipo de alimentação recebida durante o período de engorda (González-Martin *et al.*, 1999) e a certificação de origem e de qualidade de produtos de origem animal (Hargin, 1996; Monin, 1998; González-Martin *et al.*, 2001).

A razão isotópica do carbono-13 associada a do nitrogênio-15 permitiu a certificação da origem geográfica e tipos de alimentação de ovinos (Piasentier *et al.*, 2003). No Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP campus de Botucatu fundamentados nesta técnica, surgiu a linha de pesquisa que visa detectar da inclusão de farinhas de origem animal na alimentação de aves no produto final (Oliveira, 2005; Carrijo *et al.*, 2006; Gottmann, 2007; Móri, 2007).

#### 4. ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Os isótopos estáveis do carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N) ocorrem naturalmente na biosfera. O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. A expressão estável significa que tais isótopos não emitem radiação.

Os isótopos são átomos do mesmo elemento, que diferem em número de nêutrons, apresentando diferentes massas (Kennedy & Krouse, 1990). Cada elemento apresenta um isótopo estável leve dominante: carbono-12 ( $^{12}\text{C}$ ), hidrogênio-1 ( $^1\text{H}$ ), oxigênio-16 ( $^{16}\text{O}$ ) e nitrogênio-14 ( $^{14}\text{N}$ ), e um ou dois isótopos estáveis pesados: carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), deutério (hidrogênio-2) ( $^2\text{D}$ ), oxigênio-17 ( $^{17}\text{O}$ ), oxigênio-18 ( $^{18}\text{O}$ ) e nitrogênio-15 ( $^{15}\text{N}$ ).

Os valores isotópicos do carbono-13 são expressos em termos do padrão internacional definido, Peedee Belemnite (PDB). Segundo Friedman & O'Neill (1977), o padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Trata-se do carbonato sólido de Belemnite da era cretáceo, *Belemnite americana*, da formação Peedee da Carolina do Sul, empregado inicialmente como padrão por Craig (1957). No Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP/Botucatu é utilizado como padrão de trabalho (sub-padrão), uma rocha

carbonatada (mármore) com alta pureza em calcita. A notação utilizada é em delta per mil ( $\delta^{13}\text{C}$ ) da razão isotópica do carbono-13 do produto em relação ao padrão internacional definido (Ducatti *et al.*, 1979).

De acordo com seu ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos principais: plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , onde o primeiro composto orgânico formado é um ácido carboxílico, com três e quatro átomos de carbono, respectivamente. O gás carbônico atmosférico, que possui  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente  $-7,7\text{‰}$  (Kennedy & Krouse, 1990), é a fonte primária de carbono para as plantas terrestres.

Esse carbono sofre discriminação isotópica ao longo do processo de fotossíntese. O termo discriminação isotópica indica enriquecimento ou empobrecimento isotópico relativo do produto em relação à fonte precursora. Especificamente, no processo de fotossíntese das plantas ocorre empobrecimento (diminuição) da concentração de carbono-13 e aumento da concentração de carbono-12.

Nas plantas  $\text{C}_3$ , o valor de  $\delta^{13}\text{C}$  varia de  $-22$  a  $-34\text{‰}$  e nas plantas  $\text{C}_4$  este valor encontra-se entre  $-9$  e  $-16\text{‰}$ , dependendo da espécie e da parte da planta analisada. A diferença entre estes valores ocorre devido à distintas rotas bioquímicas na produção de carboidratos nestes dois tipos de plantas. O sinal negativo indica que a planta apresenta menor concentração de carbono-13 que o padrão internacional PDB (Smith & Epstein, 1971; Ducatti, 1977; Ducatti *et al.*, 1979; O'Leary, 1981; Vogel, 1993; Ducatti, 2004).

Considerando-se a existência da diferença isotópica da ordem de  $14\text{‰}$  nos valores em  $\delta^{13}\text{C}$  entre as plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , pode-se caracterizar a dieta do animal através da análise isotópica do carbono dos tecidos (Ducatti, 2004). Devido à integração da composição isotópica do carbono incorporado no corpo do animal e o que foi perdido na respiração e excreção ser igual à composição isotópica de carbono da dieta, isto é à base da maioria dos pressupostos dos experimentos que utilizam os isótopos estáveis do carbono (DeNiro & Epstein, 1978).

Para os isótopos estáveis do nitrogênio, o padrão internacional é o nitrogênio do ar atmosférico, o qual é considerado mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Os valores isotópicos de nitrogênio-15 também são expressos, na notação delta per mil ( $\delta^{15}\text{N}$ ) da razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  do produto em relação ao padrão internacional.

Diferentemente do carbono, o  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas varia conforme a fixação do nitrogênio por elas. Na maioria das leguminosas, por realizar simbiose com micorrizas, o  $\delta^{15}\text{N}$  varia ao redor de uma unidade, próximo ao valor do padrão ( $\delta^{15}\text{N} = 0,0 \pm 1,0\text{‰}$ ) (Handley & Raven, 1992; Werner & Schmidt, 2002). O  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas que não conseguem fixar o nitrogênio atmosférico depende, em grande parte, da abundância isotópica do solo e da variação causada pela adubação (Choi *et al.*, 2002). Quando o nitrogênio é absorvido de matéria orgânica o  $\delta^{15}\text{N}$  é mais significativo, ao redor de 5‰. Valores negativos de  $\delta^{15}\text{N}$  são observados em solos secos e arenosos, que possuem baixa proporção de matéria orgânica. Quando se adiciona esterco como fertilizante natural no solo o fracionamento é alto, com  $\delta^{15}\text{N}$  em torno de 10‰ (Shibuya *et al.*, 2006).

Uma vez que os tecidos corporais refletem o sinal isotópico das dietas que os animais consomem, as farinhas de origem animal são reflexo da dieta do animal que a deu origem, variando por volta de 2‰ para o  $\delta^{13}\text{C}$  (DeNiro & Epstein, 1978) e em torno de 3‰ (2-5‰), para o  $\delta^{15}\text{N}$ , devido o nitrogênio do organismo animal sofrer enriquecimento em cada elevação do nível trófico (DeNiro & Epstein, 1981; Koch *et al.*, 1994).

A análise da variação natural da abundância dos isótopos estáveis representa uma ferramenta poderosa para as pesquisas em geologia e arqueologia, possibilitando a reconstrução de dieta prévia de animais (Van der Merve, 1982; DeNiro, 1987). Nas últimas décadas os isótopos estáveis têm sido aplicados de forma crescente e contínua em pesquisas agrícolas, ecológicas e fisiológicas (Gannes *et al.*, 1998) e apresentam-se como alternativa promissora para estudar processos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes em humanos e animais, assim como, para identificar a procedência e a qualidade de produtos de origem animal e vegetal.

Denadai *et al.* (2006) avaliaram metabolicamente quatro dietas  $\text{C}_3$  e/ou  $\text{C}_4$  em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e encontraram diferentes velocidades de substituição do carbono nos ovos. A substituição total do carbono no ovo variou de 24,5 a 33,6 dias após o recebimento da nova dieta. Esta diferença pode ser principalmente, causada pelo atendimento ou não das exigências nutricionais das aves pelas dietas ministradas.

## 5. ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA CERTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS

Investigações demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais, em relação ao carbono-13 geralmente assemelham-se às suas dietas (Minson & Ludlow, 1975; DeNiro & Epstein, 1976, 1978; Hobson & Clark, 1992a, 1992b), por estarem ligados aos processos metabólicos (Kennedy & Krouse, 1990), presentes em todos os nutrientes capazes de gerar energia aos animais e por representarem cerca de 50% dos elementos químicos que compõem o corpo dos animais superiores (Murray, 1990).

Segundo DeNiro & Epstein (1978), a composição isotópica do carbono incorporado no corpo do animal e o que foi perdido na respiração e excreção deve ser igual à composição isotópica de carbono da dieta. Isto é à base da maioria dos pressupostos dos experimentos que utilizam os isótopos estáveis do carbono. Já para o nitrogênio, Koch *et al.* (1994) afirmam que ocorre enriquecimento médio de nitrogênio-15 de 3‰ a cada elevação de nível trófico.

Quando duas fontes que diferem isotopicamente entre si são misturadas uniformemente, a composição do produto gerado reflete a contribuição isotópica destas duas fontes, assim como, a quantidade relativa de cada uma delas. Este é o princípio básico da diluição isotópica. Este modelo de mistura isotópica só é válido para duas fontes e um produto. Entretanto, quando dispõem dos isótopos estáveis de dois elementos químicos, simultaneamente, nas várias fontes primárias e no produto final, como por exemplo,  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  torna-se possível estimar o índice potencial de participação das diversas fontes no produto, através de sistemas de equações propostos por Phillips (2001). O sistema de equações é o método quantitativo em função do balanço de massa isotópico, que permite mensurar os índices participativos das fontes no produto (Ducatti, 2004).

Segundo Ducatti (2004), observa-se na literatura ampla variabilidade de aplicações da diluição isotópica de um único elemento químico, como por exemplo, o carbono. Entretanto, a aplicabilidade de dois isótopos de elementos químicos diferentes, como carbono versus nitrogênio ou deutério versus oxigênio, são extremamente escassos na literatura.

Piasentier *et al.* (2003) pela técnica dos isótopos estáveis do carbono-13 e nitrogênio-15 certificaram a origem geográfica e o regime de alimentação de ovinos. As diferenças encontradas nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  na proteína destes animais deveram-se principalmente ao tipo de regime alimentar, enquanto que os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no animal podem ter sofrido interferência em função do tipo de solo, e a presença de plantas leguminosas na sua alimentação ou ao próprio metabolismo animal.

A razão isotópica do carbono em associação à razão isotópica do nitrogênio permitiu rastrear a farinha de carne e ossos bovina na alimentação de frangos de corte (Carrijo *et al.*, 2006), farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte e codornas (Oliveira, 2005; Móri, 2007) e farinha de vísceras de aves, juntamente com levedura e farelo de trigo, na alimentação de frangos de corte (Gottmann, 2007).

Denadai *et al.* (2005) em estudo com dois produtores de ovos da região de Bastos/SP, onde um utilizava apenas produtos de origem vegetal e outro, utilizava subproduto de origem animal. Observaram pelo sistema de duplo eixo isotópico (carbono e nitrogênio) que estes ovos possuíam padrões isotópicos distintos, sugerindo a possibilidade de rastrear a inclusão de farinha de origem animal na alimentação das poedeiras e detectando-a no ovo.

As considerações mostram a importância de buscar novas técnicas que possam melhorar o processo de rastreabilidade e certificação de produtos avícolas, especialmente na detecção de produtos de origem animal em dietas de galinhas de postura, para que os produtos brasileiros estejam dentro dos padrões exigidos pelos consumidores e importadores.

O Capítulo 2, intitulado “**Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovina em ovos de poedeiras comerciais pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio**” encontra-se redigido de acordo com as normas editoriais da *Revista Brasileira de Ciência Avícola – Brazilian Journal of Poultry Science* – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. O presente trabalho teve por objetivo rastrear a inclusão de farinha de carne e ossos bovina em dietas de poedeiras comerciais, por meio da análise dos ovos e suas frações (gema e albúmen), pela técnica dos isótopos do carbono e do nitrogênio, assim como avaliar o índice analítico mínimo detectável.

O Capítulo 3, intitulado “**Rastreabilidade das farinhas de origem animal em ovos de poedeiras comerciais e suas frações (gema e albúmen) pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio**” encontra-se redigido de acordo com as normas editoriais da *Revista Brasileira de Ciência Avícola – Brazilian Journal of Poultry Science* – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. O presente estudo teve por objetivo rastrear a inclusão de farinhas de origem animal em dietas de poedeiras comerciais, por meio da análise dos ovos e suas frações (gema e albúmen), pela técnica dos isótopos do carbono e do nitrogênio.

O Capítulo 4, intitulado “**Rastreabilidade de ingredientes alternativos para poedeiras à farinha de carne e ossos bovina detectada em ovos pela técnica dos isótopos estáveis**” encontra-se redigido de acordo com as normas editoriais da *Revista Brasileira de Ciência Avícola – Brazilian Journal of Poultry Science* – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. O presente trabalho objetivou identificar a farinha de carne e ossos bovina em dietas de poedeiras comerciais, mesmo com a inclusão de outros ingredientes de origem vegetal e leveduras, que possam alterar os valores isotópicos dos ovos e suas frações (gema e albúmen), pela técnica dos isótopos do carbono-13 e do nitrogênio-15.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 8402. Gestão da qualidade e garantia da qualidade - Terminologia**. Rio de Janeiro: ABNT, 1994

Adam D. Review blames BSE outbreak on calf feed. **Nature**, v.412, p.467, 2001.

Balter M. Origins of BSE. Intriguing clues to a scrapie-mad cow link. **Science**, v.292, p.827-829, 2001.

Block Junior C. Monitoramento da qualidade de rações brasileiras para ruminantes por espectrometria de massa. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 2002. p.251-252.

Bricout J, Koziat J. Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.35, p.758-760, 1987.

Brookes ST, Barrie A, Davies JE. A rapid  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  test for determination of corn-syrups in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.74, p.627-629, 1991.

Carrijo AS, Pezzato AC, Ducatti C, Sartori JR, Trinca L, Silva ET. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, p.37-42, 2006.

Cerutti M. Aplicação de um programa de rastreabilidade na cadeia de frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 2002. p. 253-264.

Choi WJ, Lee SM, Ro HM, Kim KC, Yoo SH. Natural  $^{15}\text{N}$  abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, v.245, p.223-232, 2002.

Comunidade Européia. Regulamento (CE) No. 1760/2000. Official Journal of the European Communities. Disponível em: [http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32000R1760&model=guichett](http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32000R1760&model=guichett). Acesso em: 28 ago. 2007.

Comunidade Européia. Regulamento (CE) No. 1774/2002. Official Journal of the European Communities. Disponível em: [http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32002R1774&model=guichett](http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32002R1774&model=guichett). Acesso em: 30 ago.2007.

Coulthart MB, Cashman NR. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: a summary of current scientific knowledge in public health. **Canadian Medical Association Journal**, v.165, p.51-58, 2001.

Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.12, p.133-149, 1957.

Dale N. La Harina de Carne y Hueso: Segura y Eficiente. Industria Avícola. Ed. **Latino Americana de Poultry International**, v.49, p.18, 2002.

Denadai JC, Ducatti C, Caldara FR, Oliveira RP, Silva ET. Certificação de Ovos de Poedeiras Comerciais pela Técnica dos Isótopos Estáveis. In: III Congresso de Produção e Consumo de Ovos - APA, 2005, Indaiatuba. **Anais...** - APA, 2005.

Denadai JC, Ducatti C, Pezzato AC, Carrijo AS, Caldara FR, Oliveira RP. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, p.251-256, 2006.

DeNiro MJ. Stable isotopes and archaeology. **American Scientist**. v.75, p.182-191. 1987.

DeNiro MJ, Epstein S. You are what you eat (plus a few ‰) the carbon isotope cycle in food chains. **Geological Society of America**, v.6, p.834, 1976. (Abstract).

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, p.495-506, 1978.

DeNiro M.J, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.45, p.341-351, 1981.

Dobson R. Traditional butchery methods linked to vCJD clusters. **British Medical Journal**, v.322, p.753, 2001.

Ducatti C. **Medidas da variação natural da relação isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  em amostras orgânicas**. 1977. 118 f. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1977.

Ducatti C. **Isótopos estáveis ambientais**. [Apostila] 2004. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004, 184p.

Ducatti C, Salati E, Matsui E. Método de análise da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.51, p.275-286, 1979.

Englert SI. **Avicultura: tudo sobre raças, manejo e alimentação**. 7. ed. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 238p, 1998.

Fernandes Filho JF, Queiroz AM. Transformações recentes na avicultura de corte brasileira: o caso do modelo de integração. In: Congresso de Ciências Humanas, Letras e Arte – CONIFES-UFOP, 5. Ouro Preto, 2001. **Anais**. Ouro Preto: CONIFES, 2001. 26p.

Friedman I, O'Neil JR. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. In Fleischer M. Editors. Data of Geochemistry 6<sup>a</sup> ed. United States government printing office, 1977. p. kk1-kk12.

Gannes LZ, Del-Rio CM, Koch P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119A, p.725-737, 1998.



Gomes JPC. Biossegurança X Rastreabilidade. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006. p.100-104.

González-Martin I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Marqués-Macias E, Sanz Poveda F. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. **Meat Science**, v.52, p.437-441, 1999.

González-Martin I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Sánchez González C. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. **Meat Science**, v.58, p.25-30, 2001.

Gottmann R. **Influência da composição das rações na rastreabilidade de farinhas de origem animal pela técnica dos isótopos estáveis em frangos de corte**. 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Handley LL, Raven JA. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v.15, p.965-985, 1992.

Hargin KD. Authenticity issues in meat and meat products. **Meat Science**, v.43, p.S277-S289, 1996.

Hart CA. Transmissible spongiform encephalopathies. **Journal of Medical Microbiology**, v.42, p.153-155, 1995.

Hobson KA, Clark RG. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. **The Condor**, v.94, p.181-188, 1992a.

Hobson KA, Clark RG. Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, v.94, p.189-197, 1992b.

Ironside J. Prion diseases in man. **Journal of Pathology**, v.186, p.227-234, 1998.

Kennedy BV, Krouse HR. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v.68, p.960-972, 1990.

Kock PL, Fogel ML, Turons N. (1994) Tracing the Diets of Fossil Animals Using Stable Isotope in: Lajtha K, Michener RH. editors. **Stable in Ecology and Environmental Science**. Blackwell Scientific Publication, 1994. p.63-92.

Koziet J, Rossmann A, Martin GJ, Ashurst PR. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. **Analytica Chimica Acta**, v.271, p.31-38, 1993.

Lupi O. Doenças priônicas: avaliação dos riscos envolvidos na utilização de produtos de origem bovina. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.7-18, 2003.

Manca G, Camin F, Coloru G, Del Caro A, Detentori D, Franco MA, Versini G. Characterisation of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) ratios and free amino acid ratios. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1404-1409, 2001.

MAPA Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 17, DE 13 DE JULHO DE 2006**. Estabelece a Norma Operacional do Serviço de Rastreabilidade da Cadeia Produtiva de Bovinos e Bubalinos (SISBOV). Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17186> Acesso em: 19 mar. 2008.

Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep X, Aerny J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.316-322, 1988.

McGowan JP. Scrapie in sheep. **Journal of Agriculture**, v.5, p.365–375, 1922.

Minson DJ, Ludlow MM. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. **Nature**, v.256, p.602, 1975.

Monin G. Recent methods for predicting quality of whole meat. **Meat Science**, v.49, p.S231-S243, 1998.

Moreno Chan R, Valdes VLM. Encefalopatías esponjiformes de los animales de zoológico. **Ciencia Veterinária**, v.7, p.2165,1996

Móri C. **Rastreabilidade de farinhas de origem animal em tecidos de codornas de corte pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ )**. 2007. 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Murray RK. Biomoléculas e métodos bioquímicos. In: MURRAY, R.K. **Harper: Bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1990. p.4-11.

O'leary MH. Carbon isotope fractionation in plants. **Phytochemistry**, v.20, p.553-567, 1981.

Oliveira RP. **Rastreabilidade da farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ )**. 2005. 109 f. Tese. (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Phillips DL. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. **Oecologia**, v.127, p.166-170, 2001.

Piasentier E, Valusso R, Camin F, Versini G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, p.239-247, 2003.

Pocchiari M. Early identification of variant Creutzfeldt-Jakob disease. **British Medical Journal**, v.316, p.563-564, 1998.

Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. **Cell**, v.38, p.127-134, 1984.

Puppim S. **Ovo, o mito do colesterol**. Rio de Janeiro: Ed. Rio, 2004, 216p.

Romanoff AL, Romanoff AJ. 1949. The avian egg. John Wiley & Sons, New York. Second Printing. 918p. 1963.

Rossmann A, Haberhauer G, Holzl S, Horn P, Pichlmayer F, Voerkelius S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. **European Food Research & Technology**, v.211, p.32-40, 2000.

Shibuya EK, Sarkis JES, Neto ON, Moreira MZ, Victoria RL. Souring Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v.160, p.35-43, 2006.

Smith BN, Epstein S. Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of higher plants. **Plant Physiology**, v.47, p.380-384, 1971.

UBA – União Brasileira de Avicultura – Últimos números da avicultura – dezembro de 2007 – Produção de ovos.  
[http://www.uba.org.br/ubanews\\_files/dezembro\\_2007/7\\_producao\\_de\\_ovos.xls](http://www.uba.org.br/ubanews_files/dezembro_2007/7_producao_de_ovos.xls).  
Acesso em 25 mar. 2008.

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América -  
<http://www.ams.usda.gov/poultry/mncs/InternationalPoultryandEgg/2007Reports/PY20070227WIntlPoultryandEgg.pdf> > Acesso em 30 ago. 2007.

Van Der Merve NJ. Carbon isotopes, photosynthesis and archaeology. **American Scientist**, v.70, p.596-606, 1982.

Vogel JC. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD., editors. **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. Academic Press, 1993. p. 29-46.

Werner RA, Schmidt HL. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v.61, p.465-784 2002.

White JW, Winters K, Martin P, Rossmann A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.81, p.610-619, 1998.

Wobeto AP, Fonseca ASK, Lunge VR, Ikuta N. Detecção de proteína animal em ração pela técnica da reação em cadeia da polimerase. In: Conferência APINCO 2006 de Ciência e Tecnologias Avícolas, 2006, Campinas. **Suplemento da Revista Brasileira de Ciência Avícola** - Prêmio José Maria Lamas da Silva 2006. Campinas : FACTA, 2006. p.162.

**CAPÍTULO 2**  
**RASTREABILIDADE DA FARINHA DE CARNE E OSSOS BOVINA EM OVOS DE**  
**POEDEIRAS COMERCIAIS PELA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DO**  
**CARBONO E NITROGÊNIO**

## **Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovina em ovos de poedeiras comerciais pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio**

### **Resumo**

O estudo objetivou rastrear a inclusão de farinha de carne e ossos bovina (FCOB) em dietas de poedeiras comerciais, por meio da análise dos ovos e suas frações (gema e albúmen), pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio, assim como avaliar o índice analítico mínimo detectável. Foram utilizadas 240 galinhas poedeiras da linhagem *Shaver White* de 73 semanas de idade, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis repetições. Os tratamentos consistiram de níveis de inclusão (0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0%) de FCOB na dieta a base de milho e farelo de soja. No 35º dia foram tomados aleatoriamente 24 ovos por tratamento, dos quais 12 serviram para amostragem de gema e albúmen e os outros 12 para ovo (gema + albúmen). Os resultados isotópicos foram submetidos à análise multivariada de variância e a partir das matrizes de erro, com 95% de confiança, foram determinadas elipses para identificar as diferenças entre os tratamentos experimentais (dietas com FCOB) e o grupo controle (0% de FCOB). No ovo e na gema a partir do par isotópico do tratamento com inclusão de 3,0% de FCOB houve diferenciação do par do tratamento controle, no albúmen a diferenciação ocorreu a partir do tratamento com 1,5% de FCOB. Conclui-se que, a técnica dos isótopos estáveis é capaz de rastrear a FCOB, utilizada na alimentação de poedeiras, no produto final, em nível mínimo de inclusão de 1,5% no albúmen e 3,0% no ovo e na gema.

**Palavras-chave:** aves, carbono-13, certificação, ingrediente de origem animal, nitrogênio-15

## **Traceability of bovine meat and bones meal in eggs of commercial laying hens through carbon and nitrogen stable isotopes technique**

### **Abstract**

The aim of this study was to trace the inclusion of bovine meat and bones meal (BMBM) in diets of laying hens analyzing eggs and their fractions (yolk and albumen), by carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) stable isotopes, as well as to evaluate the detectable analytical minimal index. Two hundred forty (240) Shaver White laying hens aging 73 weeks never fed with animal origin ingredients were randomly distributed in five treatments and fed with a corn and soybean based diet (control) and four increasing levels (0; 1.5; 3.0; 4.5 and 6.0%) of BMBM. At the 35th day, 24 eggs per treatment were randomly collect, twelve for yolk and albumen sampling and twelve for egg (yolk + albumen) sampling. The isotopic results were analyzed in a multivariate analysis of variance. Through an error matrix (95% confidence) the ellipses were determined to identify the differences among the treatments (diets BMBM inclusion) from the control group (0% BMBM group). It was possible to detect BMBM inclusion through the isotopic pair of yolk and egg at 3.0% of inclusion. In the albumen it was possible to detect the 1.5% BMBM inclusion. In summary, the stable isotopes technique is able to trace BMBM in laying hens feed, in the final product at a minimal level of inclusion of 1.5% in the albumen and 3.0% in the egg and yolk.

**Key-words:** avian, carbon-13, animal origin ingredients, certification, nitrogen-15

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Gomes (2006), a manutenção da qualidade dos alimentos é, nos dias de hoje, a maior preocupação dos consumidores do mundo inteiro. A questão do uso de antimicrobianos como aditivos em avicultura versus o desenvolvimento de resistência bacteriana, a polêmica dos alimentos transgênicos e os recentes episódios ocorridos na Europa, envolvendo a ocorrência de um surto de contaminação de carne de frango por dioxina e o aparecimento da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) mais conhecida como “mal da vaca louca” têm despertado cada vez mais a atenção dos consumidores para a importância da qualidade dos alimentos que são ingeridos.

Devido ao aparecimento em 1995 da nova variante da Creutzfeldt-Jakob (vCJD) doença priônica que acomete o homem pela ingestão de carne bovina (Pocchiari, 1998; Coulthart & Cashman, 2001), a Comunidade Européia (CE) preventivamente fez modificações em suas normas sanitárias, estabelecendo regime de identificação, registro e a rotulagem da carne e de produtos à base de carne bovina (CE nº. 1760/2000). Outra modificação foi a restrição do uso de subprodutos de origem animal em rações de animais da mesma espécie (CE nº. 1774/2002).

A avicultura brasileira busca fornecer aos consumidores produtos de qualidade indiscutível. Por isso, se utiliza de diversas ferramentas de gestão e controle de qualidade em sua cadeia, como o HACCP (Análise de Risco e Controle de Pontos Críticos) ou o BPF (Boas Práticas de Fabricação). Porém não dispõe de sistema de identificação oficial como o SISBOV (Sistema Brasileiro de Identificação e Certificação de Origem Bovina e Bubalina), específico para a cadeia de bovinos e bubalinos (Cerutti, 2002).

Além dessas ferramentas de gestão e controle de qualidade, seria desejável que houvesse análise de contra prova que auxiliasse atestar a veracidade das informações constantes no histórico alimentar de lotes de produtos diferenciados (carne e ovos provenientes de aves alimentadas com dieta estritamente vegetal), que pudesse monitorar o processo de rastreabilidade e fornecer laudos técnicos para as auditorias, como instrumento de confiabilidade (Oliveira, 2005).

Por isso, muitos métodos têm sido propostos para identificar a presença de subprodutos de origem animal em rações para animais, tais como, hibridização de DNA, ELISA e PCR (Bloch Junior, 2002), contudo, estes métodos não identificam o subproduto de origem animal no produto final, ou seja, carne e ovos.

A espectrometria de massas, por meio da análise da razão isotópica carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) tem sido usada com sucesso para testar a autenticidade e a qualidade de vários produtos tais como sucos de frutas (Bricout & Koziat, 1987; Koziat *et al.*, 1993), vinhos (Martin *et al.*, 1988), méis (Brookes *et al.*, 1991; White *et al.*, 1998) e produtos lácteos (Rossmann *et al.*, 2000; Manca *et al.*, 2001). Além da caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos Ibéricos, possibilitando a classificação dos animais de acordo com o tipo de alimentação recebida durante o período de engorda (González-Martin *et al.*, 1999).

Porém, fundamentados no estudo de Piasentier *et al.* (2003), que certificaram a origem geográfica e tipos de alimentação de ovinos, por meio da razão isotópica do carbono-13 em associação a do nitrogênio-15, surgiu, no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP campus de Botucatu, a linha de pesquisa que visa rastrear subprodutos de origem animal na dieta de aves no produto final (Oliveira, 2005; Carrijo *et al.*, 2006; Gottmann, 2007; Móri, 2007).

A detecção da presença de subprodutos de origem animal na alimentação de aves e outras espécies animais no produto final torna-se possível levando em consideração que a assinatura isotópica da dieta é refletida no organismo dos animais, pois o animal é o que consome isotopicamente, por volta de 2,0‰ para  $\delta^{13}\text{C}$  e em torno de 3,0‰ para  $\delta^{15}\text{N}$  (DeNiro & Epstein, 1976; 1978; 1981; Koch *et al.*, 1994).

Denadai *et al.* (2005), em estudo de ovos de dois produtores da região de Bastos/SP, em que um afirmava utilizar apenas produtos de origem vegetal na alimentação das poedeiras e outro, utilizava produto de origem animal. Observaram pelo sistema de duplo eixo isotópico ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) que estes ovos possuíam padrões isotópicos distintos, sugerindo a possibilidade de rastrear a inclusão de farinha de origem animal na alimentação das poedeiras e detectando-a no produto final (ovo), uma vez que ocorre enriquecimento isotópico de carbono e nitrogênio, simultaneamente, com a inclusão de farinha de origem animal.

Portanto, o presente estudo objetivou rastrear a inclusão de farinha de carne e ossos bovina em dietas de poedeiras comerciais, por meio da análise dos ovos e suas frações (gema e albúmen), pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio, assim como avaliar o índice analítico mínimo detectável.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na UNESP, campus de Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, nas instalações do setor de Avicultura da Fazenda Experimental Edgárdia, no período de 14 de setembro a 19 de outubro de 2006.

Foram utilizadas 240 galinhas poedeiras da linhagem *Shaver White* com 73 semanas de idade, alojadas em gaiolas metálicas de dimensões: 1,00 m de comprimento x 0,45 m de profundidade e 0,40 m de altura, com comedouros tipo calha independentes e bebedouros tipo linear de água corrente, ambos localizados frontalmente. A densidade utilizada foi de oito aves por gaiola. Tanto a água como a ração foram fornecidos à vontade. O programa de iluminação artificial adotado foi de 16 horas de luz/dia.

As aves que nunca haviam recebido anteriormente dietas com inclusão de farinhas de origem animal, durante 35 dias, passaram a receber as dietas experimentais, a fim de substituir o carbono e o nitrogênio dos tecidos envolvidos na produção dos ovos pelos da nova dieta. O período experimental foi determinado levando em consideração os dados de Denadai *et al.* (2005), de 24,5 a 33,6 dias para a substituição total do carbono nos ovos, quando avaliaram metabolicamente quatro dietas C<sub>3</sub> e/ou C<sub>4</sub> em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, seis repetições, considerando-se como repetição uma gaiola. Os tratamentos utilizados consistiram de níveis de inclusão de 0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0% de farinha de carne e ossos bovina (FCOB) na dieta a base de milho e farelo de soja.

Os ingredientes utilizados no preparo das dietas experimentais tiveram seus teores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos, estimados por Rostagno *et al.* (2005), apenas a FCOB foi analisada bromatologicamente e apresentou 93,75% de matéria seca (MS), 45,75% de proteína bruta (PB), 8,43% de extrato etéreo (EE), 48,17% de matéria mineral (MM).

As dietas (Tabela 1) foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais das aves, também estabelecidas por Rostagno *et al.* (2005), e balanceadas para que os teores fossem isoenergéticos, isoprotéicos, isocálcicos, isofosfóricos e isoaminoácidos para metionina + cistina e lisina.

**Tabela 1** – Composição percentual e níveis nutricionais calculados das dietas experimentais

<b>INGREDIENTES (%)</b>	<b>TC*</b>	<b>1,5%FC*</b>	<b>3,0%FC*</b>	<b>4,5%FC*</b>	<b>6,0%FC*</b>
Milho moído	64,91	66,12	66,33	66,39	66,42
Farelo de soja – 45	22,72	21,13	19,73	18,34	16,98
Farinha de carne e ossos	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
Óleo de soja	0,45	0,06	0,00	0,00	0,00
Calcário calcítico	9,71	9,46	9,22	9,00	8,70
Fosfato bicálcico	1,51	1,02	0,52	0,00	0,00
DL-Metionina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
L-Lisina	0,00	0,01	0,03	0,04	0,05
Sal comum	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Suplemento vitamínico <sup>1</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento mineral <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Caulim	0,00	0,00	0,47	1,03	1,15
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS</b>					
Energia metabolizável (kcal/kg)	2750	2750	2750	2750	2750
Proteína bruta (%)	16,00	16,01	16,00	16,01	16,01
Cálcio total (%)	4,05	4,05	4,05	4,05	4,05
Fósforo disponível (%)	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
Fibra bruta (%)	2,61	2,58	2,56	2,50	2,44
Metionina (%)	0,41	0,41	0,41	0,40	0,40
Aminoácidos não sulfurados (%)	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
Lisina (%)	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79

\* : TC = tratamento controle; 1,5%FC = tratamento com inclusão de 1,5% de FCOB; 3,0%FC = tratamento com inclusão de 3,0% de FCOB; 4,5% = tratamento com inclusão de 4,5% de FCOB; e 6,0%FC = tratamento com inclusão de 6,0% de FCOB.

<sup>1</sup>- Suplemento vitamínico por kg de ração: Vitamina A: 10.000 UI; Vitamina D<sub>3</sub>: 2.000 UI; Vitamina E: 12,5 mg; Vitamina K<sub>3</sub>: 2,5 mg; Vitamina B<sub>1</sub>: 2,4 mg; Vitamina B<sub>2</sub>: 6 mg; Vitamina B<sub>6</sub>: 3,2 mg; Vitamina B<sub>12</sub>: 12 mcg; ácido fólico, 1 mg, Pantotenato de cálcio: 12,5 mg; Niacina: 30 mg; Antioxidante: 15mg; Selênio: 0,3 mg.

<sup>2</sup>- Suplemento mineral por kg de ração: Cobre: 12 mg; Ferro: 50 mg; Iodo: 1 mg; Manganês: 65 mg; Zinco: 50 mg.

No 35º dia foram tomados aleatoriamente 24 ovos por tratamento (quatro por repetição), dos quais 12 ovos (dois por repetição) serviram para colheitas de amostras de gema e albúmen e os outros 12 (dois por repetição) para ovo (gema + albúmen). Os ovos para a amostragem de gema e albúmen foram separados e armazenados em sacos plásticos devidamente identificados. Os ovos foram homogeneizados em liquidificador e também armazenados em sacos plásticos identificados. As amostras após a identificação foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

Na etapa de processamento, as amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi - modelo MA 035) a  $56^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas o albúmen e por 48 horas o ovo e a gema. Depois de secas foram moídas criogenicamente (moinho criogênico Spex-modelo 6750 freezer/mill), à  $-190^{\circ}\text{C}$ . Neste moinho, aproximadamente 2,0 g de cada amostra foi colocado individualmente em frasco de policarbonato, juntamente com uma barra magnética, que devidamente fechado, foi imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética submetida a um campo magnético oscilante (15 impactos/s) pulverizou-se a amostra. O programa utilizado na moagem das amostras compreendeu-se de uma primeira etapa de pré-congelamento de um minuto e uma segunda etapa de congelamento e pulverização de 3 minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que  $60\ \mu\text{m}$  (Licatti, 1997; Rosa, *et al.*, 2002; Ducatti, 2004).

Após a moagem as amostras de ovos (gema + albúmen) e gemas foram acondicionadas em papel filtro devidamente identificadas para a extração da gordura. Pois Tieszen *et al.* (1983), afirmam que frações que possuem quantidade de lipídeos considerável são relativamente pobre em carbono-13, quando comparadas às que possuem pouco lipídeos. Por meio do aparelho de Soxhlet as amostras foram imersas em éter etílico (PA) e mantidas sob temperatura em torno de  $55$  e  $65^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Após este período as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas éter recondicionado as lavasse. Posteriormente as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora, para que houvesse evaporação do éter. Estas amostras foram moídas novamente para homogeneização.

As análises foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu, de forma que, pesou-se em cápsulas de estanho, aproximadamente  $50$  a  $60\ \mu\text{g}$  e  $500$  a  $600\ \mu\text{g}$  de amostras de ovos e suas frações para a determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio,

respectivamente. Para razão a massa utilizada foi de 60 a 70 µg e 1600 a 1700 µg, respectivamente. As cápsulas foram introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elementar (EA 1108 - CHN - Fisons Instruments, Rodano, Itália), no qual as amostras foram queimadas para a formação de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (Delta S - Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

Os valores das razões isotópicas foram expressos na notação delta (δ) relativos aos padrões internacionais PeeDee Belemnite (PDB) para o carbono-13 e nitrogênio do ar atmosférico para nitrogênio-15, de acordo com a seguinte equação geral (1) (Ducatti, 2004):

$$\delta_{(amostra, padrão)} = [(R_{amostra} - R_{padrão}) / R_{padrão}] \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

R representa a razão entre o isótopo menos abundante e o mais abundante, em particular <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C e <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N. Adimensional.

Os resultados isotópicos obtidos foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) com auxílio do procedimento GLM do programa estatístico SAS (1996). A partir dos dados gerados pelas matrizes de erro, com 95% de confiança, foram determinadas regiões (elipses) para verificar as diferenças entre as médias dos tratamentos experimentais (dietas com adição de FCOB) e a média do grupo controle (dieta estritamente vegetal).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores isotópicos dos principais ingredientes e das dietas experimentais (Tabela 2) foram determinados pelo espectrômetro de massas de razões isotópicas. Observou-se que em decorrência do aumento percentual de inclusão de farinha de carne e ossos bovina (FCOB) nas dietas, houve enriquecimento nos valores isotópicos de carbono-13 e nitrogênio-15. Esse fato ocorreu provavelmente, devido às variações na composição percentual dos ingredientes nas dietas. Como estas foram formuladas para serem isocalóricas e isoprotéicas entre si, na medida em que aumentou a inclusão da FCOB ( $\delta^{13}\text{C} = -12,82 \pm 0,13$  e  $\delta^{15}\text{N} = 7,43 \pm 0,22$ ,  $n = 2$ ), diminuiu a de farelo de soja e óleo de soja ( $\delta^{13}\text{C} = -26,57 \pm 0,35$  e  $\delta^{15}\text{N} = 0,43 \pm 0,05$ ;  $\delta^{13}\text{C} = -31,54 \pm 0,21$  e  $\delta^{15}\text{N} =$  ausente, respectivamente,  $n = 2$ ), e aumentou a inclusão de milho ( $\delta^{13}\text{C} = -13,19 \pm 0,03$  e  $\delta^{15}\text{N} = 3,57 \pm 0,23$ ,  $n = 2$ ). Este enriquecimento em  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  concorda com Oliveira (2005), Carrijo *et al.* (2006), Gottmann (2007) e Móri (2007), que utilizaram farinhas de origem animal na dieta de aves (frangos de corte e codornas).

**Tabela 2** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão das dietas ( $n = 2$ ), ovos e suas frações ( $n = 12$ )

TRATAMENTOS	DIETA	OVO	ALBÚMEN	GEMA	
TC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$-15,79 \pm 0,08$	$-18,31 \pm 0,16$	$-18,28 \pm 0,18$	$-18,38 \pm 0,10$
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	$1,53 \pm 0,03$	$4,43 \pm 0,22$	$3,47 \pm 0,18$	$4,46 \pm 0,19$
1,5%FC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$-15,67 \pm 0,09$	$-17,77 \pm 0,14$	$-17,73 \pm 0,19$	$-17,72 \pm 0,19$
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	$1,75 \pm 0,06$	$4,58 \pm 0,14$	$3,68 \pm 0,15$	$4,58 \pm 0,17$
3,0%FC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$-15,35 \pm 0,22$	$-17,43 \pm 0,11$	$-17,54 \pm 0,18$	$-17,60 \pm 0,08$
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	$2,10 \pm 0,06$	$4,81 \pm 0,23$	$3,91 \pm 0,15$	$4,88 \pm 0,28$
4,5%FC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$-14,89 \pm 0,21$	$-17,32 \pm 0,10$	$-17,40 \pm 0,13$	$-17,24 \pm 0,20$
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	$2,36 \pm 0,11$	$5,02 \pm 0,11$	$4,09 \pm 0,07$	$5,08 \pm 0,13$
6,0%FC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$-14,84 \pm 0,32$	$-16,88 \pm 0,13$	$-16,66 \pm 0,18$	$-16,96 \pm 0,13$
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	$2,68 \pm 0,06$	$5,17 \pm 0,23$	$4,83 \pm 0,13$	$5,40 \pm 0,12$

: TC = tratamento controle; 1,5%FC = tratamento com inclusão de 1,5% de FCOB; 3,0%FC = tratamento com inclusão de 3,0% de FCOB; 4,5% = tratamento com inclusão de 4,5% de FCOB; e 6,0%FC = tratamento com inclusão de 6,0% de FCOB.

O enriquecimento das dietas quanto ao carbono-13 poderia ser consequência do enriquecimento isotópico das plantas  $C_4$  em comparação às  $C_3$  (Vogel, 1993), adicionado ao fato do valor isotópico da farinha de origem animal refletir o sinal isotópico da dieta do animal que a deu origem, variando por volta de 2‰ para o  $\delta^{13}C$  (DeNiro & Epstein, 1978).

Quanto ao nitrogênio-15 a diminuição da inclusão do farelo de soja, leguminosa que realiza simbiose com micorrizas, de valor isotópico próximo ao padrão (Handley & Raven, 1992; Werner & Schmidt, 2002), associada ao aumento do milho, rico isotopicamente em nitrogênio-15, que depende do nitrogênio do solo (Choi *et al.*, 2002) e da FCOB também rica em nitrogênio-15, causada pelo reflexo da dieta do animal que a deu origem associada ao enriquecimento à cada elevação no nível trófico do organismo animal (DeNiro & Epstein, 1981), poderia ser a causa do enriquecimento destas dietas.

Nos ovos e suas frações (Tabela 2) foi observado que o enriquecimento de  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  teve comportamento crescente e semelhante ao enriquecimento das dietas devido aos níveis crescentes de inclusão de FCOB. Embora, cada fração do mesmo tratamento possa apresentar assinatura isotópica distinta, estão de acordo com DeNiro & Epstein (1976; 1978; 1981), sendo que o animal é aquilo que consome isotopicamente, com variação em torno de 2‰ para carbono-13 e 3‰ para nitrogênio-15.

Antes do início do experimento foram coletadas e analisadas isotopicamente amostras de ovos ( $n = 8$ ) e da dieta ( $n = 2$ ) que as aves vinham recebendo, os quais apresentaram valores de  $\delta^{13}C = -17,88 \pm 0,20\%$  e  $\delta^{15}N = 4,07 \pm 0,20\%$  para os ovos e  $\delta^{13}C = -15,88 \pm 0,08\%$  e  $\delta^{15}N = 2,28 \pm 0,06\%$  para as dietas. Com a introdução das dietas experimentais esses valores se alteraram (Tabela 2), sendo que a mudança isotópica dos ovos acompanhou a mudança da respectiva dieta, mostrando que houve substituição total isotópica dos tecidos que formam estes ovos, corroborando com Denadai *et al.* (2006) que afirmaram que de 24,5 a 33,6 dias ocorre substituição total dos carbonos nos ovos.

Os valores médios de  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  encontrados para ovo (gema + albúmen), albúmen e gema foram analisados estatisticamente e geraram regiões com 95% de confiança (Figuras 1, 2 e 3).

Para que determinado tratamento seja considerado diferente do grupo controle é necessário que sua região de confiança não sobreponha nenhum eixo do gráfico. O

fato da elipse sobrepor um dos eixos mostra que a diferença entre médias de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  dos tratamentos comparados é igual a zero, e assim os tratamentos não diferem.

No ovo (Figura 1) e na gema (Figura 2) observou-se que as médias do par isotópico do tratamento com 1,5% de inclusão de FCOB (1,5%FC) não foram diferentes ( $p > 0,05$ ) daquelas do tratamento controle (TC), pois a região de confiança deste tratamento sobrepôs o eixo do gráfico com diferença igual a zero para o nitrogênio-15. A partir do tratamento 3,0% FCOB (3,0%FC) as médias dos pares isotópicos se distanciaram dos eixos do gráfico, mostrando-se diferentes estatisticamente do tratamento estritamente vegetal ( $p < 0,05$ ). Porém, todos os tratamentos experimentais da fração albúmen (Figura 3), ou seja, tratamentos com inclusão de FCOB na dieta das aves foram diferentes estatisticamente do tratamento controle ( $p < 0,05$ ).

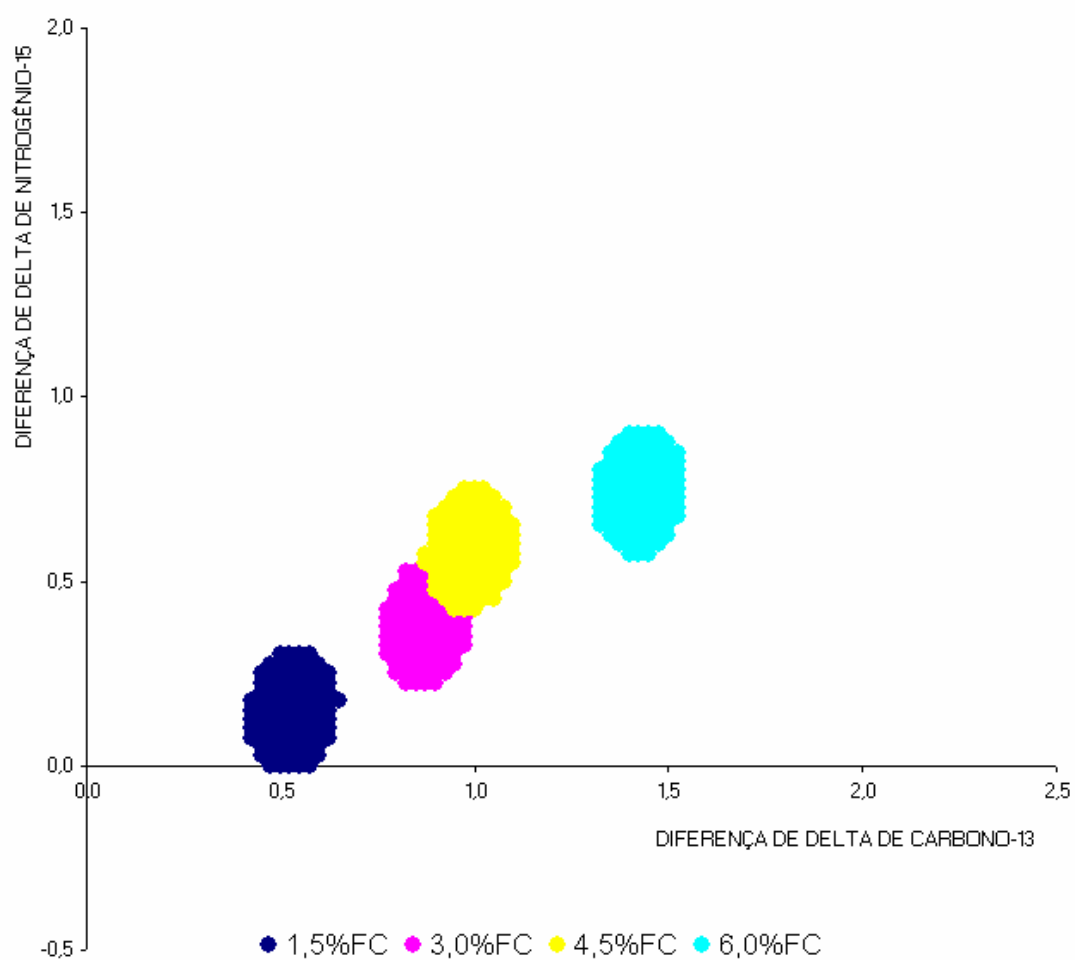
As variações encontradas entre as frações não são bem compreendidas. Para Tieszen *et al.* (1983), as frações bioquímicas diferem isotopicamente entre si, e as diferenças isotópicas do organismo podem ser o reflexo de suas diferentes composições bioquímicas. Frações que possuem em sua composição menor quantidade de lipídeos provavelmente teriam valor de  $\delta^{13}\text{C}$  maior que a fração que apresente maior quantidade de lipídeos, sendo relativamente pobre em carbono-13. Mas a detecção no albúmen do nível de inclusão de 1,5% de FCOB na dieta das poedeiras pode ter ocorrido pelo menor desvio-padrão dos valores de nitrogênio-15 nesta fração (Tabela 2), que geraram menor amplitude dos pontos gerados pela matriz de erro no programa estatístico SAS (1996).

O nível de detecção da FCOB encontrado em ovos neste trabalho foi menor que os encontrados por Carrijo *et al.* (2006) em frangos de corte (8% de FCOB) e Móri (2007) em codornas de corte que foi de 4,5%. A diferença no nível de detecção pode ter ocorrido pela diferença de metabolismo dos tecidos e espécies animais comparados, ou ainda pela diferença no número de repetições. Nesse estudo o número de amostras analisadas de cada fração para a formação das regiões de confiança (análise estatística) foi de 12, enquanto que Carrijo *et al.* (2006) e Móri (2007) utilizaram apenas quatro amostras por tratamento, o que pode ter melhorado a representatividade do resultado encontrado da amostra em relação a população.

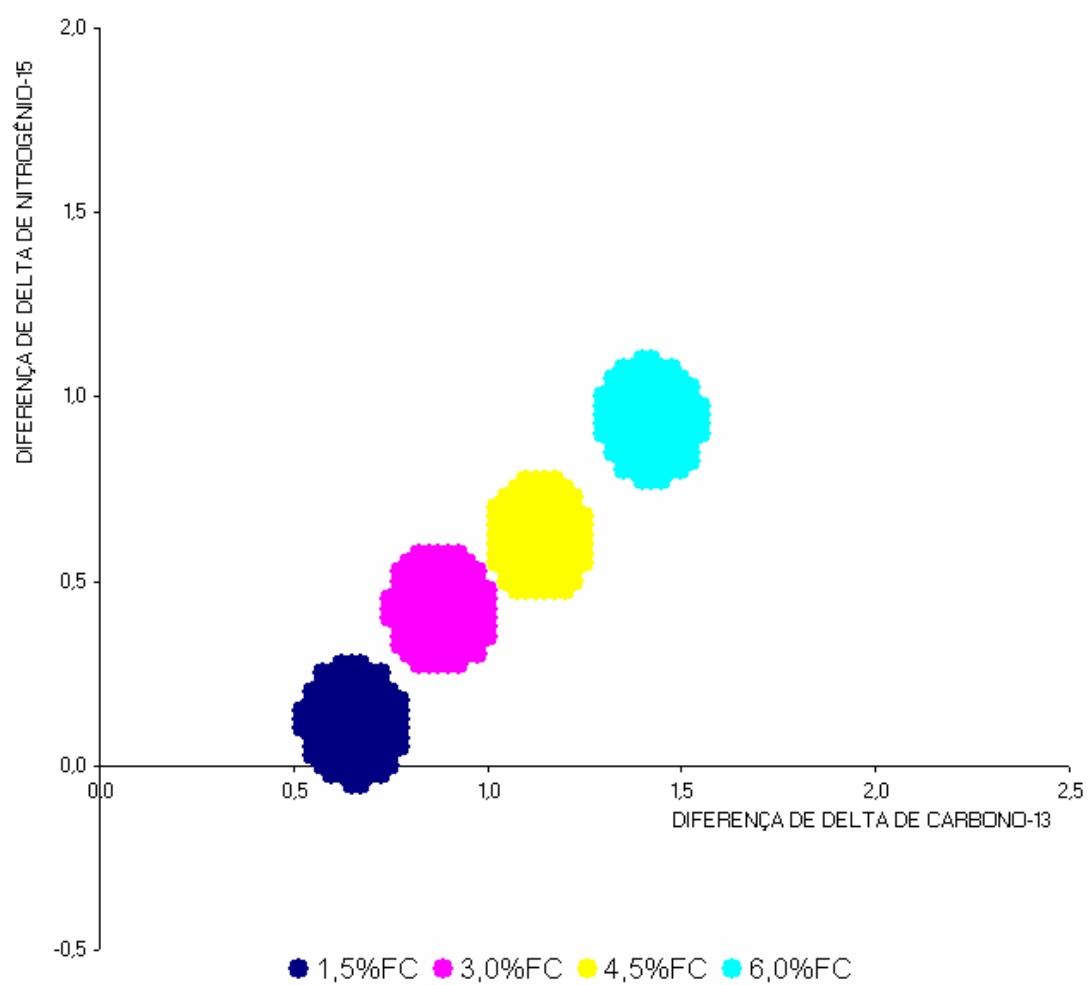
A detecção de FCOB nos ovos e gemas pode ser um nível entre 1,5% e 3,0% de inclusão na dieta das aves, mas para se saber qual o real nível de detecção sugere-se estudos futuros com níveis crescentes entre estes valores.

A comparação dos dados de ovo, gema e albúmen, mostraram que a fração albúmen seria a mais apropriada na detecção da inclusão de FCOB na alimentação de poedeiras, pois diferenciou o menor nível inclusão de FCOB (1,5%) na dieta das aves, enquanto que para ovo e gema, a diferenciação ocorreu apenas a partir de 3,0% de inclusão, nos moldes experimentais. Além disso, desidrata rapidamente, diminuindo o tempo de secagem (24h para o albúmen contra 48h para a gema e ovo) e possui baixos níveis de ácidos graxos, excluindo a etapa de extração de gorduras no processo de preparo da amostra, o que ocasiona mais agilidade ao processo de rastreabilidade.

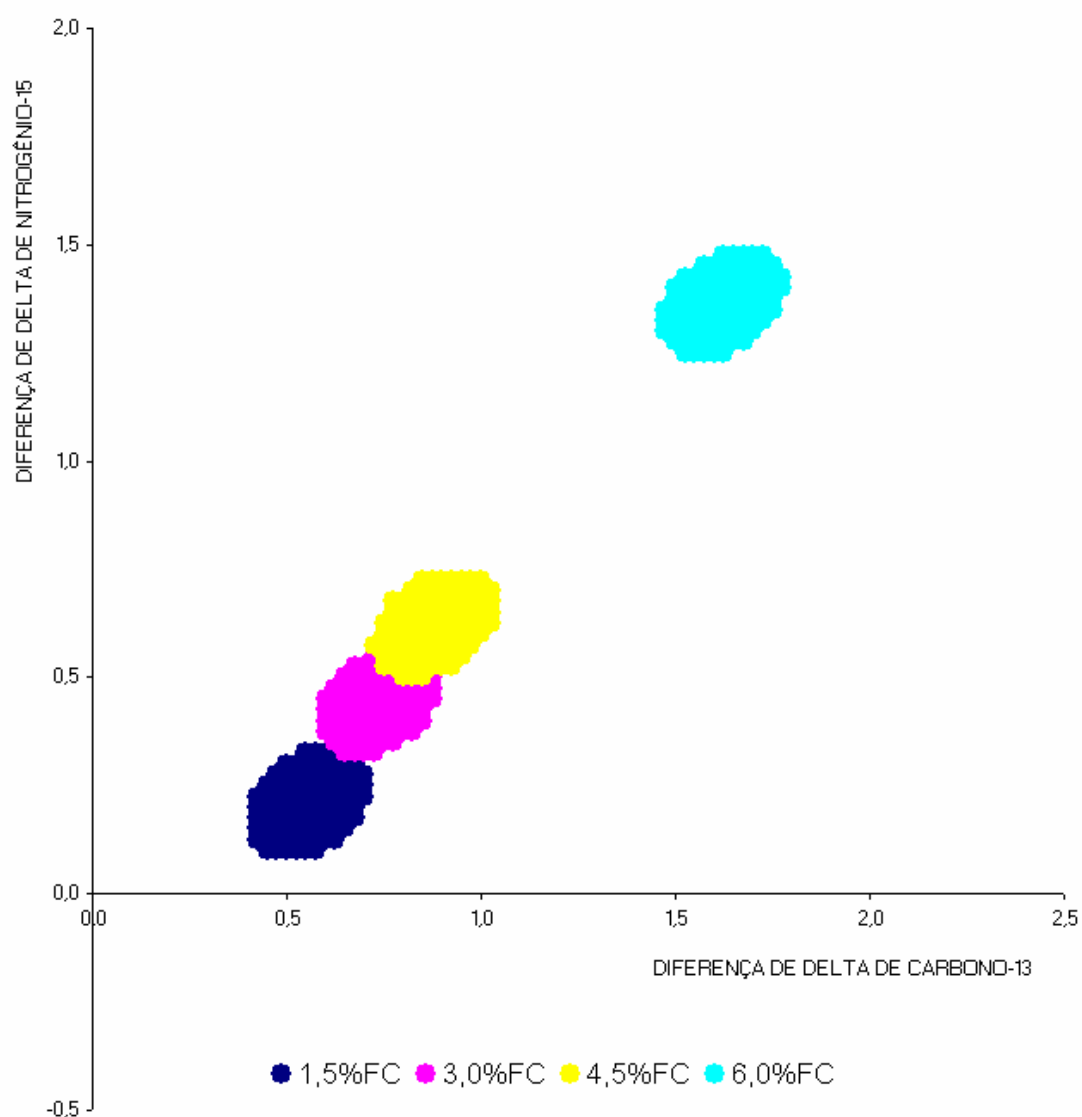




**Figura 1** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do ovo de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)



**Figura 2** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  da gema de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)



**Figura 3** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do albúmen de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, pode-se concluir que:

Em decorrência do aumento percentual de inclusão de FCOB nas dietas ocorre enriquecimento isotópico crescente de carbono-13 e nitrogênio-15 nos ovos e suas frações conforme o enriquecimento das dietas. Sugerindo que a técnica dos isótopos estáveis é capaz de rastrear a FCOB, utilizada na alimentação de poedeiras, no produto final, ou seja, ovos, gema e albúmen.

Por causa da sobreposição das regiões de confiança do tratamento com 1,5% de inclusão de FCOB ao eixo do gráfico com diferença igual a zero para o nitrogênio-15, no ovo e gema, ocorre a não diferenciação deste tratamento com relação ao controle ( $p > 0,05$ ), porém a partir da inclusão de 3,0% FCOB as elipses se distanciam dos eixos do gráfico, mostrando-se diferentes estatisticamente do tratamento estritamente vegetal ( $p < 0,05$ ). Portanto, para ovo e gema, o nível mínimo detectável de FCOB é de 3,0%.

No albúmen o nível mínimo de detecção de FCOB é de 1,5%, pois todas as elipses dos tratamentos experimentais desta fração foram diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento controle.

O nível de detecção de FCOB no ovo e gema pode ser um nível entre 1,5% e 3,0% de inclusão na dieta das aves, mas para se saber qual o real nível de detecção sugere-se estudos futuros com níveis crescentes entre estes valores.

A fração albúmen seria a mais apropriada na detecção de baixos níveis de inclusão de FCOB na alimentação de poedeiras, pois detecta o menor nível inclusão de FCOB na dieta das aves, além disso, desidrata rapidamente, diminuindo o tempo de secagem e possui baixos níveis de ácidos graxos, excluindo a etapa de extração de gorduras no processo de preparo da amostra, o que ocasiona mais agilidade ao processo de rastreabilidade.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Block Junior C. Monitoramento da qualidade de rações brasileiras para ruminantes por espectrometria de massa. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p.251-252.

Bricout J, Koziat J. Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.35, p.758-760, 1987.

Brookes ST, Barrie A, Davies JE. A rapid  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  test for determination of corn-syrups in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.74, p.627-629, 1991.

Carrijo AS, Pezzato AC, Ducatti C, Sartori JR, Trinca L, Silva ET. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.37-42, 2006.

Cerutti M. Aplicação de um programa de rastreabilidade na cadeia de frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 253-264.

Choi WJ, Lee SM, Ro HM, Kim KC, Yoo SH. Natural  $^{15}\text{N}$  abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, v.245, p.223-232, 2002.

Comunidade Européia. Regulamento (CE) No. 1760/2000. Official Journal of the European Communities. Disponível em: [http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32000R1760&model=guichett](http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32000R1760&model=guichett) Acesso em: 28 ago. 2007.

Comunidade Européia. Regulamento (CE) No. 1774/2002. Official Journal of the European Communities. Disponível em: [http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32002R1774&model=guichett](http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sqa_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=PT&numdoc=32002R1774&model=guichett) Acesso em: 30 ago. 2007.

Coulthart MB, Cashman NR. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: a summary of current scientific knowledge in public health. **Canadian Medical Association Journal**, v.165, p.51-58, 2001.

Denadai JC, Ducatti C, Caldara FR, Oliveira RP, Silva ET. Certificação de Ovos de Poedeiras Comerciais pela Técnica dos Isótopos Estáveis. In: III Congresso de Produção e Consumo de Ovos - APA, 2005, Indaiatuba. **Anais...** - APA, 2005.

Denadai JC, Ducatti C, Pezzato AC, Carrijo AS, Caldara FR, Oliveira RP. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, p.251-256, 2006.

DeNiro MJ, Epstein S. You are what you eat (plus a few ‰) the carbon isotope cycle in food chains. **Geological Society of America**, v.6, p.834, 1976. (Abstract).

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, p.495-506, 1978.

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.45, p.341-351, 1981.

Ducatti C. **Isótopos estáveis ambientais**. [Apostila] 2004. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004, 184p.

Gomes JPC. Biossegurança X Rastreabilidade. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006, Santa Maria. **Anais...**Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006. p.100-104.

González-Martin I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Marqués-Macias E, Sanz-Poveda F. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. **Meat Science**, v.52, p.437-441, 1999.

Gottmann R. **Influência da composição das rações na rastreabilidade de farinhas de origem animal pela técnica dos isótopos estáveis em frangos de corte**. 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Handley LL, Raven JA. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v.15, p.965-985, 1992.

Koziet J, Rossmann A, Martin GJ, Ashurst PR. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. **Analytica Chimica Acta**, v.271, p.31-38, 1993.

Licatti F. **Isótopos estáveis do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) em plantas do ciclo bioquímico  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$** . 1997. 65f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 1997.

Manca G, Camin F, Coloru G, Del Caro A, Detentori D, Franco MA, Versini G. Characterization of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) ratios and free amino acid ratios. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1404-1409, 2001.

Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep X, Aerny J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.316-322, 1988

Móri C. **Rastreabilidade de farinhas de origem animal em tecidos de codornas de corte pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ )**. 2007. 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Oliveira RP. **Rastreabilidade da farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ )**. 2005. 109 f. Tese. (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Piasentier E, Valusso R, Camin F, Versini G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v.64, p.239-247, 2003.

Pocchiari M. Early identification of variant Creutzfeldt-Jakob disease. **British Medical Journal**, v.316, p.563-564, 1998.

Rosa CR, Moraes M, Neto JAG, Nobrega JA, Nogueira AR. Effect of modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.79, p.517-523, 2002.

Rossmann A, Haberhauer G, Holzl S, Horn P, Pichlmayer F, Voerkelius S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. **European Food Research & Technology**, v.211, p.32-40, 2000.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC, Barreto SLT. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa (MG), UFV; 2005. 186p.

SAS Institute Inc., SAS/STAT. **User's guide**. Version 6.11. 4. ed., v. 2. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 842p.

Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p.32-37, 1983.

Vogel JC. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD., editors. **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. Academic Press, 1993. p.29-46.

Werner RA, Schmidt HL. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v.61, p.465-784, 2002.

White JW, Winters K, Martin P, Rossmann A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.81, p.610-619, 1998.

**CAPÍTULO 3**  
**RASTREABILIDADE DAS FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL EM OVOS DE**  
**POEDEIRAS COMERCIAIS E SUAS FRAÇÕES (GEMA E ALBÚMEN) PELA**  
**TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DO CARBONO E NITROGÊNIO**



**Rastreabilidade das farinhas de origem animal em ovos de poedeiras comerciais e suas frações (gema e albúmen) pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio**

**Resumo**

O estudo objetivou rastrear a inclusão de farinhas de origem animal em dietas de poedeiras comerciais, por meio da análise dos ovos e suas frações (gema e albúmen), pela técnica dos isótopos do carbono e nitrogênio. Foram utilizadas 288 galinhas poedeiras da linhagem *Shaver White* com 73 semanas de idade. As aves foram distribuídas aleatoriamente em seis tratamentos, com seis repetições. Os tratamentos consistiam de um tratamento controle a base de milho e farelo de soja (TC) e cinco tratamentos experimentais, com inclusão de farinha de carne e ossos bovina (FCOB), farinha de vísceras de aves (FVA), farinha de penas (FP), estritamente, ou de misturas de farinha de vísceras de aves e penas (FVP) ou de farinha de carne e ossos bovina, farinha de vísceras de aves e penas (FCVP) em dieta a base milho e farelo de soja. Os resultados isotópicos foram submetidos à análise multivariada de variância e a partir das matrizes de erro, com 95% de confiança, foram determinadas elipses para identificar as diferenças entre os tratamentos experimentais e o grupo controle. No ovo, apenas o par isotópico do tratamento FVA não diferenciou do par do tratamento controle ( $p > 0,05$ ), no albúmen e na gema todos os tratamentos experimentais foram diferentes estatisticamente do estritamente vegetal ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que, nas condições experimentais, a técnica dos isótopos estáveis é capaz de rastrear as farinhas de origem animal, utilizadas na alimentação de poedeiras, no produto final.

**Palavras-chave:** aves, carbono-13, certificação, EEB, nitrogênio-15

**Traceability of animal origin meal in eggs of commercial laying hens and their fractions (yolk and albumen) through carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) stable isotopes technique**

**Abstract**

The aim of this paper was to trace the inclusion of animal origin meal in diets for laying hens through analyzing eggs and their fractions (yolk and albumen) by carbon and nitrogen isotopes technique. Two-hundred and eighty-eight (288) laying hens Shaver White 73 weeks old never fed with animal origin ingredients were randomly distributed in six treatments with six replicates each. The treatments were: control – corn and soybean meal based diet and five other experimental diets including bovine meat and bones meal (BMBM); viscera of avian meal (VAM); feather meal (FM); feather meal and viscera of avian meal (FVAM), viscera of avian meal, feather meal and bovine meat and bones meal (VAMFMBM). The isotopic results were analyzed in a multivariate analysis of variance. Through an error matrix (95% confidence) the ellipses were determined to identify the differences among the treatments and the control group. In the egg, only the VAM isotopic pair was not different from the control ( $p > 0.05$ ). In the albumen and yolk all the experimental treatments were significantly different from the control diet ( $p < 0.05$ ). In summary, the stable isotopes technique is able to trace the animal origin meal included in the laying hens feed in the final product at this experimental conditions

**Key-words:** avian, BSE, carbon-13, certification, nitrogen-15

## 1. INTRODUÇÃO

A técnica estabelecida como padrão para detecção de proteína animal em rações é a microscopia por sedimentação, capaz de identificar a presença de farinha de carne e ossos em concentrações de 0,1% e se baseia na identificação de fragmentos de ossos presentes na ração (Wobeto *et al.*, 2006).

Conforme Bloch Junior (2002), muitos métodos têm sido propostos para identificar a presença de subprodutos de origem animal em rações para animais, tais como, hibridização de DNA, ELISA e PCR. A hibridização de DNA consiste na extração do DNA animal da ração e sua amplificação pela reação de polimerase em cadeia. O método de ELISA é um ensaio imuno-enzimático de anticorpos para os subprodutos de origem animal na ração e o método de PCR consiste em testar *primers* específicos para o gene do citocromo B do DNA mitocondrial de bovinos e suínos e do gene de colágeno para detecção de aves em rações animais.

Nenhum destes métodos é realizado no produto final, ou seja, carne, ovos, leite, etc., o que deixa brechas para fraudes. Porém a espectrometria de massas, por meio da análise da razão isotópica para o elemento químico carbono, tem sido usada com sucesso para testar a autenticidade e a qualidade de vários produtos tais como sucos de frutas (Bricout & Koziat, 1987; Koziat *et al.*, 1993), vinhos (Martin *et al.*, 1988), méis (Brookes *et al.*, 1991; White *et al.*, 1998) e produtos lácteos (Rossmann *et al.*, 2000; Manca *et al.*, 2001). Além da caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos Ibéricos, possibilitando a classificação dos animais de acordo com o tipo de alimentação recebida durante o período de engorda (González-Martin *et al.*, 1999) e a certificação de origem e de qualidade de produtos de origem animal (Hargin, 1996; Monin, 1998; González-Martin *et al.*, 2001).

Segundo Ducatti (2004), observa-se na literatura ampla variabilidade de aplicações da diluição isotópica de um único elemento químico, como por exemplo, o carbono. Entretanto, a aplicabilidade de dois isótopos de elementos químicos diferentes, como carbono versus nitrogênio ou deutério versus oxigênio, são extremamente escassos na literatura.

A razão isotópica do carbono-13 associada a do nitrogênio-15 permitiu a certificação da origem geográfica e tipos de alimentação de ovinos (Piasentier *et al.*, 2003). No Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP, campus de Botucatu, fundamentados na metodologia de cálculo pelo sistema de equações de duas fontes e

dois isótopos (Ducatti, 2004), surgiu a linha de pesquisa que visa detectar no produto final, a inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação de aves.

Inicialmente Carrijo *et al.* (2006), rastrearam no músculo peitoral a inclusão de FCOB na alimentação de frangos de corte. Em seguida Oliveira (2005), analisou músculo peitoral, quilha e tibia de frangos de corte, com o objetivo de identificar qual destes tecidos seria melhor para rastrear a farinha de vísceras de aves na dieta de frangos de corte em alguma fase da criação. Finalmente em frangos, Gottmann (2007), identificaram no músculo peitoral a inclusão de farinha de vísceras de aves na alimentação, mesmo com a adição de outros ingredientes alternativos (farelo de trigo e levedura).

A partir destes trabalhos surgiu a idéia de testar a técnica em outras aves, como por exemplo, poedeiras e codornas. Denadai *et al.* (2005), avaliaram ovos de poedeiras de dois produtores da região de Bastos/SP, em que um utilizava apenas produtos de origem vegetal e outro, utilizava subproduto de origem animal. Observaram pelo sistema de duplo eixo isotópico ( $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ ) que estes ovos possuíam padrões isotópicos distintos, sugerindo a possibilidade de rastrear a inclusão de farinha de origem animal na alimentação de poedeiras e detectando-a no ovo. Com a inclusão de níveis crescentes de FCOB na dieta de poedeiras, Denadai (Capítulo 2) detectou a inclusão de 1,5% de FCOB no albúmen e 3,0% no ovo e gema. Em codornas de corte Móri (2007), detectou os subprodutos de origem animal utilizados nas dietas destas aves, no músculo peitoral, quilha e tibia.

Com a finalidade de aprimorar a técnica dos isótopos estáveis do  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ , o presente estudo objetivou rastrear a inclusão de farinhas de origem animal (farinha de carne e ossos bovina e/ou farinha de vísceras de aves e/ou farinha de penas) em dietas de poedeiras comerciais, por meio da análise dos ovos e suas frações (gema e albúmen).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 288 galinhas poedeiras da linhagem *Shaver White* com 73 semanas de idade, da UNESP, campus de Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, do setor de Avicultura, da Fazenda Experimental Edgárdia.

As gaiolas metálicas, nas quais as aves foram alojadas, possuíam dimensões de 1,00 m de comprimento x 0,45 m de profundidade e 0,40 m de altura. Eram equipadas com comedouros tipo calha independentes e bebedouros tipo linear de água corrente, ambos localizados frontalmente. Tanto a água como a ração foram fornecidos à vontade. O programa de iluminação artificial adotado foi de 16 horas de luz/dia.

As aves foram distribuídas aleatoriamente em seis tratamentos, com seis repetições, considerando-se como repetição uma gaiola com densidade de oito aves. Os tratamentos experimentais consistiam de um tratamento controle a base de milho e farelo de soja (TC) e cinco tratamentos experimentais, com inclusão de farinha de carne e ossos bovina (FCOB), farinha de vísceras de aves (FVA), farinha de penas (FP), estritamente, ou de misturas de farinha de vísceras de aves e penas (FVP) ou de farinha de carne e ossos bovina, farinha de vísceras de aves e penas (FCVP) em dieta a base milho e farelo de soja.

As dietas experimentais, FVA, FP, FVP e FCVP, foram padronizadas para serem equivalentes em proteína digestível de origem animal à ração com 4,5% de FCOB. Além disso, as misturas FVP e FCVP receberam proporcionalmente a inclusão de FVA e FP e FCOB, FVA e FP, respectivamente. A proteína digestível das farinhas de origem animal tiveram seus valores estimados por Rostagno *et al.* (2005).

Os ingredientes utilizados no preparo das dietas experimentais tiveram seus teores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos, estimados por Rostagno *et al.* (2005). Porém as farinhas de origem animal foram analisadas bromatologicamente, a FVA apresentou 96,14% de matéria seca (MS); 65,54% de proteína bruta (PB); 12,47% de extrato etéreo (EE); 14,49% de matéria mineral (MM). A FP apresentou 93,26% de MS; 88,18% de PB; 7,92% de EE; 2,25% de MM e a FCOB apresentou 93,75% de MS; 45,75% de PB; 8,43% de EE; 48,17% de MM.

As dietas (Tabela 1) foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais das aves também estabelecidas por Rostagno *et al.* (2005) e balanceadas para que os teores fossem isoenergéticos, isoprotéicos, isocálcicos, isofosfóricos e isoaminoacídicos para metionina + cistina e lisina.

**Tabela 1** – Composição percentual e níveis nutricionais calculados das dietas experimentais

<b>INGREDIENTES (%)</b>	<b>TC</b>	<b>FCOB</b>	<b>FVA</b>	<b>FP</b>	<b>FVP</b>	<b>FCVP</b>
Milho moído	64,91	66,39	66,21	67,58	66,91	66,73
Farelo de soja – 45	22,72	18,34	18,40	17,21	17,82	18,01
Farinha de carne e ossos	0,00	4,50	0,00	0,00	0,00	1,50
Farinha de vísceras	0,00	0,00	3,20	0,00	1,60	1,06
Farinha de penas	0,00	0,00	0,00	2,60	1,30	0,87
Óleo de soja	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Calcário calcítico	9,71	9,00	9,62	9,74	9,67	9,44
Fosfato bicálcico	1,51	0,00	1,12	1,48	1,31	0,88
DL-Metionina	0,15	0,15	0,14	0,13	0,12	0,13
L-Lisina	0,00	0,04	0,01	0,11	0,06	0,05
Sal comum	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Suplemento vitamínico <sup>1</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento mineral <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Caulim	0,00	1,03	0,75	0,60	0,66	0,78
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS</b>						
Energia metabolizável (kcal/Kg)	2750	2750	2750	2750	2750	2750
Proteína bruta (%)	16,00	16,00	16,00	16,00	16,01	16,01
Cálcio total (%)	4,05	4,05	4,05	4,05	4,05	4,05
Fósforo disponível (%).	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
Fibra bruta (%)	2,61	2,44	2,34	2,16	2,26	2,32
Metionina (%)	0,41	0,40	0,41	0,37	0,37	0,37
Aminoácidos não sulfurados (%)	0,68	0,68	0,68	0,74	0,69	0,68
Lisina (%)	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79

: TC = tratamento controle; FCOB = tratamento com FCOB; FVA = tratamento com FVA; FP = tratamento com FP; FVP = tratamento com FVA e FP e FCVP = tratamento com FCOB, FVA e FP.

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico por kg de ração: Vitamina A: 10.000 UI; Vitamina D<sub>3</sub>: 2.000 UI; Vitamina E: 12,5 mg; Vitamina K<sub>3</sub>: 2,5 mg; Vitamina B<sub>1</sub>: 2,4 mg; Vitamina B<sub>2</sub>: 6 mg; Vitamina B<sub>6</sub>: 3,2 mg; Vitamina B<sub>12</sub>: 12 mcg; ácido fólico, 1 mg, Pantotênato de cálcio: 12,5 mg; Niacina: 30 mg; Antioxidante: 15mg; Selênio: 0,3 mg.

<sup>2</sup> Suplemento mineral por kg de ração: Cobre: 12 mg; Ferro: 50 mg; Iodo: 1 mg; Manganês: 65 mg; Zinco: 50 mg.

Durante 35 dias as aves receberam as dietas experimentais. O período experimental foi determinado de acordo com Denadai *et al.* (2005), que afirmaram que de 24,5 a 33,6 dias ocorreu a substituição total do carbono nos ovos, quando avaliaram metabolicamente quatro dietas C<sub>3</sub> e/ou C<sub>4</sub> em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono. No final deste período, foram tomados aleatoriamente 24 ovos por tratamento (quatro por repetição), dos quais 12 ovos (dois por repetição) serviram para colheitas de amostras de gema e albúmen e os outros 12 (dois por repetição) para ovo total.

A gema e o albúmen foram separados e armazenados em sacos plásticos devidamente identificados. Os ovos (gema + albúmen) foram homogeneizados em liquidificador e também armazenados em sacos plásticos identificados. As amostras após a identificação foram congeladas a -20°C até o processamento.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi - modelo MA 035) a 56°C por um período de 24 horas para o albúmen e 48 horas para o ovo e a gema. Depois de secas, foram moídas criogenicamente (moinho criogênico Spex-modelo 6750 freezer/mill), à -190°C. Neste moinho foram colocados em frasco de policarbonato, aproximadamente, 2,0 g de amostra juntamente com uma barra magnética, o qual, devidamente fechado, imergiu-se em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética submetida a um campo magnético oscilante (15 impactos/s) pulverizou-se a amostra. O programa utilizado na moagem das amostras compreendeu-se de uma primeira etapa de pré-congelamento de um minuto e uma segunda etapa de congelamento e pulverização de 3 minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que 60 µm (Licatti, 1997; Rosa *et al.*, 2002; Ducatti, 2004).

Após a moagem as amostras de ovos (gema + albúmen) e gemas sofreram extração de gordura. Pois Tieszen *et al.* (1983), afirmam que frações que possuem grande quantidade de lipídeos são relativamente pobre em carbono-13, quando comparadas às que possuem pouco lipídeos. As amostras foram acondicionadas em papel filtro devidamente identificadas e imersas em éter etílico (PA), mantidas sob temperatura em torno de 55 e 65°C por 4 horas no aparelho de Soxhlet. Após este período, as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas éter recondicione as lavasse. Posteriormente as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora, para que houvesse evaporação do éter. Estas amostras foram moídas novamente para homogeneização.

As amostras de ovos e rações foram analisadas no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu. Foram pesadas em cápsulas de estanho, aproximadamente 50 a 60 µg e 500 a 600 µg de amostras de ovos e suas frações para a determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio, respectivamente. Para ração a massa utilizada foi de 60 a 70 µg e 1600 a 1700 µg, respectivamente. As cápsulas foram introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elementar (EA 1108 - CHN - Fisons Instruments, Rodano, Itália) no qual, a amostra foi queimada para a obtenção de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (Delta S - Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

Os valores das razões isotópicas foram expressos em delta per mil (δ) relativos aos padrões internacionais PeeDee Belemnite (PDB) para o <sup>13</sup>C e, nitrogênio do ar atmosférico para <sup>15</sup>N (Ducatti, 2004), de acordo com a seguinte equação geral (1):

$$\delta_{(amostra, padrão)} = [(R_{amostra} - R_{padrão}) / R_{padrão}] \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

R representa a razão entre o isótopo menos abundante e o mais abundante, em particular <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C e <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N. Adimensional.

Os resultados isotópicos obtidos foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) com auxílio do procedimento GLM do programa estatístico SAS (1996). A partir dos dados gerados pelas matrizes de erro, foram determinadas regiões com 95% de confiança para verificar as diferenças entre as médias dos tratamentos experimentais (dietas com adição de farinhas de origem animal) e a média do grupo controle (dieta estritamente vegetal).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em decorrência da inclusão das farinhas de origem animal nas dietas experimentais (valores isotópicos dos ingredientes, vide Tabela 2), houve enriquecimento nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  (Tabela 3). Esse fato ocorreu provavelmente, devido às variações na composição percentual dos ingredientes nas dietas. Este enriquecimento em  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  quando se adiciona farinha de origem animal na dieta de aves também foi observado por Oliveira (2005), Carrijo *et al.* (2006), Gottmann (2007) e Móri (2007).

**Tabela 2** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão (n = 2) dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

INGREDIENTES	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Farinha de carne – 40	-12,82 ± 0,13	7,43 ± 0,22
Farinha de vísceras	-16,28 ± 0,07	4,30 ± 0,03
Farinha de penas	-16,98 ± 0,08	4,44 ± 0,02
Milho moído	-13,19 ± 0,03	3,57 ± 0,23
Farelo de soja – 45	-26,57 ± 0,35	0,43 ± 0,05
Óleo de soja	-31,54 ± 0,21	-

**Tabela 3** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão das dietas (n = 2), ovos e suas frações (n = 12)

TRATAMENTOS	DIETA	OVO	ALBÚMEN	GEMA	
TC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,79 ± 0,08	-18,31 ± 0,12	-18,28 ± 0,15	-18,38 ± 0,08
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	1,53 ± 0,03	4,43 ± 0,18	3,47 ± 0,05	4,44 ± 0,12
FCOB*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-14,89 ± 0,21	-17,32 ± 0,08	-17,40 ± 0,09	-17,24 ± 0,18
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,36 ± 0,11	5,02 ± 0,08	4,09 ± 0,05	5,08 ± 0,09
FVA*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,51 ± 0,10	-17,40 ± 0,16	-17,55 ± 0,11	-17,36 ± 0,20
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	1,97 ± 0,01	4,52 ± 0,12	4,21 ± 0,19	4,88 ± 0,20
FP*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,03 ± 0,01	-17,25 ± 0,14	-17,26 ± 0,10	-17,23 ± 0,15
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,10 ± 0,01	4,83 ± 0,14	4,49 ± 0,09	4,82 ± 0,11
FVP*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-14,96 ± 0,04	-17,26 ± 0,08	-17,29 ± 0,18	-17,22 ± 0,11
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,09 ± 0,09	4,77 ± 0,20	4,44 ± 0,17	4,96 ± 0,19
FCVP*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,33 ± 0,17	-17,36 ± 0,09	-17,42 ± 0,16	-17,45 ± 0,11
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,12 ± 0,03	5,01 ± 0,19	4,63 ± 0,20	5,21 ± 0,19

\* TC = tratamento controle; FCOB = tratamento com FCOB; FVA = tratamento com FVA; FP = tratamento com FP; FVP = tratamento com FVA e FP e FCVP = tratamento com FCOB, FVA e FP.

O enriquecimento das dietas quanto ao carbono-13 ocorreu provavelmente em consequência do enriquecimento isotópico das plantas  $C_4$  em comparação às  $C_3$  (Vogel, 1993), adicionado ao fato do valor isotópico da farinha de origem animal ser reflexo do sinal isotópico da dieta do animal que a deu origem, variando por volta de 2‰ para o  $\delta^{13}C$  (DeNiro & Epstein, 1978).

Quanto ao nitrogênio-15, o enriquecimento destas dietas, deveu-se a diminuição da inclusão do farelo de soja, leguminosa que realiza simbiose com micorrizas, de valor isotópico próximo ao padrão (Handley & Raven, 1992; Werner & Schmidt, 2002), associada ao aumento do milho, rico isotopicamente em nitrogênio-15, que depende do nitrogênio do solo (Choi *et al.*, 2002) e da farinha de origem animal também rica em nitrogênio-15, causada pelo reflexo da dieta do animal que a deu origem, associada ao enriquecimento à cada elevação no nível trófico do organismo animal (DeNiro & Epstein, 1981).

Nos ovos e suas frações foi observado que o enriquecimento de  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  teve comportamento semelhante ao enriquecimento das dietas, devido à inclusão de farinhas de origem animal (Tabela 3). Embora, cada fração do mesmo tratamento possa apresentar assinatura isotópica distinta, estão de acordo com DeNiro & Epstein (1976; 1978), que afirmam que o animal é aquilo que consome isotopicamente, com variação de  $\pm 2‰$  para carbono-13 e  $\pm 3‰$  para nitrogênio-15. Estes valores médios quando analisados estatisticamente geraram regiões com 95% de confiança (Figuras 1, 2 e 3).

Para que determinado tratamento seja considerado diferente do grupo controle é necessário que sua região de confiança não sobreponha nenhum eixo do gráfico. O fato da elipse sobrepor um dos eixos mostra que a diferença entre médias de  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  dos tratamentos comparados é igual a zero, e assim os tratamentos não diferem.

Sendo assim, observando as Figuras 1, 2 e 3, foi possível notar que o ovo (Figura 1) do tratamento com adição de farinha de vísceras de aves (FVA) não diferiu do controle ( $p > 0,05$ ), pois sua elipse de confiança sobrepôs ao eixo das diferenças de  $\delta^{13}C$ . Essa sobreposição indica que não houve diferença para o  $^{15}N$  entre esse tratamento e o controle. Também foi possível observar que todos os tratamentos foram diferentes de zero nas médias de  $\delta^{13}C$  dos tratamentos experimentais em relação ao controle, ocorrida pela inclusão de diferentes farinhas de origem animal nas dietas, o que enriqueceu em  $\delta^{13}C$  os tratamentos, distanciando-os do valor da dieta controle, para este isótopo.

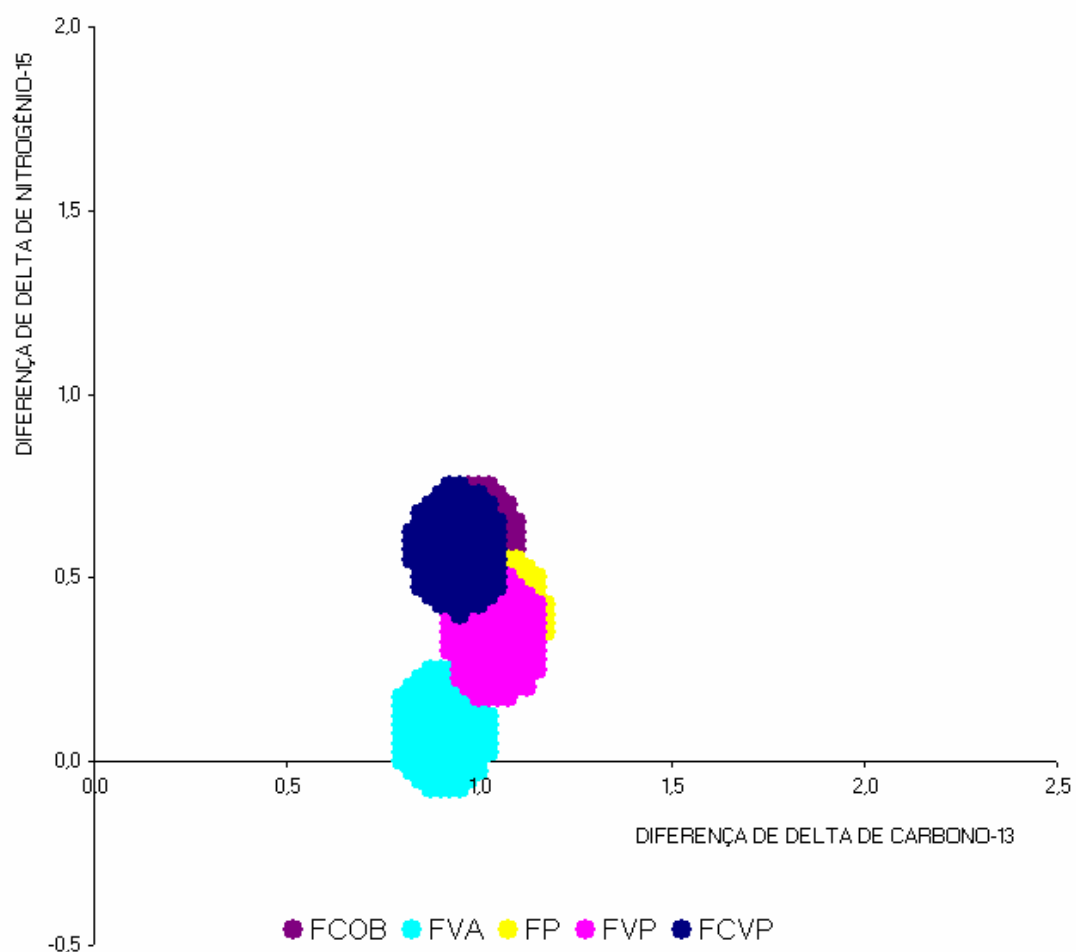
A não diferenciação do ovo do tratamento FVA, pode ter ocorrido por causa do menor enriquecimento desta dieta em  $\delta^{15}\text{N}$ , em relação às outras farinhas de origem animal (Tabela 3), o que provocou, conseqüentemente, menor enriquecimento desses ovos.

Este comportamento do ovo não foi seguido pelas frações (gema e albúmen), onde todos os tratamentos experimentais (Figura 2 e Figura 3) foram diferentes estatisticamente do tratamento controle ( $p < 0,05$ ). As variações encontradas entre as frações não são bem compreendidas, mas Tieszen *et al.* (1983) afirmam que as principais frações bioquímicas diferem isotopicamente entre si e as diferenças isotópicas do organismo podem ser o reflexo de suas diferentes composições bioquímicas.

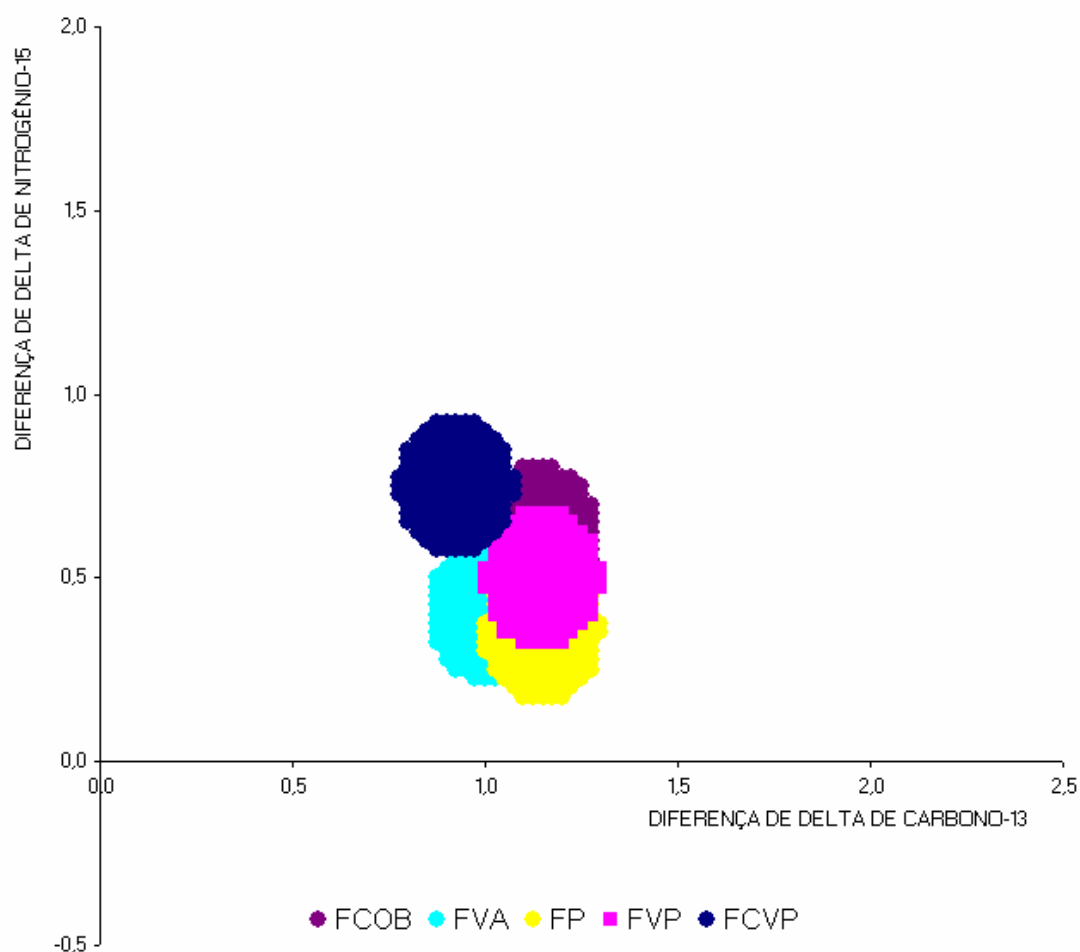
A inclusão de farinhas de origem animal nas dietas experimentais foi de 3,2; 2,6; 2,9 e 3,43% nas dietas FVA, FP, FVP e FCVP, respectivamente. Estes níveis de inclusão variaram em torno de 2,5 e 3,5%, sugerindo a possibilidade de detecção da farinha e carne e ossos bovina, abaixo do detectado no ovo e gema do CAPÍTULO 2.

A detecção da FVA nos ovos pode estar em um nível superior ao utilizado neste experimento, e/ou a FVA pode sofrer variação nos valores isotópicos o que pode levar a detecção no mesmo nível, apenas substituindo por outra com maior enriquecimento isotópico, mas para se comprovar sugere estudos futuros com níveis crescentes e variando a FVA.

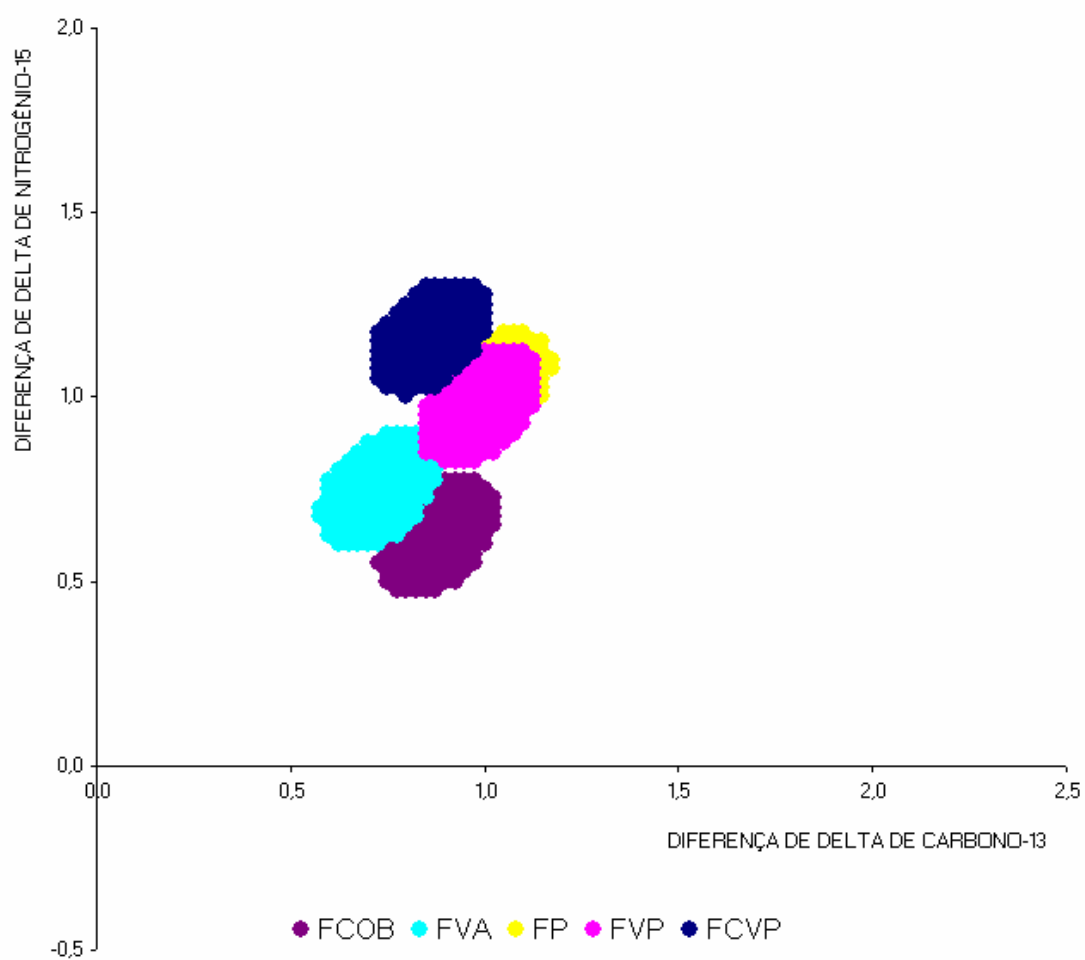
O albúmen foi a fração que melhor detectou as inclusões das farinhas de origem animal, devido ao maior distanciamento das elipses de confiança em relação aos eixos do gráfico, o que tornou possível rastrear esses ingredientes em ovos de poedeiras comerciais. Esses dados estão de acordo com Denadai (dados não publicados – Capítulo 2), que avaliou dietas com inclusão de FCOB na alimentação de poedeiras comerciais e afirma que o albúmen é a melhor fração na identificação da FCOB, e também com Carrijo *et al.* (2006) e Móri (2007), que avaliaram dietas com inclusão de farinhas de origem na alimentação de frangos de corte e codornas, respectivamente, e detectaram todas as farinhas de origem animal no produto final.



**Figura 1** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do ovo de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)



**Figura 2** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  da gema de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)



**Figura 3** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do albúmen de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, pode-se concluir que:

Em decorrência da inclusão das farinhas de origem animal nas dietas experimentais houve enriquecimento nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ . Nos ovos e suas frações foi observado que o enriquecimento de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  teve comportamento semelhante ao enriquecimento das dietas.

O tratamento FVA não foi diferenciado do controle ( $p > 0,05$ ). Houve sobreposição da elipse de confiança ao eixo das diferenças de  $\delta^{13}\text{C}$ , portanto não diferenciação para o  $^{15}\text{N}$  entre esse tratamento e o controle.

Diferentemente do ovo, todos os tratamentos experimentais na gema e no albúmen foram diferentes estatisticamente do tratamento controle.

Os níveis de inclusão variaram em torno de 2,5 e 3,5%, sugerindo a possibilidade de detecção da FCOB, abaixo do detectado no ovo e gema do

CAPÍTULO 2.

O albúmen foi a fração que melhor detectou as inclusões das farinhas de origem animal, devido ao maior distanciamento das elipses de confiança em relação aos eixos do gráfico.

Portanto, o aprimoramento da técnica possibilita a certificação de ovos destinados ao mercado externo. A análise de ovos e suas frações (albúmen e gema) permite, pela técnica dos isótopos estáveis do  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ , a detecção da inclusão de farinhas de origem animal na dieta de poedeiras comerciais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Block Junior C. Monitoramento da qualidade de rações brasileiras para ruminantes por espectrometria de massa. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 251-252.

Bricout J, Koziat J. Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 35, p. 758-760, 1987.

Brookes ST, Barrie A, Davies JE. A rapid  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  test for determination of corn-syrups in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 74, p. 627-629, 1991.

Carrizo AS, Pezzato AC, Ducatti C, Sartori JR, Trinca L, Silva ET. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.37-42, 2006.

Cerutti M. Aplicação de um programa de rastreabilidade na cadeia de frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 253-264.

Choi WJ, Lee SM, Ro HM, Kim KC, Yoo SH. Natural  $^{15}\text{N}$  abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, v.245, p.223-232, 2002.

Denadai JC, Ducatti C, Caldara FR, Oliveira RP, Silva ET. Certificação de Ovos de Poedeiras Comerciais pela Técnica dos Isótopos Estáveis. In: III Congresso de Produção e Consumo de Ovos - APA, 2005, Indaiatuba. **Anais...** - APA, 2005.

DeNiro MJ, Epstein S. You are what you eat (plus a few ‰) the carbon isotope cycle in food chains. **Geological Society of America**, v. 6, p. 834, 1976. (Abstract).

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 42, p. 495-506, 1978.

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, p. 495-506, 1981.

Ducatti, C. **Isótopos estáveis ambientais**. [Apostila] 2004. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004, 184p.

González-Martin I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Marqués-Macias E, Sanz Poveda F. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. **Meat Science**, v. 52, p. 437-441, 1999.

González-Martin I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Sánchez González C. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. **Meat Science**, v.58, p.25-30, 2001.



Gottmann R. **Influência da composição das rações na rastreabilidade de farinhas de origem animal pela técnica dos isótopos estáveis em frangos de corte.** 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Handley LL, Raven JA The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v.15, p. 965-985, 1992.

Hargin KD. Authenticity issues in meat and meat products. **Meat Science**, v.43, p.S277-S289, 1996.

Koziet J, Rossmann A, Martin GJ, Ashurst PR. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 271, p. 31-38, 1993.

Licatti F. **Isótopos estáveis do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) em plantas do ciclo bioquímico  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ .** 1997. 65f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 1997.

Manca G, Camin F, Coloru G, Del Caro A, Detentori D, Franco MA, Versini G. Characterisation of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) ratios and free amino acid ratios. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1404-1409, 2001.

Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep X, Aerny J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 316-322, 1988.

Monin G. Recent methods for predicting quality of whole meat. **Meat Science**, v.49, p.S231-S243, 1998.

Móri C. **Rastreabilidade de farinhas de origem animal em tecidos de codornas de corte pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ).** 2007. 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Oliveira RP. **Rastreabilidade da farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ).** 2005. 109 f. Tese. (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Piasentier E, Valusso R, Camin F, Versini G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, p. 239-247, 2003.

Rosa CR, Moraes M, Neto JAG, Nobrega JA, Nogueira AR. Effect of modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.79, p. 517-523, 2002.

Rossmann A, Haberhauer G, Holzl S, Horn P, Pichlmayer F, Voerkelius S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. **European Food Research & Technology**, v. 211, p. 32-40, 2000.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC, Barreto SLT. Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa (MG), UFV; 2005. 186p.

SAS Institute Inc., SAS/STAT. **User's guide**. Version 6.11. 4. ed., v. 2. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 842 p.

Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p.32-37, 1983.

Werner RA, Schmidt HL. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v.61, p.465-784 2002.

White JW, Winters K, Martin P, Rossmann A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 81, p. 610-619, 1998.

Wobeto AP, Fonseca ASK, Lunge VR, Ikuta N. Detecção de proteína animal em ração pela técnica da reação em cadeia da polimerase. In: Conferência APINCO 2006 de Ciência e Tecnologias Avícolas, 2006, Campinas. **Suplemento da Revista Brasileira de Ciência Avícola** - Prêmio José Maria Lamas da Silva 2006. Campinas : FACTA, 2006. p.162.

**CAPÍTULO 4**  
**RASTREABILIDADE DE INGREDIENTES ALTERNATIVOS PARA POEDEIRAS À**  
**FARINHA DE CARNE E OSSOS BOVINA DETECTADA PELA TÉCNICA DOS**  
**ISÓTOPOS ESTÁVEIS EM OVOS**

## **Rastreabilidade de ingredientes alternativos para poedeiras à farinha de carne e ossos bovina detectada pela técnica dos isótopos estáveis em ovos**

### **Resumo**

Objetivou detectar a farinha de carne e ossos bovina (FCOB) em dietas de poedeiras, mesmo com a inclusão de outros ingredientes de origem vegetal e leveduras, pela técnica dos isótopos do carbono-13 e do nitrogênio-15. Foram utilizadas 384 galinhas poedeiras da linhagem *Shaver White*, distribuídas aleatoriamente em oito tratamentos, com seis repetições. Os tratamentos foram compostos de uma dieta controle a base de milho e farelo de soja e sete dietas experimentais com inclusão de 4,5% FCOB, acrescidas ou não de outros ingredientes vegetais ou leveduras (farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de algodão, glúten de milho, levedura de cana e levedura de cerveja). No 35º dia foram tomados aleatoriamente 24 ovos por tratamento, (12 serviram para amostrar gema e albúmen e os outros 12, ovo). Os resultados isotópicos foram submetidos à análise multivariada de variância e a partir das matrizes de erro, com 95% de confiança foram determinadas elipses para identificar as diferenças entre os tratamentos experimentais e o controle. Para o ovo e suas frações, as médias dos pares isotópicos dos tratamentos experimentais foram diferentes daquelas do tratamento controle ( $p < 0,05$ ). Portanto, a análise de ovos e suas frações permite detectar, pela técnica dos isótopos estáveis do carbono-13 e nitrogênio-15, a FCOB na dieta de poedeiras, mesmo com a inclusão de outros ingredientes vegetais e leveduras.

**Palavras-chave:** aves, carbono-13, certificação, EEB, nitrogênio-15

## **Alternative ingredients to laying hens in the traceability of bovine meat and bones meal through the stable isotopes technique**

### **Abstract**

The aim of this paper was to detect bovine meat and bones meal (BMBM) in diets of commercial laying hens even when ingredients of plant origin and yeast that may alter the isotopic values of egg and its fractions (albumen and yolk) were included in the feed through analysis of carbon-13 and nitrogen-15. Three hundred eighty four Shaver White laying hens were randomly distributed in eight treatments with six replicates each. The treatments were: control – corn and soybean meal based diet and seven other experimental diets with 4.5% BMBM including or not other plant ingredients or yeast (wheat bran, rice, cottonseed meal, corn gluten meal, sugar cane yeast and beer yeast). At the 35<sup>th</sup> day 24 eggs per treatment were randomly collected (12 for yolk and albumen sampling and 12 for egg sampling - yolk + albumen). The isotopic results were analyzed in a multivariate analysis of variance. Through an error matrix (95% confidence) the ellipses were determined to identify the differences among the treatments and the control group. The average values of the isotopic pair from egg and its fractions of the treatments were different from the values from the control treatment. It was possible to affirm that because the confidence regions did not overlay the chart axes ( $p < 0.05$ ). Therefore, the analysis egg and its fractions allowed to detect BMBM the laying hens diets through carbon-13 and nitrogen-15 stable isotopes technique, even with inclusion of yeast and plant origin ingredients.

**Key-words:** avian, BSE, carbon-13, certification, nitrogen-15

## 1. INTRODUÇÃO

Gomes (2006) afirma que, a descoberta do “mal da vaca louca” ou Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) nos Estados Unidos deve aumentar a produção de ovos no Brasil, devido à suspensão da compra de carne bovina norte-americana por 30 países, até a solução da crise neste país. Com isso, pretende-se aumentar o volume de exportação de produtos brasileiros, porque a tendência do mercado mundial é substituir a carne vermelha pelas carnes de frango, suína, peixe e ovos importados de países como o Brasil.

Para que a avicultura brasileira se beneficie deste fato é necessário valorizar os produtos avícolas elaborando processos de controle de doenças, certificação e rastreabilidade, pois o interesse do consumidor em conhecer a origem e a qualidade do produto consumido vem crescendo. Contudo, no Brasil a avicultura ainda não dispõe de sistema de identificação oficial como a pecuária de corte, porém já se utiliza diversas ferramentas de gestão e controle de qualidade em sua cadeia, como o APPCC (Análise de Perigo em Pontos Críticos de Controle) ou o BPF (Boas Práticas de Fabricação), além de atuar no sentido de definir normas para outros pontos da cadeia produtiva (Cerutti, 2002).

Além dessas ferramentas de gestão e controle de qualidade, seria desejável que houvesse na indústria avícola análise de contra prova para auxiliar a comprovar a veracidade das informações constantes no histórico alimentar de lotes de produtos diferenciados (carne e ovos de aves alimentadas estritamente com ingredientes vegetais), que pudesse monitorar o processo de rastreabilidade e fornecer laudos técnicos para as auditorias, como instrumento de confiabilidade (Oliveira, 2005). Por isso, muitos métodos têm sido propostos para identificar a presença de subprodutos de origem animal em rações para animais, tais como, hibridização de DNA, ELISA e PCR (Bloch Junior, 2002).

Esses métodos não detectam o subproduto de origem animal no produto final, ou seja, carne e ovos. Mas, a espectrometria de massas, através da análise da razão isotópica para o elemento químico do carbono-13 tem sido usada com sucesso para testar a autenticidade, a qualidade e a origem geográfica de vários produtos tais como sucos de frutas (Bricout & Koziat, 1987; Koziat *et al.*, 1993), vinhos (Martin *et al.*, 1988), méis (Brookes *et al.*, 1991; White *et al.*, 1998), produtos lácteos (Rossmann *et al.*, 2000; Manca *et al.*, 2001). A razão isotópica do carbono em associação a do nitrogênio permitiu a certificação da origem geográfica e tipos de alimentação de

ovinos (Piasentier *et al.*, 2003), a caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos ibéricos (González-Martin *et al.*, 1999) e a rastreabilidade de produtos de origem animal na dieta de frangos de corte (Oliveira, 2005; Carrijo *et al.*, 2006; Gottmann, 2007) e codornas (Móri, 2007) no produto final.

Denadai *et al.* (2005) em estudo de ovos de dois produtores da região de Bastos/SP, em que um utilizava apenas produtos de origem vegetal e outro, utilizava subproduto de origem animal nas dietas das poedeiras, observaram pelo sistema de duplo eixo isotópico ( $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ ) que estes ovos possuíam padrões isotópicos distintos, sugerindo a possibilidade de rastrear a inclusão de farinha de origem animal na alimentação das poedeiras e detectando-a no ovo.

Denadai (dados não publicados) detectou a inclusão de 1,5% de farinha de carne e ossos bovina no albúmen de ovos de aves alimentadas com esse ingrediente. Neste experimento foram utilizados apenas milho, farelo de soja e níveis crescentes da FCOB, como ingredientes principais das dietas, com a finalidade de obter pouca interferência de um número maior de ingredientes, mas sabe-se que em dieta de poedeiras, podem ser adicionados também outros ingredientes, como por exemplo, farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de algodão, glúten de milho e leveduras. Assim procedendo, surgiu a necessidade de verificar se esses outros ingredientes poderiam interferir nessa detecção.

Portanto, com a finalidade de aprimorar a técnica, o presente trabalho objetivou identificar a farinha de carne e ossos bovina em dietas de poedeiras comerciais, mesmo com a inclusão de outros ingredientes de origem vegetal e leveduras (farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de algodão, glúten de milho, levedura de cana e levedura de cerveja), que possam alterar os valores isotópicos dos ovos e suas frações (gema e albúmen), pela técnica dos isótopos do carbono-13 e do nitrogênio-15.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Na UNESP, campus de Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, as instalações do setor de Avicultura, localizado na Fazenda Experimental Edgárdia, foram utilizadas para a realização do experimento com 384 galinhas poedeiras da linhagem *Shaver White* com 73 semanas de idade.

Estas aves, que nunca haviam recebido anteriormente dietas com inclusão de farinhas de origem animal, passaram a receber durante 35 dias as dietas experimentais com a finalidade de substituir os carbonos e os nitrogênios dos tecidos envolvidos na produção dos ovos pelos da nova dieta. O período experimental foi determinado levando em consideração os dados de Denadai *et al.* (2005), que afirmaram que de 24,5 a 33,6 dias ocorreu a substituição total do carbono nos ovos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo oito tratamentos, com seis repetições, considerando como repetição uma gaiola com densidade de oito aves. Os tratamentos foram compostos de uma dieta controle a base de milho e farelo de soja e sete dietas experimentais com inclusão de 4,5% farinha de carne e ossos bovina (FCOB) acrescidas ou não de outros ingredientes vegetais ou leveduras, ou seja, farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de algodão, glúten de milho, levedura de cana e levedura de cerveja.

A escolha destes ingredientes levou-se em consideração a utilização destes em dietas para poedeiras e a inclusão foi fixada na porcentagem de participação do farelo de trigo, ingrediente mais utilizado em dietas para estas aves.

As aves recebiam as dietas experimentais em comedouros tipo calha independentes e a água era fornecida em bebedouros tipo linear de água corrente, ambos localizados frontalmente. Tanto a água como a ração foram fornecidos à vontade. O programa de iluminação artificial adotado foi de 16 horas de luz/dia.

Os ingredientes utilizados no preparo das dietas experimentais tiveram seus teores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos, estimados por Rostagno *et al.* (2005), apenas a FCOB foi analisada bromatologicamente e apresentou 93,75% de matéria seca (MS), 45,75% de proteína bruta (PB), 8,43% de extrato etéreo (EE), 48,17% de matéria mineral (MM).

As dietas (Tabela 1) foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais das aves estabelecidas por Rostagno *et al.* (2005) e balanceadas de modo que os teores fossem isoenergéticos, isoprotéicos, isocálcicos, isofosfóricos e isoaminoacídicos para metionina + cistina e lisina.



**Tabela 1** – Composição percentual e níveis nutricionais calculados das dietas experimentais

INGREDIENTES (%)	TC*	FCOB*	TRIG*	ARR*	ALG*	GLUT*	CAN*	CERV*
Milho moído	64,91	66,39	65,31	63,48	66,44	65,61	65,49	65,49
Farelo de soja	22,72	18,34	17,44	18,33	16,21	14,36	16,33	16,33
Óleo de soja	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Farinha de carne e ossos	0,00	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
Farelo de trigo	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Quirera de arroz,	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Farelo de algodão,	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00
Glúten de milho,	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00
Levedura de cana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00
Levedura de cerveja	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
Calcário calcítico	9,71	9,00	9,00	9,00	8,99	9,00	9,00	9,00
Fosfato bicálcico	1,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
DL-Metionina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,13	0,16	0,16
L-Lisina	0,00	0,04	0,05	0,04	0,06	0,14	0,02	0,02
Sal comum	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Suplemento vitamínico <sup>1</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento mineral <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Caulim	0,00	1,03	0,00	0,95	0,10	2,66	0,95	0,95
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS</b>								
Energia metabolizável (kcal/kg)	2750	2750	2750	2750	2750	2750	2750	2750
Proteína bruta (%)	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	16,10
Cálcio total (%)	4,05	4,05	4,05	4,05	4,05	4,05	4,05	4,05
Fósforo disponível (%)	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
Fibra bruta (%)	2,61	2,44	2,63	2,39	3,07	2,22	2,32	2,32
Metionina (%)	0,41	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,41	0,41
Animoácidos não sulfurados (%)	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
Lisina (%)	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79

: TC = tratamento controle; FCOB = tratamento com FCOB; TRIG = tratamento com adição do farelo de trigo; ARR = tratamento com adição da quirera de arroz; ALG = tratamento com adição do farelo de algodão; GLUT = tratamento com adição do glúten de milho; CAN = tratamento com adição de levedura de cana e CERV = tratamento com adição de levedura de cerveja.

<sup>1</sup>- Suplemento vitamínico por kg de ração: Vitamina A: 10.000 UI; Vitamina D<sub>3</sub>: 2.000 UI; Vitamina E: 12,5 mg; Vitamina K<sub>3</sub>: 2,5 mg; Vitamina B<sub>1</sub>: 2,4 mg; Vitamina B<sub>2</sub>: 6 mg; Vitamina B<sub>6</sub>: 3,2 mg; Vitamina B<sub>12</sub>: 12 mcg; ácido fólico, 1 mg, Pantotenato de cálcio: 12,5 mg; Niacina: 30 mg; Antioxidante: 15mg; Selênio: 0,3 mg.

<sup>2</sup>- Suplemento mineral por kg de ração: Cobre: 12 mg; Ferro: 50 mg; Iodo: 1 mg; Manganês: 65 mg; Zinco: 50 mg.

No 35º dia foram tomados aleatoriamente 24 ovos por tratamento (quatro por repetição), dos quais 12 ovos (dois por repetição) serviram para colheitas das amostras de gema e albúmen e os outros 12 (dois por repetição) para ovo total. A gema e o albúmen foram separados manualmente e as amostras de ovo total (gema + albúmen) foram homogeneizadas em liquidificador. Devidamente identificadas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas à -20°C para posteriores análises isotópicas no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

Para a execução das análises, as amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi - modelo MA 035) a 56°C por um período de 24 horas para o albúmen e por 48 horas para o ovo e a gema. Após a secagem as amostras foram moídas criogenicamente (moinho criogênico Spex-modelo 6750 freezer/mill), à -190°C. Neste moinho, foram colocados aproximadamente 2,0 g de amostra em um frasco de policarbonato juntamente com a barra magnética, o qual, devidamente fechado, imergiu-se em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética submetida a um campo magnético oscilante (15 impactos/s) pulverizou-se a amostra. O programa utilizado na moagem das amostras compreendeu-se de uma primeira etapa de pré-congelamento de um minuto e uma segunda etapa de congelamento e pulverização de 3 minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que 60 µm (Licatti, 1997; Rosa, *et al.*, 2002; Ducatti, 2004).

As amostras de ovo (gema + albúmen) e gema sofreram extração dos lipídeos. Devidamente identificadas, estas foram acondicionadas em papel filtro, imersas em éter etílico (PA) e mantidas sob temperatura em torno de 55 e 65°C por 4 horas, por meio do aparelho de Soxhlet. Após este período as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas éter reconicionado as lavasse. Posteriormente as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora, para que houvesse evaporação do éter. Pois Tieszen *et al.* (1983), afirmam que frações que possuem quantidade de lipídeos considerável são relativamente pobres em carbono-13, quando comparadas às que possuem pouco lipídeos. Estas amostras foram moídas novamente para homogeneização.

Foram pesados em cápsulas de estanho, aproximadamente 50 a 60 µg e 500 a 600 µg de amostras de ovos e suas frações para a determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio, respectivamente. Para ração, a massa utilizada foi de 60 a 70 µg e 1600 a 1700 µg, respectivamente. As cápsulas foram introduzidas por

meio de amostrador automático no analisador elementar (EA 1108 - CHN - Fisons Instruments, Rodano, Itália), no qual, a amostra foi queimada para a obtenção de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (Delta S - Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

Os valores das razões isotópicas foram expressos em delta ( $\delta$ ) relativos aos padrões internacionais PeeDee Belemnite (PDB) para o <sup>13</sup>C e, nitrogênio do ar atmosférico para <sup>15</sup>N, de acordo com a seguinte equação geral (1):

$$\delta_{(amostra, padrão)} = [(R_{amostra} - R_{padrão}) / R_{padrão}] \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

R representa a razão entre o isótopo menos abundante e o mais abundante, em particular <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C e <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N. Adimensional.

Os resultados isotópicos obtidos foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) com auxílio do procedimento GLM do programa estatístico SAS (1996). A partir dos dados gerados pelas matrizes de erro, foram determinadas regiões com 95% de confiança para verificar as diferenças entre as médias dos tratamentos experimentais (dietas com adição de FCOB) e a média do grupo controle (dieta estritamente vegetal).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) das rações utilizadas neste estudo estão contidos na Tabela 2. Foi possível observar, em decorrência da inclusão de FCOB nas dietas, enriquecimento nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ , mesmo com a inclusão de outros ingredientes. Esse fato ocorreu provavelmente, devido às variações na composição percentual dos ingredientes nas dietas (Tabela 3). Este enriquecimento em carbono-13 e nitrogênio-15 quando se adiciona farinha de origem animal na dieta de aves também foi observado por Oliveira (2005), Carrijo *et al.* (2006), Gottmann (2007) e Móri (2007).

**Tabela 2** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão das dietas (n = 2), ovos e suas frações (n = 12)

TRATAMENTOS		DIETA	OVO	ALBÚMEN	GEMA
TC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,79 ± 0,08	-18,31 ± 0,12	-18,28 ± 0,15	-18,38 ± 0,08
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	1,53 ± 0,03	4,43 ± 0,18	3,47 ± 0,15	4,44 ± 0,12
FC*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-14,89 ± 0,22	-17,32 ± 0,08	-17,40 ± 0,09	-17,24 ± 0,18
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,36 ± 0,11	5,02 ± 0,08	4,09 ± 0,05	5,08 ± 0,09
FC+TRIG*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,90 ± 0,08	-17,49 ± 0,15	-17,30 ± 0,09	-17,48 ± 0,11
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,39 ± 0,09	5,01 ± 0,19	4,67 ± 0,16	5,24 ± 0,11
FC+ARR*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,67 ± 0,14	-17,72 ± 0,08	-17,48 ± 0,07	-17,76 ± 0,13
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,49 ± 0,08	5,07 ± 0,18	4,81 ± 0,17	5,36 ± 0,22
FC+ALG*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,41 ± 0,04	-17,27 ± 0,07	-17,00 ± 0,11	-17,14 ± 0,11
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,45 ± 0,03	5,32 ± 0,25	4,77 ± 0,12	5,93 ± 0,14
FC+GLÚT*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-14,63 ± 0,11	-15,90 ± 0,16	-15,89 ± 0,15	-16,16 ± 0,16
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,82 ± 0,08	5,14 ± 0,13	4,93 ± 0,08	6,11 ± 0,12
FC+LEV.CAN*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,16 ± 0,22	-16,46 ± 0,20	-16,38 ± 0,15	-16,64 ± 0,13
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,57 ± 0,09	5,05 ± 0,22	4,18 ± 0,09	6,02 ± 0,12
FC+LEV.CER*	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	-15,28 ± 0,08	-16,60 ± 0,18	-16,66 ± 0,14	-16,82 ± 0,12
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	2,56 ± 0,02	5,19 ± 0,12	4,31 ± 0,12	6,10 ± 0,21

: TC = tratamento controle; FC = tratamento com FCOB; FC+TRIG = tratamento com adição do farelo de trigo; FC+ARR = tratamento com adição da quirera de arroz; FC+ALG = tratamento com adição do farelo de algodão; FC+GLUT = tratamento com adição do glúten de milho; FC+LEV.CAN = tratamento com adição de levedura de cana e FC+LEV.CERV = tratamento com adição de levedura de cerveja.

Mesmo com a inclusão dos ingredientes C<sub>3</sub>, farelo de trigo, quirera de arroz e farelo de algodão (Tabela 3), nos tratamentos FC+TRIG, FC+ARR e FC+ALG, ocorreu enriquecimento isotópico em carbono-13 e nitrogênio-15, nos ovos e suas frações. A adição do ingrediente C<sub>4</sub>, glúten de milho (FC+GLÚT) e as leveduras (FC+LEV.CAN e

FC+LEV.CER), causaram, aumento no enriquecimento, distanciando ainda mais os valores dos ovos e suas frações dos do grupo controle.

**Tabela 3** – Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com respectivos desvios-padrão (n = 2) dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

INGREDIENTES	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Farinha de carne e ossos	-12,82 ± 0,13	7,43 ± 0,22
Milho moído	-13,19 ± 0,03	3,57 ± 0,23
Farelo de soja – 45	-26,57 ± 0,35	0,43 ± 0,05
Farelo de trigo	-26,65 ± 0,08	2,62 ± 0,05
Farelo de algodão	-27,15 ± 0,11	3,77 ± 0,11
Quirera de arroz	-28,97 ± 0,61	7,14 ± 0,29
Glúten de milho	-15,14 ± 0,42	3,68 ± 0,01
Levedura de cana	-10,49 ± 0,08	3,18 ± 0,01
Levedura de cerveja	-16,76 ± 0,06	3,63 ± 0,00
Óleo de soja	-31,54 ± 0,21	-

O enriquecimento isotópico das plantas  $\text{C}_4$  em comparação às  $\text{C}_3$  (Vogel, 1993), adicionado ao valor isotópico da FCOB, rica em carbono-13, enriqueceram muito provavelmente, às dietas em relação ao carbono-13.

Quanto ao nitrogênio-15 a diminuição da inclusão do farelo de soja, de valor isotópico próximo ao padrão (Handley & Raven, 1992; Werner & Schmidt, 2002), associada ao aumento do milho, rico isotopicamente em nitrogênio-15, (Tabela 3) e da FCOB, também rica em nitrogênio-15, causada pelo reflexo da alimentação do animal que a deu origem e do enriquecimento de elevação no nível trófico (DeNiro & Epstein, 1981), causaram do enriquecimento destas dietas.

O comportamento do enriquecimento isotópico em  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  das amostras (ovo, gema e albúmen) foi semelhante ao enriquecimento das dietas (Tabela 3). Embora, cada fração do mesmo tratamento possa apresentar assinatura isotópica distinta, estão de acordo com DeNiro & Epstein (1976; 1978), que afirmam que o animal é aquilo que consome isotopicamente, com variação de  $\pm 2\text{‰}$  para carbono-13 e  $\pm 3\text{‰}$  para nitrogênio-15.

Estes valores médios quando analisados estatisticamente geraram regiões com 95% de confiança (Figuras 1, 2 e 3). Para que determinado tratamento seja considerado diferente do grupo controle é necessário que sua região de confiança não

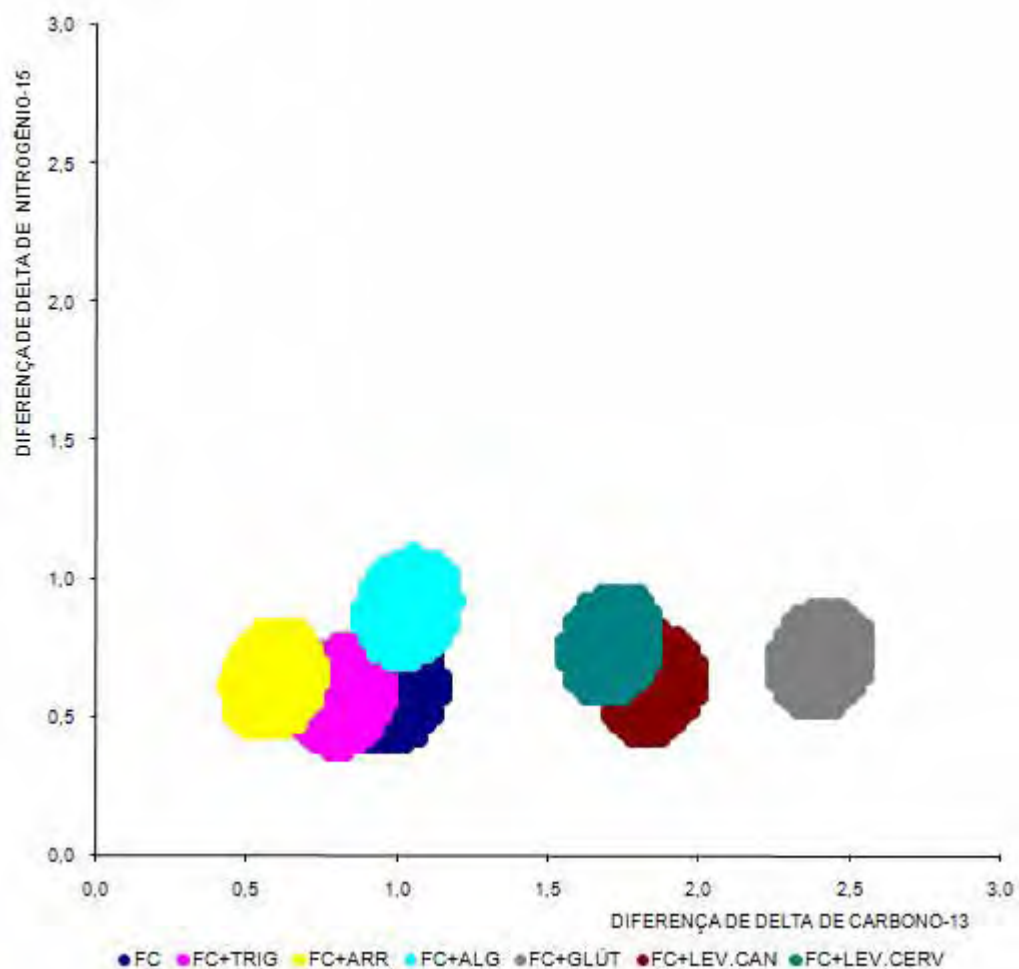
sobreponha nenhum eixo do gráfico. O fato da elipse sobrepor um dos eixos mostra que a diferença entre médias de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  dos tratamentos comparados é igual a zero, e assim os tratamentos não diferem.

Para o ovo e suas frações (Figuras 1, 2 e 3) foi verificado que as médias dos pares isotópicos dos tratamentos experimentais foram diferentes daquelas do tratamento controle (ou estritamente vegetal), pois suas regiões de confiança não sobrepueram a nenhum dos eixos do gráfico ( $p < 0,05$ ).

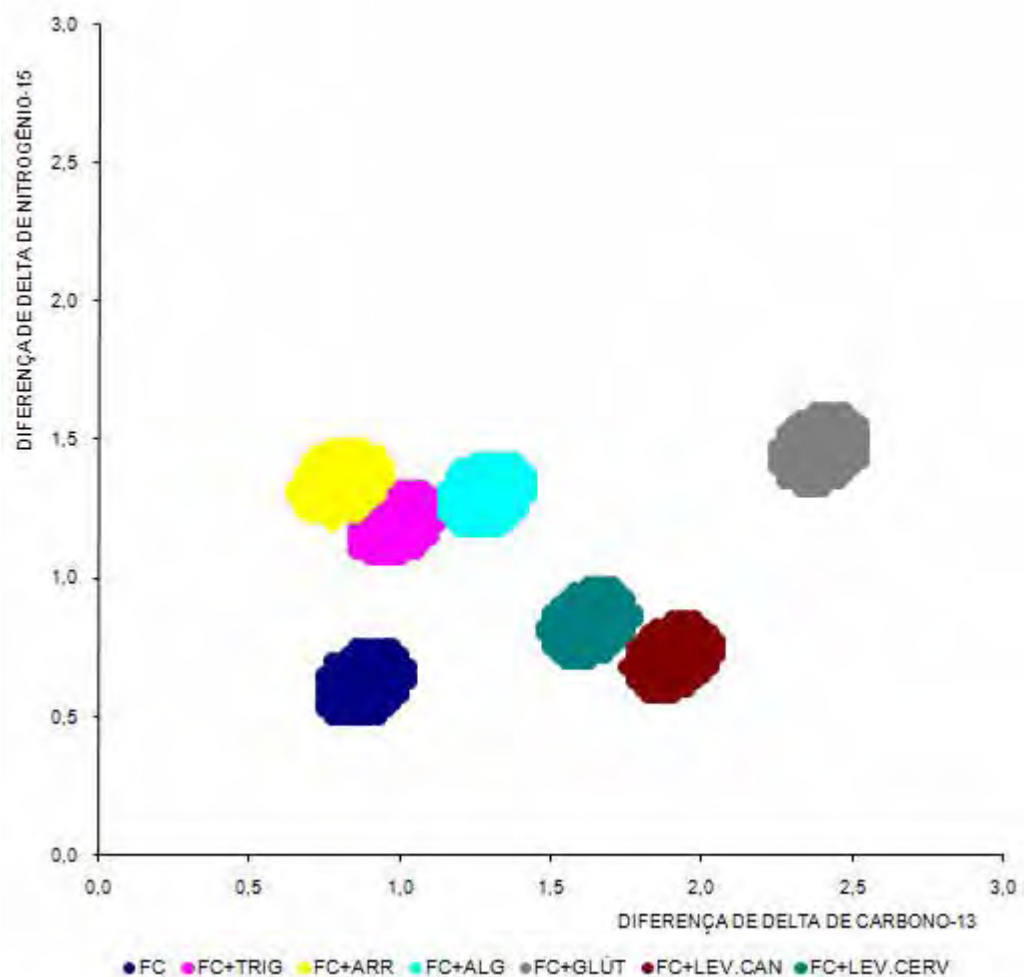
De acordo com a Figura 1, no ovo as diferenças de nitrogênio-15 foram semelhantes, com enriquecimento entre elas apenas para o tratamento FC + ALG e no carbono-13 as dietas com inclusão de ingredientes  $\text{C}_3$ , FC + TRIG; FC + ARR e FC + ALG mostraram enriquecimento isotópico semelhante ao tratamento FCOB, já o tratamento FC + GLUT, com inclusão de  $\text{C}_4$ , foi o que apresentou maior enriquecimento entre os tratamentos experimentais. Os tratamentos FC + LEV.CAN e FC + LEV.CER, com inclusão de levedura de cana e de cerveja, respectivamente, foram intermediários.

Para o Albúmen (Figura 2), o enriquecimento de nitrogênio-15 dos tratamentos FC + TRIG; FC + ARR; FC + GLUT e FC + ALG, foram maiores quando comparadas ao tratamento FCOB, já os tratamentos com inclusão de levedura de cana e de cerveja (FC + LEV.CAN e FC + LEV.CER), seguiram a mesma tendência do ovo, com enriquecimento semelhante ao tratamento FCOB, e no carbono-13 as dietas, FC + TRIG; FC + ARR e FC + ALG tiveram enriquecimento isotópico semelhante ao tratamento FCOB, já o tratamento FC + GLUT, com inclusão de  $\text{C}_4$ , foi o que apresentou maior enriquecimento entre os tratamentos experimentais, e os tratamentos FC + LEV.CAN e FC + LEV.CER, com inclusão das leveduras, são intermediários.

Na Figura 3, o enriquecimento de nitrogênio-15, da gema de todos os tratamentos em comparação ao com inclusão apenas de FCOB, sofreram enriquecimento, e no carbono-13 as dietas, FCOB e FC + ALG, são semelhantes, FC + TRIG e FC + ARR tiveram empobrecimento isotópico e os tratamentos FC + GLUT; FC + LEV.CAN e FC + LEV.CER, apresentaram enriquecimento isotópico, quando comparados ao tratamento FCOB.

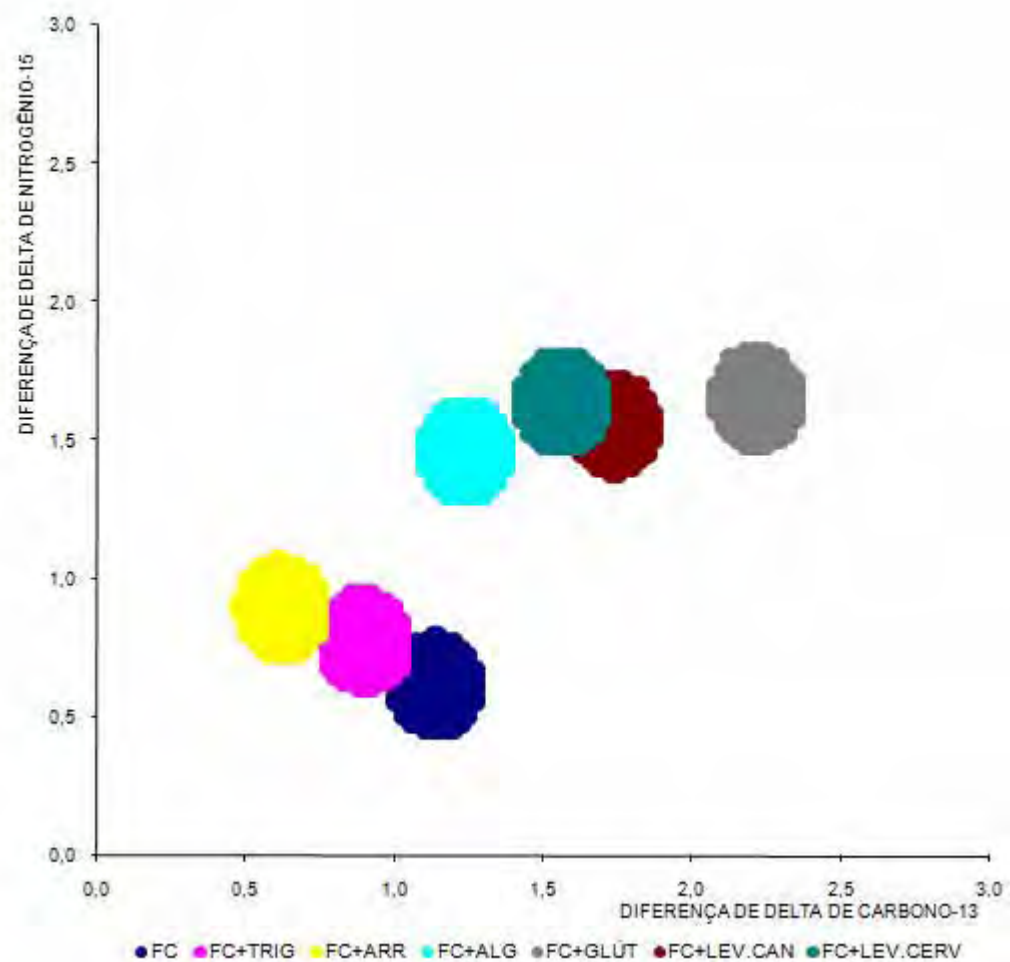


**Figura 1** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do ovo de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)



**Figura 2** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do albúmen de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)





**Figura 3** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  da gema de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 12)

Mesmo com a inclusão de outros ingredientes (farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de algodão, glúten de milho, levedura de cana e levedura de cerveja), além daqueles utilizados na dieta do experimento de Denadai (CAPÍTULO 2), ou seja, dieta contendo apenas milho e farelo de soja, a detecção da FCOB pode ser realizada. Estes dados concordam com Gottmann (2007), que avaliaram dietas com inclusão de farelo de trigo e/ou levedura de cana, além de milho, farelo de soja e farinha de vísceras de aves, para frangos de corte, e estes ingredientes também não interferiram na detecção desta farinha.

Porém outros estudos serão necessários até a definição completa da técnica dos isótopos estáveis na rastreabilidade em ovos, de produtos de origem animal em dietas de poedeiras. A mistura de outros ingredientes, como por exemplo, uma leguminosa (pobre em nitrogênio-15), níveis de inclusão menores da FCOB na presença destes mesmos ingredientes utilizados neste estudo e níveis de farelo de trigo, glúten de milho e leveduras próximos aos utilizados comercialmente.

O albúmen e a gema são as frações que melhor detectam as inclusões da FCOB, em adição a outros ingredientes de origem vegetal e leveduras, devido ao maior distanciamento das elipses de confiança em relação aos eixos do gráfico, tornando possível rastrear a FCOB em ovos de poedeiras comerciais, mesmo quando outros ingredientes vegetais e leveduras forem adicionados às dietas.

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, pode-se concluir:

Em decorrência da inclusão de FCOB nas dietas, houve enriquecimento nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ , mesmo com a inclusão dos ingredientes  $\text{C}_3$  (farelo de trigo, arroz quirera e farelo de algodão). A adição do ingrediente  $\text{C}_4$  (glúten de milho) e as leveduras (de cana e de cerveja) causaram aumento no enriquecimento.

O comportamento do enriquecimento isotópico em  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  das amostras foi semelhante ao enriquecimento das dietas. Todos os tratamentos experimentais, nas diferentes frações, foram diferentes do controle ( $p < 0,05$ ). Portanto, mesmo com a inclusão de outros ingredientes vegetais e leveduras, a técnica dos isótopos estáveis do carbono-13 e nitrogênio-15 permite detectar nos ovos a FCOB, utilizada na alimentação de poedeiras.

Porém outros estudos serão necessários até a definição completa da técnica dos isótopos estáveis na rastreabilidade em ovos, de produtos de origem animal em dietas de poedeiras. A mistura de novos ingredientes, níveis de inclusão menores da FCOB na presença destes mesmos ingredientes utilizados neste estudo e níveis de farelo de trigo, glúten de milho e leveduras próximos aos utilizados comercialmente.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Block Junior C. Monitoramento da qualidade de rações brasileiras para ruminantes por espectrometria de massa. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 251-252.

Bricout J, Koziat J. Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 35, p. 758-760, 1987.

Brookes ST, Barrie A, Davies JE. A rapid  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  test for determination of corn-syrups in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 74, p. 627-629, 1991.

Carrizo AS, Pezzato AC, Ducatti C, Sartori JR, Trinca L, Silva ET. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.37-42, 2006.

Cerutti M. Aplicação de um programa de rastreabilidade na cadeia de frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 253-264.

Denadai JC, Ducatti C, Caldara FR, Oliveira RP, Silva ET. Certificação de Ovos de Poedeiras Comerciais pela Técnica dos Isótopos Estáveis. In: III Congresso de Produção e Consumo de Ovos - APA, 2005, Indaiatuba. **Anais...** - APA, 2005.

DeNiro MJ, Epstein S. You are what you eat (plus a few ‰) the carbon isotope cycle in food chains. **Geological Society of America**, v. 6, p. 834, 1976. (Abstract).

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 42, p. 495-506, 1978.

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, p. 495-506, 1981.

Ducatti C. **Isótopos estáveis ambientais**. [Apostila] 2004. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004, 184p.

Gomes JPC. Biossegurança X Rastreabilidade. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006. p.100-104.

González-Martin I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Marqués-Macias E, Sanz Poveda F. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. **Meat Science**, v. 52, p. 437-441, 1999.

Gottmann R. **Influência da composição das rações na rastreabilidade de farinhas de origem animal pela técnica dos isótopos estáveis em frangos de corte**. 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Handley LL, Raven JA. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v.15, p. 965-985, 1992.

Koziet J, Rossmann A, Martin GJ, Ashurst PR. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 271, p. 31-38, 1993.

Licatti F. **Isótopos estáveis do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) em plantas do ciclo bioquímico  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$** . 1997. 65f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 1997.

Manca G, Camin F, Coloru G, Del Caro A, Detentori D, Franco MA, Versini G. Characterisation of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) ratios and free amino acid ratios. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1404-1409, 2001.

Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep X, Aerny J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 316-322, 1988.

Móri C. **Rastreabilidade de farinhas de origem animal em tecidos de codornas de corte pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ )**. 2007. 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Oliveira RP. **Rastreabilidade da farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ )**. 2005. 109 f. Tese. (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Piasentier E, Valusso R, Camin F, Versini G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, p. 239-247, 2003.

Rosa CR, Moraes M, Neto JAG, Nobrega JA, Nogueira AR. Effect of modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.79, p. 517-523, 2002.

Rossmann A, Haberhauer G, Holzl S, Horn P, Pichlmayer F, Voerkelius S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. **European Food Research & Technology**, v. 211, p. 32-40, 2000.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC, Barreto SLT. Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa (MG), UFV; 2005. 186p.

SAS Institute Inc., SAS/STAT. **User's guide**. Version 6.11. 4. ed., v. 2. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 842 p.

Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p.32-37, 1983.

Vogel JC. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD., editors. **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. Academic Press, 1993. p. 29-46.

Werner RA, Schmidt HL. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v.61, p.465-784 2002.

White JW, Winters K, Martin P, Rossmann A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 81, p. 610-619, 1998.

**CAPÍTULO 5**  
**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## Considerações Finais

Até o momento, a maioria das pesquisas que utilizam a técnica dos isótopos estáveis em animais, concentra-se em estudos ecológicos. Entretanto, a ferramenta apresenta grande potencial de aplicação em estudos com animais de produção e o Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em parceria com os Departamentos de Melhoramento e Nutrição Animal e de Produção Animal, UNESP/campus de Botucatu, têm utilizada com sucesso nas mais diversas áreas da produção animal, como por exemplo, apicultura, avicultura, bovinocultura, ovinocultura, piscicultura, e suinocultura.

Com o intuito de atender as restrições impostas pelos mercados consumidores surgiu a linha de pesquisa que visa rastrear as farinhas de origem animal na alimentação de frangos de corte e codornas, utilizando a razão isotópica do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), em associação com a razão isotópica do elemento químico nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ), mas faltava testar a técnica em ovos de poedeiras comerciais, que também pode vir a sofrer restrições para a exportação, porque o Japão já sinalizou que pretende importar apenas ovos provenientes de poedeiras alimentadas com ingredientes estritamente vegetais.

A técnica dos isótopos estáveis mostrou ser eficiente no processo de certificação do padrão alimentar vegetal das poedeiras, quando introduzido outros ingredientes além, do milho e do farelo de soja, que normalmente são utilizados.

Desse modo, visando propor agilidade no preparo de amostras, sugere-se a utilização do albúmen como fração padrão no processo de certificação pela técnica dos isótopos estáveis. Por ser fração que possui baixos níveis de lipídeos não precisa ser desengordurado, o que diminui uma etapa metodológica no processo. Além disso, foi no albúmen que níveis menores de inclusão de farinhas de origem animal foram detectados quando comparado ao ovo e a gema.

A determinação do fracionamento isotópico tem por objetivo a reconstrução da dieta, ou seja, descobrir qual a assinatura isotópica da alimentação que o animal foi submetido e, dessa forma, tentar prever os prováveis componentes dessa dieta. Tendo em vista os resultados de fracionamento isotópico encontrados (baixa variação entre os tecidos), sugere-se que dentro do mesmo lote sejam coletadas amostras de ração e de ovo, para que haja maior certeza do histórico alimentar das aves.



**CAPÍTULO 6**  
**APÉNDICE**

## Apêndice

### 1. SISTEMA DE EQUAÇÕES

No Capítulo 2 foi utilizado o sistema de equações que é o método quantitativo em função do balanço de massa isotópico, que permite mensurar os índices participativos das fontes no produto (Ducatti, 2004).

#### Duas fonte e dois isótopos:

Admita a existência de duas fontes participativas  $F_1$  e  $F_2$  na formação do produto (P).

O sistema de equações utilizadas será:

$$\begin{array}{rclcl} \text{Produto} & = & \text{Fonte 1} & + & \text{Fonte 2} \\ \delta^{13}\text{C} & = & a\delta F_1 & + & b\delta F_2 \end{array} \quad (1)$$

$$\delta^{15}\text{N} = a\delta' F_1 + b\delta' F_2 \quad (2)$$

Para as quais:

$\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  = valor do enriquecimento isotópico relativo do produto (ovo, albúmen ou gema), para carbono-13 e nitrogênio-15, respectivamente.

$\delta F_1$  e  $\delta F_2$  = valor do enriquecimento isotópico relativo do carbono da fonte 1 (vegetal) e fonte 2 (animal), respectivamente.

$\delta' F_1$  e  $\delta' F_2$  = valor do enriquecimento isotópico relativo do nitrogênio da fonte 1 (vegetal) e fonte 2 (animal), respectivamente.

Isolando o valor (b) da equação (1) e da equação (2) e igualando entre si, obtém-se o valor de (a), ou seja, o índice participativo da fonte vegetal.

$$\frac{\delta^{13}\text{C} - a\delta F_1}{\delta F_2} = \frac{\delta^{15}\text{N} - a\delta' F_1}{\delta' F_2}$$

$$a = \frac{\delta^{13}\text{C}\delta' F_2 - \delta^{15}\text{N}\delta F_2}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} \quad (3)$$

Substituindo o valor de (a) na equação (1) ou equação (2) obtém-se o valor de (b), ou seja, o índice participativo da fonte animal.

$$b = \frac{\delta^{15}N\delta F_1 - \delta^{13}C\delta' F_1}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} \quad (4)$$

Somando a equação (3) com a equação (4) e igualando a um, obtém-se:

$$\frac{\delta^{13}C\delta' F_2 - \delta^{15}N\delta F_2}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} + \frac{\delta^{15}N\delta F_1 - \delta^{13}C\delta' F_1}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} = 1$$

$$(\delta^{13}C\delta' F_2 - \delta^{15}N\delta F_2) + (\delta^{15}N\delta F_1 - \delta^{13}C\delta' F_1) = (\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2)$$

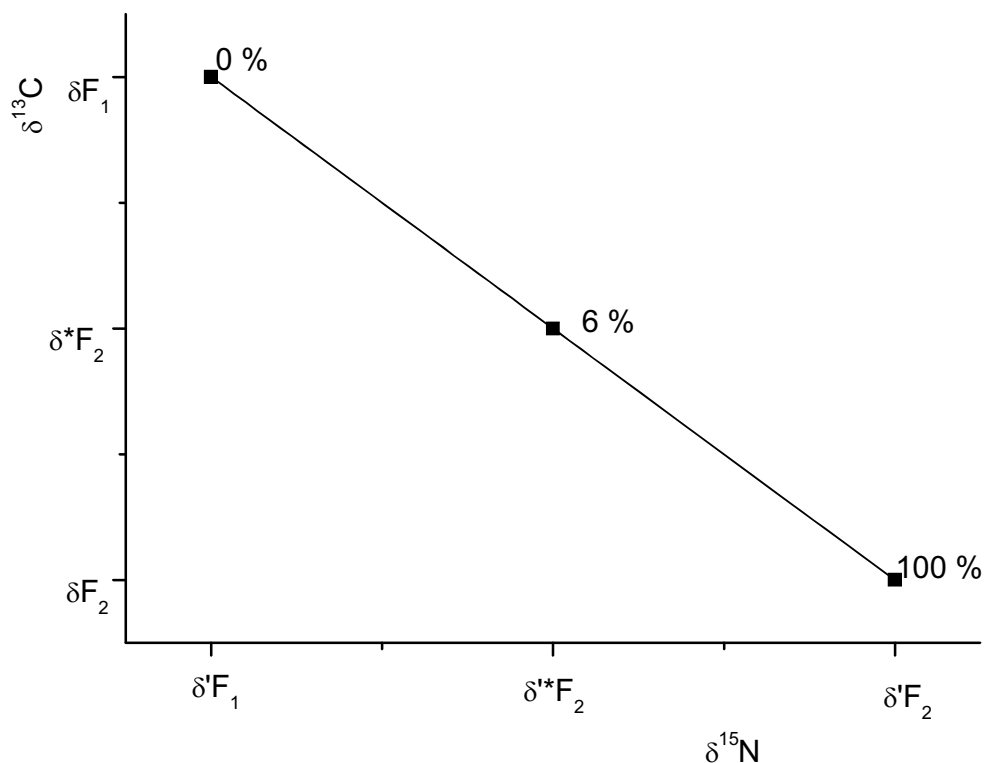
ou:

$$a(\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2) + b(\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2) = (\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2)$$

Obtendo  $a + b = 1$  uma vez que existem somente duas fontes participativas e um produto.

No sentido de evitar o fator de fracionamento entre a dieta (fonte) e o tecido estudado (produto) e relações de concentrações de carbono/nitrogênio diferentes, tem-se adotado a utilização do mesmo tecido na aplicação do sistema de equações (fonte: ovo; produto: ovo).

Além disso, usando artifício matemático pode-se trabalhar com os valores utilizados no intervalo do experimento, sem precisar da extrapolação para o 100% de farinha de origem animal.



**Figura 1** – Modelo do sistema de equações

$b = 100\%$  FCOB

$b' = 6\%$  FCOB

$b' = 0,06 b$

$b' = \delta^*F_2$  para carbono-13 e  $\delta^*F_2$  para nitrogênio-15.

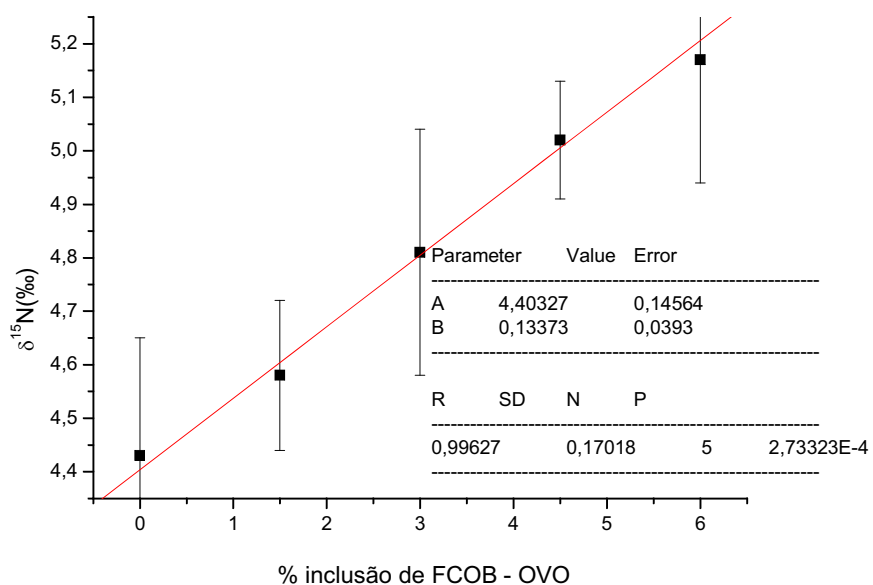
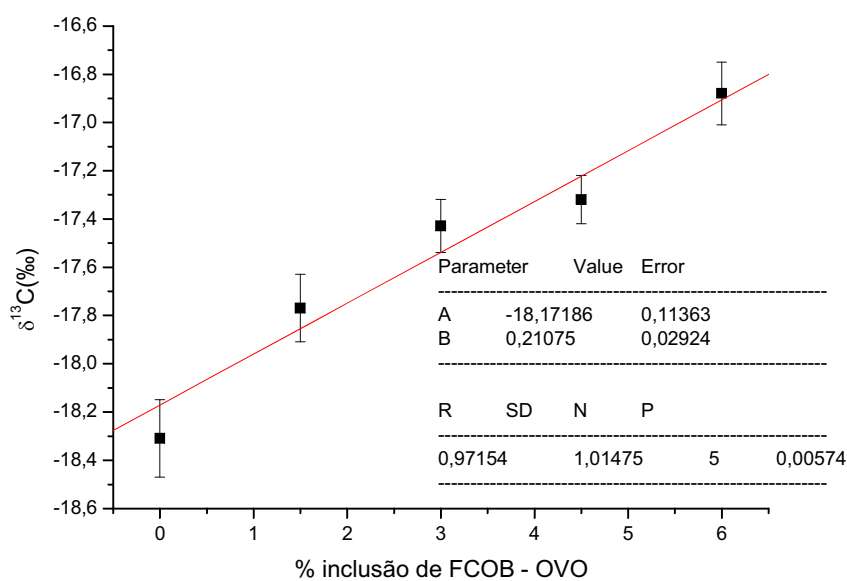
Substituindo em 4:

$$b = \frac{\delta^{15}N \delta F_1 - \delta^{13}C \delta' F_1}{\delta F_1 \delta^* F_2 - \delta' F_1 \delta^* F_2} \quad (5)$$

e:

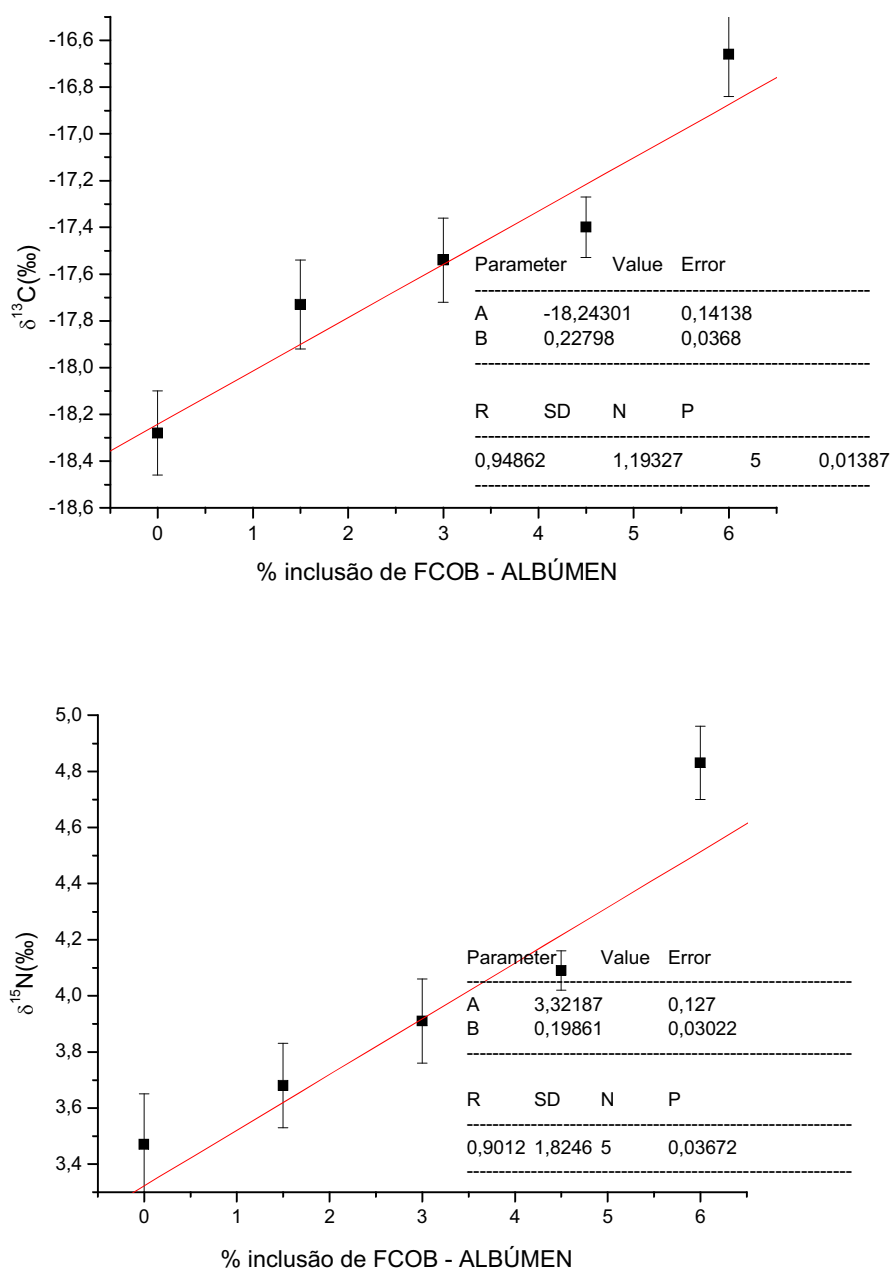
$b' = 0,06b$

Para fonte 2, foram utilizados os valores isotópicos de ovo, albúmen e gema advindos da inclusão 6% (inclusão máxima utilizada), calculados com base na equação da reta de cada uma das frações, e os valores de  $b$  foram corrigidos multiplicando-se os valores obtidos por 0,06 ( $b'$ ). Os resultados estão expressos na Tabela 1.



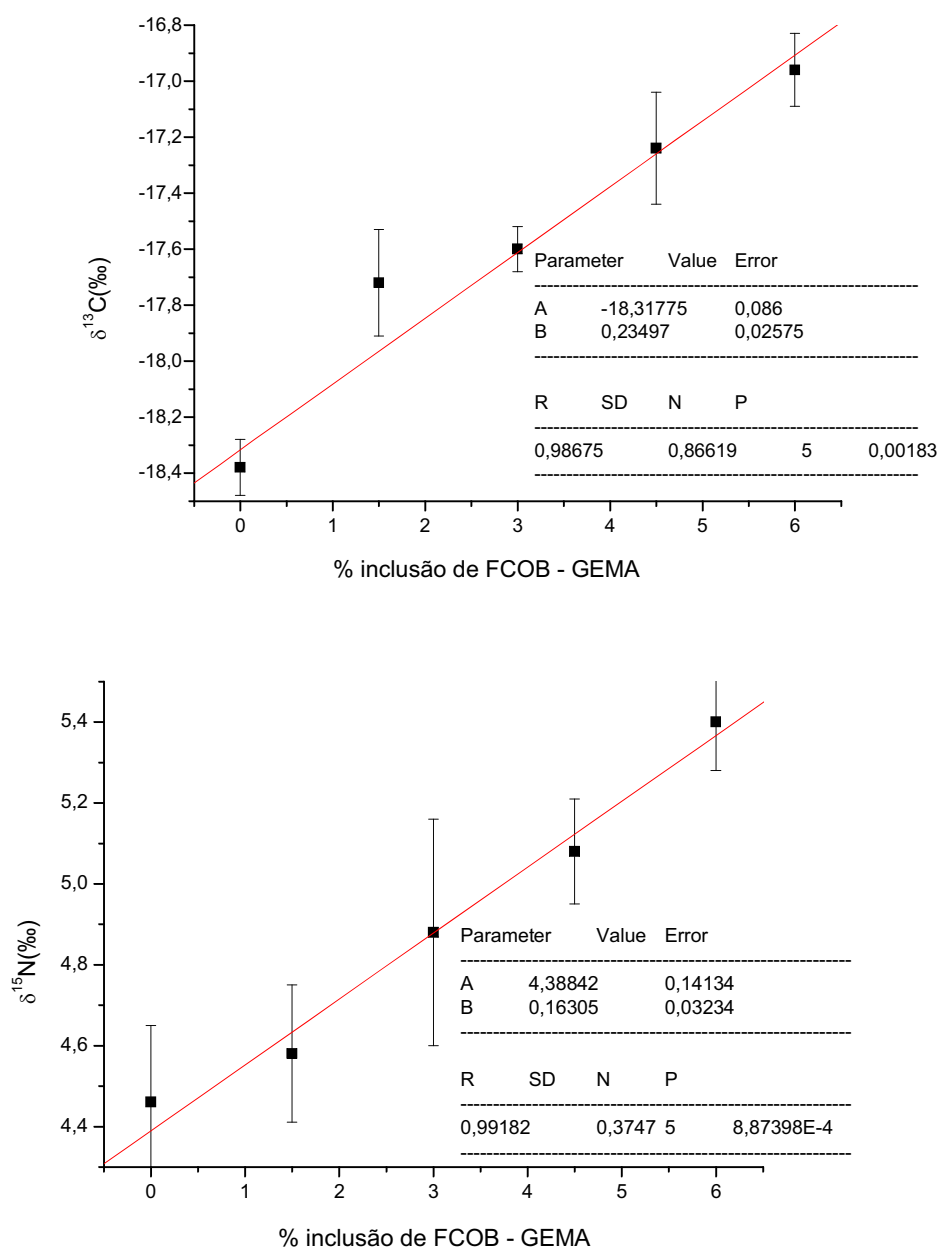
**Figura 2** – Regressão linear do carbono-13 e nitrogênio-15 para o ovo.

Pela Figura 2, valores da reta do ovo para 0% de inclusão FCOB é de  $\delta F_1 = -18,17\text{‰}$  e  $\delta'F_1 = 4,40\text{‰}$  e os valores calculados do ovo com inclusão de 6% de FCOB na alimentação das poedeiras é de  $\delta^*F_2 = -16,91\text{‰}$  e  $\delta^*F_2 = 5,21\text{‰}$ .



**Figura 3** – Regressão linear do carbono-13 e nitrogênio-15 para o albúmen.

Portanto, pela Figura 3, os valores da reta do albúmen para 0% de inclusão FCOB é de  $\delta F_1 = -18,24\text{‰}$  e  $\delta'F_1 = 3,32\text{‰}$  e os valores calculados do ovo com inclusão de 6% de FCOB na alimentação das poedeiras é de  $\delta^*F_2 = -16,88\text{‰}$  e  $\delta'F_2 = 4,51\text{‰}$ .



**Figura 4** – Regressão linear do carbono-13 e nitrogênio-15 para a gema.

Portanto, valores da reta da gema para 0% de inclusão FCOB é de  $\delta F_1 = -18,32\text{‰}$  e  $\delta^*F_1 = 4,39\text{‰}$  e os valores calculados da gema com inclusão de 6% de FCOB na alimentação das poedeiras é de  $\delta^*F_2 = -16,91\text{‰}$  e  $\delta^*F_2 = 5,37\text{‰}$  (Figura 4).

**Tabela 1.** Nível de inclusão de farinha de carne e osso bovina calculado pelo sistema de equações nas diferentes frações dos ovos

Nível de inclusão de FCOB na dieta (%)	Nível de inclusão (sistema de equações)		
	Ovo (%)	Albúmen (%)	Gema (%)
0	0	0,6	0,3
1,5	1,5	1,9	1,7
3,0	3,2	3,0	3,5
4,5	4,4	3,8	4,9
6,0	5,8	7,5	6,9

Podemos observar que os resultados obtidos na tabela acima sinalizam que o erro cometido na comparação entre os valores experimentais (utilizados na dieta) e os calculados (sistema de equações) são inferiores a 1,5%.

A concordância dos valores experimentais e os calculados pelo sistema de equações, advém do fato de utilizar o par isotópico ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) dos tecidos para as fontes (1 e 2) e o produto. Esta conduta (tecido versus tecido) elimina o fator de fracionamento e as diferenças de relações de carbono/nitrogênio entre a dieta e o tecido.

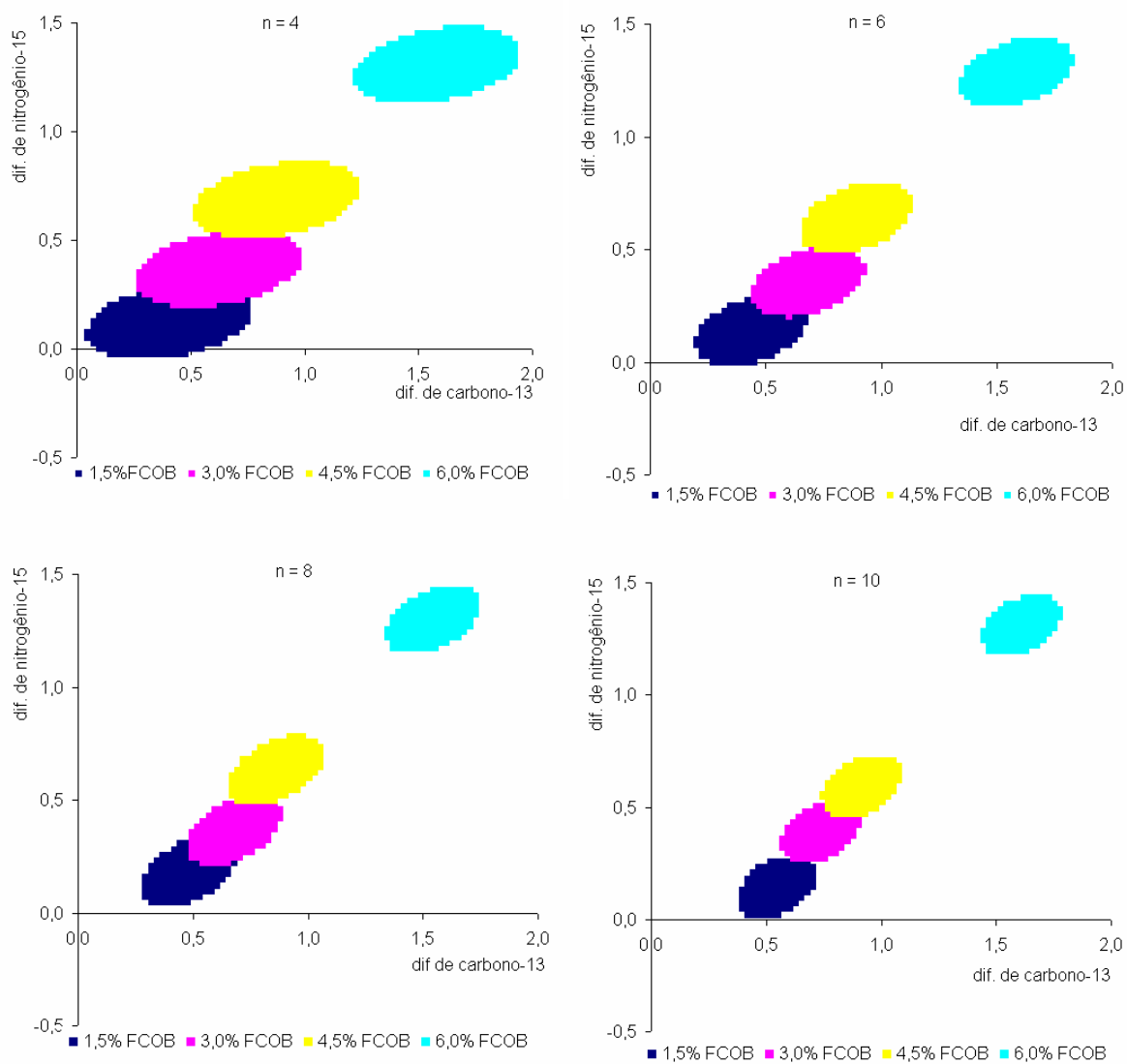


## 2. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS

Os estudos de rastreabilidade pela técnica dos isótopos estáveis, anteriormente realizados por Carrijo (2003), Oliveira (2005), Gottmann (2007) e Móri (2007), utilizavam número quatro de amostras. Nos estudos desta tese a amostragem foi de 12, e o nível de detecção foi inferior aos encontrados por eles, por isso, resolveu testar o número de amostras no nível de detecção da farinha de origem animal. Foi eleito o albúmen, devido à detecção do nível de 1,5% de FCOB nesta fração. Os resultados isotópicos do albúmen ( $n = 4$ ,  $n = 6$ ,  $n = 8$  e  $n = 10$ ), obtidos foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) com auxílio do procedimento GLM do programa estatístico SAS (1996).

A partir dos dados gerados pelas matrizes de erro, foram determinadas regiões com 95% de confiança para verificar as diferenças entre as médias dos tratamentos experimentais (dieta com adição de farinha de carne e ossos bovina) e a média do grupo controle (dieta estritamente vegetal), e os resultados encontram-se ilustrados na Figura 4.

Pode-se observar que, a partir do número de amostra igual a oito, houve diferenciação do tratamento 2 (inclusão de 1,5% de FCOB) em relação ao tratamento controle, mas deve ser levado em consideração também o desvio padrão da amostragem. Sabe-se que quanto maior o desvio-padrão maior será a matriz de erro gerada e conseqüentemente a região de confiança formada, e neste estudo o desvio-padrão dos tratamentos não passou de 0,2‰.



**Figura 5** - Regiões de confiança formadas pela diferença entre os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do albúmen de cada tratamento, quando comparados ao tratamento controle (n = 4, n = 6, n = 8 e n = 10).

### 3. FRACIONAMENTO ISOTÓPICO

O fracionamento isotópico nas áreas biológicas tem sido expresso pela diferença entre o  $\delta$  do tecido e o  $\delta$  da dieta, o qual pode ser sintetizado pela equação (6):

$$\Delta = \delta_{\text{tecido}} - \delta_{\text{dieta}} \quad (6)$$

O valor positivo no grande delta ( $\Delta$ ) indica que o tecido é mais rico em carbono-13 ou nitrogênio-15 que a dieta (Hobson & Clark, 1992).

**Tabela 2** – Fator de fracionamento isotópico entre fração e dieta, de ovos e suas frações de poedeiras submetidas às dietas experimentais (CAPÍTULO 2)

TRATAMENTOS	DIETA - FRAÇÃO					
	OVO		ALBÚMEN		GEMA	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
TC	-2,52	2,90	-2,49	1,94	-2,59	2,91
1,5%FC	-2,10	2,83	-2,06	1,93	-2,05	2,83
3,0%FC	-2,08	2,71	-2,19	1,81	-2,25	2,78
4,5%FC	-2,43	2,66	-2,51	1,73	-2,35	2,72
6,0%FC	-2,06	2,49	-1,82	2,15	-2,12	2,72

**Tabela 3** – Fator de fracionamento isotópico entre fração e dieta, de ovos e suas frações de poedeiras submetidas às dietas experimentais (CAPÍTULO 3)

TRATAMENTOS	DIETA - FRAÇÃO					
	OVO		ALBÚMEN		GEMA	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
TC	-2,52	2,90	-2,49	1,94	-2,59	2,91
FCOB	-2,43	2,66	-2,51	1,73	-2,35	2,72
FVA	-1,89	2,55	-2,04	2,24	-1,85	2,91
FP	-2,22	2,73	-2,23	2,39	-2,20	2,72
FVP	-2,30	2,68	-2,33	2,35	-2,26	2,87
FCVP	-2,03	2,89	-2,09	2,51	-2,12	3,09

**Tabela 4** – Fator de fracionamento isotópico entre fração e dieta, de ovos e suas frações de poedeiras submetidas às dietas experimentais (CAPÍTULO 4)

TRATAMENTOS	DIETA - FRAÇÃO					
	OVO		ALBÚMEN		GEMA	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
TC	-2,52	2,90	-2,49	1,94	-2,59	2,91
FCOB	-2,43	2,66	-2,51	1,73	-2,35	2,72
FC+TR	-1,59	2,62	-1,40	2,28	-1,58	2,85
FC+ARR	-2,05	2,58	-1,81	2,32	-2,09	2,87
FC+ALG	-1,86	2,87	-1,59	2,32	-1,73	3,48
FC+GL	-1,27	2,32	-1,26	2,11	-1,53	3,29
FC+LCANA	-1,30	2,48	-1,22	1,61	-1,48	3,45
FC+LCERV	-1,32	2,63	-1,38	1,75	-1,54	3,54

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carrijo AS. **Técnica dos isótopos estáveis do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) em frangos de corte.** 2003. 101 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Ducatti C. **Isótopos estáveis ambientais.** [Apostila] 2004. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004, 184p.

Gottmann R. **Influência da composição das rações na rastreabilidade de farinhas de origem animal pela técnica dos isótopos estáveis em frangos de corte.** 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Hobson KA, Clark RG. Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, v.94, p.189-197, 1992.

Móri C. **Rastreabilidade de farinhas de origem em tecidos de codornas de corte pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ).** 2007. 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Oliveira RP. **Rastreabilidade da farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ).** 2005. 109 f. Tese. (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SAS Institute Inc., SAS/STAT. **User's guide.** Version 6.11. 4. ed., v. 2. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 842 p.