

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

**Técnica dos Isótopos Estáveis para Determinar o *Turnover* de Carbono nas  
Fezes, no Sangue e Plasma de Bovinos Jovens Confinados**

**FELIPE AZEVEDO RIBEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Zootecnia, como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Mestre.

BOTUCATU - SP  
Novembro – 2013

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

**Técnica dos Isótopos Estáveis para Determinar o *Turnover* de Carbono nas  
Fezes, no Sangue e Plasma de Bovinos Jovens Confinados**

**FELIPE AZEVEDO RIBEIRO**  
Engenheiro Agrônomo

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni**  
**COORIENTADORA: Prof. Dra. Cyntia Ludovico Martins**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Zootecnia, como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Mestre.

BOTUCATU - SP  
Novembro – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Ribeiro, Felipe Azevedo.

Técnica dos isótopos estáveis para determinar o turnover de carbono nas fezes, no sangue e plasma de bovinos jovens confinados / Felipe Azevedo Ribeiro. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Mário de Beni Arrigoni

Coorientador: Cyntia Ludovico Martins

Capes: 50403001

1. Bovino. 2. Isótopos estáveis. 3. Segurança alimentar. 4. Confinamento (Animais). 5. Carbono 13.

Palavras-chave: Assimilação isotópica; Meia-vida; Plantas c3 e c4; Rastreabilidade; Segurança alimentar.

**Aos meus pais, meu avô “in memorian”, minha namorada e aos verdadeiros amigos que juntos me possibilitaram desenvolver este trabalho.**

**DEDICO.**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Aparecido Antonio Ribeiro e Grace Mary Lesnieski de Azevedo Ribeiro, pelo amor, apoio incondicional, por mostrarem o caminho certo e acreditarem em mim.

A minha namorada Thaís Galhardo Egreja pelo companheirismo, amizade, amor e apoio.

Ao meu avô Andralino Ribeiro *“in memoriam”*.

Ao meu avós pelo amor, carinho e cuidados na ausência de meus pais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni pela orientação, confiança, pela imensa paciência e oportunidade de realização do mestrado.

A Prof(a). Dr(a). Cyntia Ludovico Martins pela amizade, orientação, apoio, paciência e por acreditar e permitir meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti pelos ensinamentos e oportunidade oferecida.

A Prof(a). Dr(a). Juliana Denadai pelos ensinamentos, apoio e paciência.

A Prof(a). Dr(a). Márcia Sartori pela orientação nas análises estatísticas, apoio e paciência.

Ao Evandro, e aos demais funcionários do Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu pela ajuda fundamental na elaboração e conclusão do projeto.

Ao Prof. Dr. Jozivaldo Prudêncio Gomes de Moraes pela amizade, pelas oportunidades oferecidas, conselhos e ensinamentos.

Aos funcionários e técnicos da UNESP (FMVZ) pela ajuda na elaboração do trabalho. Em especial ao Cidão, Dinho, João Fogaça, Moro, Ivo, Dito, Boca e ao Zootecnista João Ratti Júnior.

Aos meus amigos que de forma carinhosa me refiro com apelido: Penteio, Bela, Nhonho, Braquiaria, Kubão, Barbie, Perdigão, Potranca, Xuasneguer, Shirley, Vapu, Paraguaio, Sr. Porra, Fezes, Benegrip, Tiago, Dinho, Cidão, Six, Engasgoso, Transa, Portuga, T.J, Rumensin, Paulinho Colombiano, Anú, Fêmea, Laura, Ricardo, Solange, Enxadão, Nanico, Faceira, Guilhermão, Wando, Toquinho, Kama sutra, Charles Japoneis e Juninho goiano. Sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida no período.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma maneira contribuíram para a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

**Meu muito obrigado.**

**Pensamentos...**

**...O ensino é coletivo, mas o aprendizado é individual...**

**(Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni)**

## SUMARIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Rastreabilidade.....	3
2.2 Isótopos Estáveis.....	5
2.3 Isótopos de Carbono.....	7
2.4 <i>Turnover</i> de Carbono.....	8
REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 2.....	16
<i>TURNOVER</i> DO CARBONO-13 NAS FEZES, NO SANGUE E PLASMA DE BOVINOS JOVENS CONFINADOS.....	16
Resumo.....	17
Abstract.....	18
1. Introdução.....	18
2. Material e Métodos.....	20
2.1 Período Pré-experimental .....	20
2.1.1 Instalações e animais .....	20
2.1.2 Manejo reprodutivo. ....	20
2.1.3 Caracterização do Sistema Superprecoce .....	20
2.1.4 Creep Feeding.....	21
2.1.5 Escolha dos tecidos avaliados .....	21
2.1.6 Monitoramento Pré-experimental.....	22
2.2 Período Experimental.....	22
2.2.1 Instalações e animais .....	22
2.2.2 Manejo, arraçãoamento e cuidado com os animais.....	23
2.2.3 Coletas e preparo dos tecidos.....	24
2.2.4 Análise Isotópica.....	25
3. Resultados e Discussão.....	27
4. Conclusões.....	34
REFERÊNCIAS.....	35



CAPÍTULO 3.....	39
IMPLICAÇÕES.....	40

## LISTA DE TABELAS

Página

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Os isótopos estáveis dos elementos H, C, N, O e S e suas moléculas gasosas comumente utilizadas na espectrometria de massas.....06

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dos alimentos fornecidos aos animais no período pré-experimental.....22

Tabela 2. Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  do sangue, plasma e fezes dos bezerros e das matrizes no período pré-experimental.....23

Tabela 3. Porcentagem de inclusão dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais e seus respectivos valores de  $\delta^{13}\text{C}$ .....24

Tabela 4. Média dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  das fezes, sangue e plasma dos tratamentos  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  no início e no final do período experimental (n=12 e n=6 para  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , respectivamente).....27

Tabela 5. Equações exponenciais das diluições isotópicas em função do tempo, das fezes, sangue e plasma dos animais do tratamento  $\text{C}_3$  com seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ).....31

Tabela 6. Valores calculados da meia-vida e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de Carbono (dias) das fezes, sangue e plasma dos animais do tratamento experimental  $\text{C}_3$  a partir do dia de substituição das dietas.....31

## LISTA DE FIGURAS

Página

### CAPÍTULO 2

Figura 1. Curva de diluição isotópica do carbono das fezes em função do intervalo de avaliação.....30

Figura 2. Curva de diluição isotópica do carbono do sangue em função do intervalo de avaliação.....30

Figura 3. Curva de diluição isotópica do carbono do plasma em função do intervalo de avaliação.....31

## CAPÍTULO 1

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Mundialmente, há crescente movimentação dos consumidores pela procura de alimentos saudáveis, sustentáveis, de melhor qualidade, de boa procedência, produzido de maneira socialmente correta e no caso dos carnes também há preocupação quanto ao bem-estar animal e quanto à sua forma de produção. Assim, os produtores e fabricantes, de todo o mundo, foram obrigados a se adequar às normas de boas práticas de produção e fabricação para conseguir suprir esta demanda, cada vez mais alta, de consumidores cada vez mais exigentes (RIJSWIJK et al. 2008).

Com isso, um dos maiores desafios do Brasil é intensificar a oferta de produtos de qualidade, além de atender às demandas do mercado interno e externo no quesito “origem da carne” (FRANCO, 2002). Produzir alimentos para o mundo requer responsabilidade em virtude dos riscos de contaminação e seguridade dos alimentos, dos procedimentos adotados na produção, das condições em que este alimento é produzido, assim, todos estes fatores devem ser considerados para promover padrão produtivo dentro das expectativas do mercado.

Diante deste cenário, órgãos que cuidam dos interesses dos consumidores passaram a exigir dos fornecedores, garantias quanto à origem e a qualidade nos processos de produção de alimentos. Segundo Rijswijk et al. (2008), várias empresas do ramo alimentício europeu estão se adequando à exigência do consumidor e consideram a rastreabilidade como uma etapa inicial à segurança alimentar.

Segundo Mendes (2006) a rastreabilidade não é uma ferramenta que por si só garante a qualidade dos alimentos, entretanto, auxilia na maior visibilidade das boas práticas aplicadas ao longo da cadeia produtiva dos alimentos comercializados. Assim, torna-se necessário a adequação de novas técnicas para complementar e dar maior suporte aos programas de rastreabilidade da carne bovina.

Uma técnica que permite tal suporte é a de isótopos estáveis. Esta apresenta potencial de aplicação prática na nutrição e metabolismo animal, utilizando como marcadores os isótopos de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre (CHON`S) e sua concentração natural existente nos alimentos, permitindo assim traçar a dieta à qual os animais foram submetidos (DUCATTI, 2007). Entretanto, para o desenvolvimento dessa linha de pesquisa, há a necessidade de realização de estudos que contribuam para maior conhecimento da assimilação isotópica da matéria orgânica nos tecidos dos animais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Rastreabilidade

Há várias definições para o termo rastreabilidade ou fonte de verificação, oriundo do inglês “traceability”, entretanto a mais genérica e utilizada é o acompanhamento do trajeto do produto (objetos, animais, rações, alimentos de origem animal ou vegetal, mercadorias ou qualquer substância que poderá ser incorporada ao produto final) desde sua origem até o seu consumidor final.

No campo da zootecnia o conceito de rastreabilidade pode ser traduzido no acompanhamento desde o nascimento do animal até o abate que irá compor a refeição do consumidor, sendo possível, assim, conhecer e voltar à origem de qualquer corte cárneo a venda no mercado alimentar (SILVA, 2004; RIJSWIJK et al., 2008).

Desta forma pode-se definir o sistema de rastreabilidade como sendo um conjunto de medidas que possibilitam o controle e monitoramento sistemático de todas as entradas e saídas das unidades produtoras, processadoras e distribuidoras, garantindo assim a origem, qualidade e segurança alimentar do produto final (SILVA, 2004).

Desde a década de 70, a questão da inocuidade e qualidade dos alimentos vem causando crescente preocupação tanto para o poder público e indústrias como para os consumidores. Os sistemas de rastreabilidade de produtos exigem uma cadeia transparente de ações para manter sua credibilidade e garantir suas funções de transferência de informação. Assim, se faz necessário um mecanismo confiável e que possa ser verificável, para preservar a identidade dos exemplares ao longo da cadeia alimentar (MCKEAN, 2001), uma vez que a população demanda cada vez mais por informações confiáveis sobre as mercadorias que adquirem.

Recentes episódios na Europa, como a crise provocada pela encefalopatia espongiforme bovina (“doença da vaca louca”) e pela febre aftosa, afetaram gravemente o comércio e reafirmaram a necessidade de melhorar os métodos para o rastreamento de animais vivos e seus derivados, especialmente quando são objetos de intercâmbios comerciais de âmbito internacional (MACDANIEL e SHERIDAN, 2001).

Frente a estas necessidades de identificar, rastrear e certificar produtos agropecuários, o governo brasileiro através do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento publicou em 2001 a Instrução Normativa Nº 15, de 17 de Julho, a qual proíbe a produção, comercialização e utilização de carnes e miúdos, farinha de sangue, farinha de carne, farinha de ossos, farinha de resíduos de açougue, farinha de vísceras de aves, farinha de penas e vísceras de aves, farinha de resíduos de abatedouros de aves, para a alimentação de ruminantes.

Neste mesmo sentido, o governo brasileiro criou em Janeiro de 2002 o SISBOV - Sistema Brasileiro de Identificação e Certificação de Origem Bovina e Bubalina, que tem como objetivo identificar, registrar e monitorar todos os bovinos e bubalinos nascidos no Brasil ou importados (LIMA et al., 2007). Porém, este sistema de rastreabilidade de adesão voluntária mostrou-se ineficaz no que se diz respeito à segurança alimentar, pois não leva em consideração a dieta fornecida ao animal.

A rastreabilidade é o primeiro passo para atender as novas demandas dos consumidores do mundo todo, para isso, a identificação segura dos animais é a base para a maior parte das funções do sistema de manejo que resultam em progressos zootécnicos, controle e economia da produção. Os sistemas tradicionalmente utilizados como brincos, colares, tatuagens, ferro quente (a fogo ou elétrico) etc., resultam em identificação prática de cada animal do rebanho (LOPES, 1997).

Todavia, esses sistemas apresentam dificuldade de visualização a distância, necessidade de contenção do animal, problemas na leitura devido à abrasão dos caracteres, sujeiras e erros de transcrição e possibilidade de duplicação de número, isto é, dois animais com a mesma identificação (MACHADO et al., 2001).

Cavalcanti (2008) relatou que em 2008 a União Europeia restringiu a compra da carne brasileira devido a erros no registro das explorações, na identificação dos animais e controle das movimentações. Esse fato fez com que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), formalizasse por meio da Instrução Normativa N. 24, de 30 de abril de 2008 que os estados também "serão responsáveis pelas auditorias das propriedades exportadoras de carne bovina *in natura* para a União Europeia".

No entanto, mesmo com a reforma, o SISBOV tem sido criticado pelos agentes do setor e pela União Européia, pois este sistema de rastreabilidade está sujeito a sofrer fraudes e não traz informações sobre a dieta a qual o animal foi submetido.

Assim, a adequação de novas técnicas para complementar e dar maior suporte aos programas de rastreabilidade da carne bovina é de suma importância, uma vez que o mercado externo exige cada vez mais a ausência de produtos de origem animal na alimentação de qualquer espécie destinada à produção de carne.

Técnica com potencial uso na rastreabilidade da dieta é a dos isótopos estáveis, que já vem sendo utilizada como ferramenta para a detecção de adulteração em bebidas e mel. Por ser um método que tem como princípio “o animal é o que ele come”, a técnica baseia-se nos alimentos assimilados e não apenas nos alimentos ingeridos e, comparativamente podem ser obtidas informações de dietas consumidas a curtos e longos períodos, dependendo do tecido avaliado (DUCATTI, 2004).

## 2.2 Isótopos Estáveis

O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, que possuem o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, consequentemente apresentando diferentes massas. Por possuírem sua camada eletrônica igual, ou seja, com o mesmo número de elétrons, pode-se dizer que os isótopos são elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas e diferentes propriedades físicas, o que permite que eles sejam utilizados como traçadores naturais em pesquisas. Já a expressão estável significa que não emitem radiação (DUCATTI, 2007).

A nomenclatura isotópica se expressa por  ${}^A_Z X$ , na qual,  $X$  representa o elemento químico,  $A$  reflete o número de massa em unidades de massa atômica e  $Z$  o número de prótons, de modo que  $A = Z + N$ , onde  $N$  representa o número de nêutrons.

O elemento químico carbono, por exemplo, (Tabela 1), apresenta somente dois isótopos estáveis;  ${}^{12}_6 C$  e  ${}^{13}_6 C$ , sendo que o Carbono-12 é o mais leve e o mais abundante entre eles, e os dois diferem pela existência de um nêutron a mais no núcleo. As moléculas isotópicas  ${}^{12}CO_2$  e  ${}^{13}CO_2$  não são diferenciadas pelas membranas biológicas de origem vegetal ou animal, ou seja, a pequena sutileza escondida no núcleo (nêutron a mais) não é detectada, tornando o isótopo estável do Carbono-13 excelente traçador em nível de variação natural ou compostos enriquecidos, o que é extensivo para os demais bioelementos.

Os principais isótopos estáveis dos bioelementos estão explícitos na Tabela 1.



**Tabela 1.** Os isótopos estáveis dos elementos H, C, N, O e S e suas moléculas gasosas comumente utilizadas na espectrometria de massas.

Isótopos Estáveis	Abundância átomos %	Gás	Isótopos Estáveis	Abundância átomos %	Gás
<sup>1</sup> H	99,9844	H <sub>2</sub>	<sup>16</sup> O	99,7628	CO <sub>2</sub>
<sup>2</sup> H	0,0156		<sup>17</sup> O	0,0372	
<sup>12</sup> C	98,8890	CO <sub>2</sub>	<sup>18</sup> O	0,2000	
<sup>13</sup> C	1,1110		<sup>32</sup> S	95,0180	
<sup>14</sup> N	99,6340	N <sub>2</sub>	<sup>33</sup> S	0,7500	SO <sub>2</sub>
<sup>15</sup> N	0,3660		<sup>34</sup> S	4,2150	
			<sup>36</sup> S	0,0170	

Fonte: Preston, 1992.

Cada elemento químico apresenta um isótopo estável leve, dominante: carbono-12 (<sup>12</sup>C), hidrogênio-1 (<sup>1</sup>H), oxigênio-16 (<sup>16</sup>O) e nitrogênio-14 (<sup>14</sup>N), e um ou dois isótopos pesados: carbono-13 (<sup>13</sup>C), hidrogênio-2 (<sup>2</sup>H), oxigênio-17 (<sup>17</sup>O), oxigênio-18 (<sup>18</sup>O) e nitrogênio-15 (<sup>15</sup>N), com abundância ou concentração natural expressa em átomos % (DUCATTI, 2007).

Os isótopos estáveis dos bioelementos são analisados na forma gasosa por espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS), no qual a amostra é analisada contra um padrão internacional específico para cada elemento, com erro analítico da ordem de 0,2‰ (per mil), por meio da expressão adimensional:

$$\delta \text{ (amostra, padrão)} = (r \text{ amostra} - r \text{ padrão})/r \text{ padrão}$$

Como os valores numéricos das diferenças entre as razões isotópicas (r) são pequenos, costuma-se multiplicar e dividir a expressão por 1000, obtendo-se a terminologia em delta per mil (‰).

As análises dos isótopos estáveis dos bioelementos - carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio têm sido aplicadas de forma crescente e contínua em pesquisas agropecuárias. Os primeiros produtos investigados foram frutas, sucos, mel, vinho e álcool e, para todos eles, métodos oficiais por meio da análise isotópica para detectar a adição de água ou açúcar existem desde 1978 nos Estados Unidos e 1995 na Europa.

No Brasil, em 2007, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicou a Instrução Normativa N° 39 de 8 de Agosto, a qual oficializou o método

analítico para determinação da razão isotópica dos açúcares de diferentes origens no suco, refresco, néctar e bebida de uva.

Como estes bioelementos (C,H,O,N,S) fazem parte da estrutura dos carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e são responsáveis por mais de 90% de todos os tecidos vivos, torna-se possível a utilização desta técnica em estudos de nutrição e metabolismo animal. Pesquisas realizadas demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e dos gases inalados (KENNEDY e KROUSE, 1990).

### 2.3 Isótopos de Carbono

Há naturalmente, a ocorrência de dois isótopos estáveis de carbono, o carbono-12 e o carbono-13, com abundâncias naturais de aproximadamente 98,89 e 1,11 átomos%, respectivamente (KENNEDY e KROUSE, 1990). Em função da grande diferença na abundância natural dos isótopos estáveis do carbono, a mensuração da relação entre eles na maioria das amostras gera valores muito pequenos.

Para converter esta relação, os valores isotópicos do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) são expressos na terminologia dos isótopos estáveis, em delta per mil da razão isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  do produto em relação ao padrão internacional definido ( $\delta^{13}\text{C}$ ), PeedeeBelemnite (PDB). Quando se tem sinal negativo no  $\delta^{13}\text{C}$  indica que o material estudado apresenta menor concentração de  $^{13}\text{C}$  que o padrão internacional PDB (DUCATTI, 2007).

A medida da relação entre isótopos estáveis é realizada por espectrometria de massa. Esta detecta a concentração dos diferentes isótopos do elemento. O enriquecimento isotópico relativo é obtido pela expressão (1):

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}})-1].10^3 \quad (1)$$

Em que:

$\delta^{13}\text{C}$  = enriquecimento isotópico do carbono-13 da amostra relativo ao padrão internacional PDB. Adimensional.

R = razão isotópica ( $\text{C}^{13}/\text{C}^{12}$ ) da amostra e do padrão, respectivamente. Adimensional.

Os valores isotópicos do carbono-13 são expressos em termos do padrão internacional, PeedeeBelemnite (PDB).

A fonte primária do carbono para as plantas terrestres é o CO<sub>2</sub> atmosférico, o qual tem valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -7,7‰ (KENNEDY e KROUSE, 1990). 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.

De acordo com o ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos principais: plantas C<sub>3</sub> (arroz, leguminosas, trigo, cevada, hortaliças, beterraba, mandioca, algodão, alfafa, soja, feijão, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, entre outros) e C<sub>4</sub> (cana de açúcar, milho, gramíneas tropicais, entre outras).

As plantas dos ciclos fotossintéticos C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> e seus derivados, ou os seus subprodutos, os quais são utilizados na alimentação animal, apresentam valores isotópicos distintos entre si. Nas plantas C<sub>3</sub>, o valor de  $\delta^{13}\text{C}$  varia de -22 a -34‰, dependendo da espécie e da parte da planta analisada, e nas plantas C<sub>4</sub> este valor encontra-se entre -9 e -16‰. O contraste existente na razão isotópica de <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C da ordem de 16‰ nos valores em  $\delta^{13}\text{C}$  entre as plantas de ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> torna possível a caracterização da dieta do animal pela análise isotópica do carbono dos tecidos, uma vez que o erro cometido na determinação da variabilidade natural do carbono pelo espectrômetro de massas é da ordem de 0,2‰ (DUCATTI, 2004).

Pesquisadores têm utilizado isótopos estáveis de carbono, não apenas na determinação de ingredientes da dieta (BRUCKENTAL et al., 1985), como também, em análises da digestibilidade dos mesmos (COATES, 1999). Além disso, esta diferença natural possibilita utilizar essas plantas e seus subprodutos como traçadores naturais em animais, determinando assim o *turnover* do carbono nos tecidos, sem a necessidade de síntese de compostos enriquecidos em carbono-13 ou a utilização de isótopos radioativos (METGES et al., 1990).

## **2.4 Turnover de carbono**

Entende-se *turnover* isotópico como sendo a renovação contínua dos elementos químicos e, conseqüentemente, de seus isótopos que compõem o tecido corporal ou o organismo como um todo. Os constituintes corporais encontram-se em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos. Todas as substâncias do corpo sejam elas metabólitos orgânicos ou inorgânicos, estão sujeitas ao *turnover* (HETENYI et al., 1983). Por meio do consumo

das plantas pelos animais, a “impressão digital isotópica” destas fontes vegetais é refletida nos tecidos específicos dos animais, após certo tempo de metabolismo (DENIRO e EPSTEIN, 1978; GANNES et al., 1998).

Segundo DeNiro e Epstein (1978) a integração da 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, a base da maioria dos pressupostos dos experimentos que utilizam os isótopos estáveis do carbono.

O período sobre o qual a concentração isotópica tecidual refletirá a assinatura isotópica de uma dieta em particular dependerá, em parte, da taxa de *turnover* no tecido, pois depende das taxas de aquisição, síntese e catabolismo de cada componente tecidual (DUCATTI, 2007). De modo geral, os tecidos mais ativos metabolicamente (fígado, pâncreas) apresentam *turnover* mais rápido que os tecidos menos ativos metabolicamente, como o colágeno dos ossos. A escolha do tipo de tecido para a análise isotópica depende, então, da questão de interesse (HOBSON e CLARK, 1992).

Knobbe et al. (2006) estudaram as razões isotópicas de carbono e nitrogênio para fins de rastreabilidade, no leite e urina de vacas sob diferentes regimes alimentares, e encontraram valores estáveis do  $\delta^{13}\text{C}$  do leite e da urina 10 dias após o início da mudança de dieta de  $\text{C}_4/\text{C}_3$  para  $\text{C}_3$ . Após mudança da alimentação de  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4/\text{C}_3$ , os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  foram alcançados em 6 dias.

Bahar et al. (2008) estudaram as alterações na composição dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no músculo de bovinos e concluíram que a composição desses isótopos no músculo alterou consideravelmente, devido à substituição da silagem de capim ( $\text{C}_3$ ) pela silagem de milho ( $\text{C}_4$ ) na dieta de bovinos de corte. No entanto, o tecido muscular estudado mostrou não ser adequado para mudanças recentes de dietas, pois foi verificado que após 167 dias de experimento, o *turnover* do tecido muscular não tinha sido completo, refletindo o  $\delta^{13}\text{C}$  da antiga dieta.

Molkentin (2009) estudou a associação do isótopo de carbono e do ácido  $\alpha$ -Linolênico presentes na gordura do leite, para verificar sua aplicabilidade como indicadores na autenticação do leite orgânico na Alemanha. Pelos resultados obtidos, o autor conseguiu diferenciar o leite orgânico alemão do convencional, pois o leite orgânico produzido na Alemanha é proveniente de animais cuja dieta é baseada em forrageiras do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$ . Assim, o fornecimento de milho ( $\text{C}_4$ ), principalmente no inverno, possibilitou a diferenciação.

De acordo com Martins et al. (2012) ovelhas alimentadas com plantas  $C_3$  podem ser diferenciadas de ovelhas alimentadas com plantas  $C_4$ . Diferenças analisadas entre as fezes e o sangue demonstram claramente que o tipo de tecido em estudo influencia o *turnover*, ou seja, a troca mais rápida ou mais lenta do carbono. As fezes refletem mudanças a curto prazo da dieta de ovinos, e o sangue pode indicar a antiga dieta por um período mais longo.

Vieira Júnior (2013) diferenciou sistemas de produção de bovinos de corte pela técnica da análise dos isótopos estáveis. Animais provenientes de confinamento, pasto e sistema superprecoce foram diferenciados pela diferença isotópica do  $\delta^{13}C$  no sangue.

Para o processo de rastreabilidade, o tecido escolhido deve refletir a dieta precedente com a finalidade de poder detectar sinais de assimilação isotópica dos ingredientes a serem rastreados, por exemplo, farinhas de origem animal, mesmo que estes sejam fornecidos apenas em uma fase da vida do animal. A escolha do tecido a ser analisado é importante, pois tecidos de metabolismo lento podem conservar o sinal isotópico da dieta previamente ingerida por mais tempo no organismo, de maneira inversa, tecido de metabolismo mais rápido (que substitui o sinal da dieta mais rapidamente) pode possibilitar a detecção de inclusão dos ingredientes não permitidos fornecidos na fase final de criação. O estudo de tecidos que possam ser coletados sem o sacrifício do animal também é de extrema importância.

Para mensurar o *turnover* isotópico do carbono em determinado intervalo de tempo, Ducatti et al. (2002) propuseram um modelo teórico capaz de exprimir os resultados do enriquecimento relativo de carbono ( $\delta^{13}C$ ) em função do tempo de alimentação, fornecendo dietas com sinais isotópicos diferentes. Partindo do pressuposto que o metabolismo de determinado tecido animal depende da taxa de entrada de compostos pré-existentes, os autores chegaram a uma função exponencial do tempo, expressa pela equação (2):

$$\delta^{13}\text{C} (t) = \delta^{13}\text{C} (f) + [\delta^{13}\text{C} (i) - \delta^{13}\text{C} (f)] e^{-kt} \quad (2)$$

Em que:

$\delta^{13}\text{C} (t)$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta^{13}\text{C} (f)$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C} (i)$  = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*) em dia<sup>-1</sup>

t = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

Nas fezes, assim como em outros produtos de origem animal (leite, ovo) não é possível calcular a taxa de renovação tecidual (*turnover*), uma vez que estes não são considerados tecidos. Entretanto, o estudo do *turnover* nestes produtos indica a taxa de renovação dos nutrientes para a sua formação (DENADAI et al., 2006).

A análise da razão isotópica de apenas um elemento pode não ser suficiente para fornecer informação sobre atribuições ou características de determinado produto. Entretanto, análises combinadas, utilizando mais de um elemento químico, podem promover um melhor entendimento sobre o objeto em estudo.

Para o desenvolvimento da linha de pesquisa de rastreabilidade pela técnica de isótopos estáveis, são necessários estudos que contribuam para amplo conhecimento da assimilação isotópica da matéria orgânica nos diferentes tecidos dos bovinos. Contudo, são poucos e incipientes os trabalhos nacionais avaliando a aplicação da metodologia dos isótopos estáveis com foco na nutrição animal.

Portanto, pesquisas direcionadas a Nutrição e Produção de Ruminantes assumem extrema relevância, afim de melhor compreender e proporcionar suporte de cunho científico ao sistema de rastreabilidade já implantando no país.

Este trabalho está vinculado ao projeto temático do Centro de Isótopos Estáveis da UNESP – Botucatu que visa estabelecer uma metodologia oficial por meio dos isótopos estáveis para detectar a adição de alimentos não permitidos nas dietas dos animais, como o caso das farinhas de origem animal. Outro enfoque do projeto é implantar no Brasil a área inédita da aplicabilidade sistemática da rastreabilidade pelos isótopos estáveis dos bioelementos nas grandes áreas zootécnicas, dos ruminantes, não ruminantes e aquicultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAHAR, B.; MONAHAN, F.J.; MOLONEY, A.P. et al. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v.19, p.1937-1942, 2008.

BRUCKENTAL, I.; HALEVI, A.; NEUMARK, H.; KENNIT, H.; SCHROEDER, G. The ratio of naturally occurring  $^{13}\text{C}$  and  $^{12}\text{C}$  isotopes in sheep diet and feces as a measurement for direct determination of Lucerne hay and maize grain digestibilities in mixed diet. **Journal Agricultural Science**, v.104, p.271-274, 1985.

CAVALCANTI, M.R. **O boi, o brinco e a União Européia**. 2008. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/?noticialID=42322&actA=7&arealD=15&secaoID=123>>. Acesso em: 22 dez. 2012.

COATES, D.B. The use of  $\delta^{13}\text{C}$  values to improve the reliability of estimates of diet quality when sampling tropical pastures with oesophagealfistulated cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.39, p.1-7, 1999.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R.; OLIVEIRA, R.P. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.251-256, 2006.

DENIRO, M.J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, p.495-506, 1978.

DUCATTI, C. **Isótopos Estáveis Ambientais**. Botucatu. Universidade Estadual Paulista, 2004. 204 p. Apostila.

DUCATTI, C. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, *suplemento especial*, p.01-10, 2007.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono – 13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, v.59. n.1, p. 29-33, 2002.

FRANCO, M. Especial rastreabilidade. **DBO Rural**, n. 255, p. 102-117, 2002.

GANNES, L.Z.; DEL-RIO, C.M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.119, p.725-737. 1998.

HETENYI, G.J.R.; PEREZ, G.; VRANIC, M. *Turnover* and precursor-product relationships of nonlipid metabolites. **Physiological Reviews**, v.63, p.606-607, 1983.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. **The Condor**, v.94, p.181-188, 1992.

KENNEDY, B.V.; KROUSE, H.R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v.68, p.960-972, 1990.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W. et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.386, p.104-108, 2006.

LIMA, V.M.B.; COSTA, C.N.; LEITE, J.L.B.; BORNSTEIN, C.T. SISBOV: entendendo o passado, planejando o futuro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 45., Londrina, 2007. **Anais eletrônicos**. Londrina: UEL, 2007. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/6/495.pdf>> Acesso em: 21 dez. 2012.

LOPES, M.A. **Informática aplicada à bovinocultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 82p.

MACDANIEL, H.A.; SHERIDAN, M.K. Rastreabilidade de animales y productos de origen animal. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties, Paris**, v. 20, n. 2, 2001.

MACHADO, J.G. de C.F.; NANTES, J.F.D. Avaliação de um sistema de identificação eletrônica de animais na rastreabilidade de informações. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 13-21, 2001.



MCKEAN, J.D. Importancia de la rastreabilidade para la salud pública y La protección del consumidor. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 20,p. 363-371, 2001.

MARTINS, M.B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; DENADAI, J.C.; NATEL, A.S.; SOUZA-KRULISKI, C.R.; SARTORI, M.M.P. Stable isotopes for determining carbon turnover in sheep feces and blood. **Livestock Science**, v.149, p. 137-142, 2012.

MENDES, R.E. O impacto financeiro da rastreabilidade em sistemas de produção de bovinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p. 1524-1528, 2006.

METGES, C.; KEMPE, K.; SCHIMIDT, H.L. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the  $\delta^{13}\text{C}$  value of food in dairy cows. **British Journal of Nutrition**, v.63, p.187-196, 1990.

MOLKENTIN, J. Authentication of Organic Milk Using  $\delta^{13}\text{C}$  and the  $\alpha$ -Linolenic Acid Content of Milk Fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.785-790, 2009.

PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. In. **Plant Cell and Environment** 15: 1091-1097. 1992.

RIJWSWIJK, W.V., FREWER, L.J., MENOZZI, D., FAIOLI, G. Consumer perceptions of traceability: A cross-national comparison of the associated benefits. **Food Quality and Preference, Marketing and Consumer Behaviour**, Wageningen, The Netherlands. Reference: FQAP 2044, 2008.

SILVA, K.O. Viabilidade do uso da rastreabilidade eletrônica na produção de suínos. **Tese (Doutorado)** - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola. Campinas, SP: [s.n.], 2004.

VIEIRA JÚNIOR, L.C. Diferenciação de sistemas de produção de bovinos de corte pela técnica da análise dos isótopos estáveis. Botucatu, FMVZ/UNESP, 68p. **Tese de Doutorado**, 2013.



## **CAPÍTULO 2**

### ***Turnover* do Carbono-13 nas Fezes, no Sangue e Plasma de Bovinos Jovens Confinados**

## **Turnover de Carbono-13 nas Fezes, no Sangue e Plasma de Bovinos Jovens Confinados**

### **RESUMO**

A pecuária de corte é uma atividade de grande relevância no contexto econômico nacional. Entretanto, o Brasil ainda não dispõe de um sistema de rastreabilidade confiável que forneça informações sobre a dieta a qual o animal foi submetido. Recentes episódios na Europa, como a crise provocada pela encefalopatia espongiforme bovina e pela febre aftosa, reafirmaram a necessidade de melhorar os métodos para o rastreamento de animais vivos e seus derivados. O objetivo deste trabalho foi determinar o *turnover* do carbono nas fezes, sangue e plasma de bovinos jovens confinados utilizando a técnica dos isótopos estáveis. Foram utilizados dezoito bovinos Aberdeen Angus x Nelore provindos de pastagem de gramínea C<sub>4</sub>. Os animais foram confinados e distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos: C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. Os animais do tratamento C<sub>3</sub> receberam dietas com sinal isotópico C<sub>3</sub> e os animais do tratamento C<sub>4</sub> receberam dietas com sinal isotópico C<sub>4</sub>, por um período de 153 dias. Para mensurar o *turnover* do carbono nas fezes, sangue e plasma em determinado intervalo de tempo, foi utilizada a função exponencial do tempo. Foram coletadas amostras de sangue nos dias: 0,1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 140, 153; e de fezes nos dias: 0,1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 21. Os valores isotópicos das fezes, sangue e plasma atingiram o patamar de equilíbrio, indicando valores de meia-vida de 1,8; 40 e 20 dias e valores de 12, 267 e 134 dias para a troca de 99% dos átomos de carbono para o tratamento C<sub>3</sub>, respectivamente. Pode-se concluir que bovinos jovens Aberdeen Angus x Nelore alimentados com plantas C<sub>3</sub> podem ser diferenciados de bovinos alimentados com plantas C<sub>4</sub>. Os resultados obtidos comprovam que as fezes refletem mudanças a curto prazo da dieta de bovinos, e que o sangue e o plasma podem indicar a antiga dieta por um período mais longo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rastreabilidade, carne bovina, segurança alimentar, plantas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, assimilação isotópica, meia-vida.

## Carbon-13 *turnover* in feces, plasma and blood of confined steers

### ABSTRACT

Beef cattle play an important economic role in Brazil. However, Brazil does not yet have a reliable traceability system that provides information about the diet offered to the animals. Recent episodes in Europe, such the crisis caused by bovine spongiform encephalopathy (mad cow disease) and foot and mouth disease (FMD), reaffirmed the need to improve the methods for tracing live animals and animal products. This study aimed to determine the *turnover* of carbon in the feces, blood and plasma of young bulls fed in feedlot. We used 18 steers of the Aberdeen Angus x Nellore raised on C<sub>4</sub> grass. The animals were randomly divided in two treatments: C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub>. The animals from the C<sub>3</sub> treatment received diets with C<sub>3</sub> isotopic signal and the animals in the C<sub>4</sub> treatment received diets with C<sub>4</sub> isotopic signal during 153 days. To measure the carbon turnover in the feces, plasma and blood, we collected blood samples on days: 0,1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 140, 153; and feces on days: 0,1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 21. The time exponential function was used to measure the carbon turnover (isotope substitution) on feces, blood and plasma in a certain period of time. The isotopic values of feces, blood and plasma reached the balance level, indicating half-life values of 1.8, 40 and 20 days and values of 12, 267 and 134 days for exchange of 99% of carbon atoms for C<sub>3</sub>, respectively. We concluded that the steers of Aberdeen Angus x Nellore fed with C<sub>3</sub> plants can be distinguished from those fed with C<sub>4</sub> plants. The results obtained show that the feces reflect short-term changes in the cattle diet and that blood and plasma can indicate the old diet for a longer period.

**KEYWORDS:** Traceability, food safety, beef, C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants, isotopic assimilation, half-life.

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte é uma atividade de grande relevância no contexto econômico nacional. O Brasil possui um rebanho bovino de 212,8 milhões de cabeças (IBGE, 2012) e foi, em 2012, o maior exportador de carne bovina do mundo com 1,244 milhão de ton, representadas por US\$ 5,769 bilhões (ABIEC, 2012).

Entretanto, apesar da posição de destaque no cenário internacional o Brasil ainda não dispõe de um sistema de rastreabilidade confiável. O sistema atual de rastreabilidade (SISBOV) apresenta dificuldade de visualização a distância, necessidade de contenção do animal, problemas na leitura devido à abrasão dos caracteres, erros de transcrição, possibilidade de duplicação de número, além de estar sujeito a sofrer fraudes e não trazer informações sobre a dieta a qual o animal foi submetido (MACHADO et al., 2001).

Simultaneamente, tem sido relevante a pressão exercida por informações claras sobre os fatores ligados aos sistemas produtivos de bovinos, especialmente sobre os alimentos fornecidos aos animais (PRACHE, 2009). Recentes episódios na Europa, como a crise provocada pela encefalopatia espongiforme bovina (“doença da vaca louca”) e pela febre aftosa, afetaram gravemente o comércio e reafirmaram a necessidade de melhorar os métodos para o rastreamento de animais vivos e seus derivados, especialmente quando são objetos de intercâmbios comerciais de âmbito internacional (MACDANIEL e SHERIDAN, 2001).

Diante deste cenário, órgãos que cuidam dos interesses dos consumidores passaram a exigir dos fornecedores, garantias quanto à origem e a qualidade nos processos de produção de alimentos. Com isso, um dos maiores desafios do Brasil é intensificar a oferta de produtos de qualidade, além de atender às demandas do mercado interno e externo no quesito “origem da carne” (FRANCO, 2002).

Neste contexto, a técnica dos Isótopos Estáveis pode ser concebida como ferramenta complementar que visa dar maior suporte aos programas de rastreabilidade da carne bovina já existentes, onde metodologias analíticas convencionais não podem garantir resultados totalmente seguros (BAHAR et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi quantificar experimentalmente o *turnover* isotópico do Carbono-13 nas fezes, sangue e plasma de bovinos jovens alimentados com plantas do ciclo fotossintético C3 e C4, pela técnica dos isótopos estáveis.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Período Pré-experimental**

#### **2.1.1 Instalações e animais**

O período pré-experimental foi realizado na UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu, nas instalações da Fazenda Edgárdia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia durante período de 20 meses.

Foram utilizadas dezoito matrizes Nelore de  $6 \pm 2$  anos de idade, peso vivo médio de  $453,11 \pm 31,72$  kg, provindas de pastagem de gramínea  $C_4$  (*Brachiaria decumbens*). Visando encurtar a estação de monta e produzir bezerros uniformes as matrizes foram submetidas à sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

#### **2.1.2 Manejo reprodutivo**

O protocolo de IATF se iniciou com a aplicação de uma fonte intravaginal de progesterona e a aplicação do Benzoato de Estradiol no dia zero, esse procedimento teve por finalidade a regressão folicular, pois altas concentrações de estradiol na presença de progesterona promovem a regressão folicular e a emergência de uma nova onda de crescimento dos mesmos. Após oito dias, foi removida a fonte de progesterona e aplicado a prostaglandina para simular a luteólise, ou seja, a quebra do corpo lúteo pela prostaglandina. No dia nove foi aplicada novamente uma fonte de estradiol para dar aporte ao desenvolvimento e maturação do folículo dominante. No dia dez, foi realizada a inseminação artificial com sêmens de touros Aberdeen Angus.

#### **2.1.3 Caracterização do Sistema Superprecoce**

O sistema de produção de bovinos superprecoces, desenvolvido pela UNESP, no campus de Botucatu explora a heterose, por intermédio de cruzamentos industriais entre zebuínos e raças europeias especializadas para o corte.

A produção de novilhos superprecoces é uma forma de produzir carne de forma intensiva através do abate de animais entre 12-15 meses de idade. Este

sistema, além de oferecer ao produtor a possibilidade de explorar o ganho em escala, aumentar o capital de giro da propriedade e a melhoria da receita em longo prazo, também permite uma qualidade de carcaça com características desejáveis para o mercado interno e externo como: quantidade de gordura adequada, peças de tamanho constante, coloração, maciez e sabor.

#### **2.1.4 Creep-Feeding**

O *creep feeding* é a suplementação alimentar para os bezerros durante a fase de aleitamento. A suplementação foi feita com concentrado em cocho privativo, ao qual somente os bezerros tiveram acesso. Os animais foram suplementados dos 3 aos 8 meses de idade. A quantidade média aproximada de ração fornecida durante o período de aleitamento foi de 1kg/animal/dia. Através do alto desempenho animal apresentado nesse sistema, eliminou-se a tradicional, onerosa e longa fase da recria.

A vantagem dessa técnica é permitir a desmama de bezerros mais pesados e proporcionar redução no tempo de abate dos animais, condições estas essenciais para a caracterização do sistema superprecoce de produção.

#### **2.1.5 Escolha dos tecidos avaliados**

No processo de rastreabilidade buscam-se tecidos que possam refletir a dieta antiga com a finalidade de poder detectar a inclusão de farinhas de origem animal, mesmo que fornecidas apenas nas fases iniciais da vida do bovino; para isto, necessita-se identificar um tecido de metabolismo lento que conserve o sinal isotópico por mais tempo, além disso, busca-se também um tecido que substitua rapidamente os seus átomos de carbono, de forma que possa indicar a mudança da alimentação na fase final da produção de bovinos.

Bahar et al. (2008) encontraram valores de meia vida do carbono da ordem de 151 e 134 dias para os músculos *Longissimus dorsi* e *Psoas major*, respectivamente. Portanto, a análise do tecido muscular fornece indicativos de dietas consumidas em períodos de tempo distantes. No entanto, para a elaboração de um programa de rastreabilidade abrangente e confiável, também se faz necessário conhecer a assimilação isotópica de tecidos que possam fornecer indicativos de dietas consumidas em períodos recentes. Diante deste cenário, as fezes, o sangue e o



plasma foram escolhidos para as análises por não necessitarem o abate animal, serem de fácil coleta e apresentarem metabolismo mais rápido que o tecido muscular.

### 2.1.6 Monitoramento pré-experimental

As concentrações de  $\delta^{13}\text{C}$  dos alimentos fornecidos aos animais no período pré-experimental (leite, pasto e ração) e as concentrações de  $\delta^{13}\text{C}$  das fezes, sangue, plasma dos bezerros e das matrizes foram monitoradas durante todo o período pré-experimental. As coletas para o monitoramento isotópico foram realizadas no nascimento, aos 2, 4, 6 e 8 meses de idade.

As análises isotópicas foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP – Campus de Botucatu.

## 2.2. Período experimental

### 2.2.1 Instalações e animais

O experimento foi realizado na UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu, nas instalações do confinamento experimental do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, na Fazenda Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia durante período de 153 dias.

Foram utilizados dezoito bovinos Aberdeen Angus x Nelore (F1), de oito meses de idade, peso vivo médio de  $236,3 \pm 16,65$  kg, provindos de pastagem de gramínea  $\text{C}_4$ , suplementados em sistema creep-feeding. As concentrações de  $\delta^{13}\text{C}$  dos alimentos fornecidos aos animais no período pré-experimental e os valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  do sangue, plasma e fezes dos bezerros e das matrizes no período pré-experimental encontram-se nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dos alimentos fornecidos aos animais no período pré-experimental (n=6).

Alimento	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Leite	$-15,11 \pm 1,7$
Pasto	$-17,56 \pm 2,2$
Creep-feeding	$-26,20 \pm 0,9$

**Tabela 2.** Valores médios de  $\delta^{13}\text{C}$  do sangue, plasma e fezes dos bezerros e das matrizes no período pré-experimental. (n=18 e n=6 para bezerros e matrizes, respectivamente).

Animais	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		
	Sangue	Fezes	Plasma
<b>Bezerros</b>	-14,62 ± 1,35	-17,34 ± 2,05	-13,62 ± 1,00
<b>Matrizes</b>	-16,79 ± 0,35	-12,2 ± 2,62	-13,72 ± 1,02

Os animais foram alojados em baias individuais de piso de concreto com 25m<sup>2</sup> de área e distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos: C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, com 12 e 6 unidades experimentais, respectivamente, em que cada animal foi considerado uma repetição. O tratamento C<sub>3</sub> consistiu-se dos animais que receberam uma dieta com sinal isotópico C<sub>3</sub> e o tratamento C<sub>4</sub> consistiu-se dos animais que receberam uma dieta com sinal isotópico C<sub>4</sub>.

### 2.2.2 Manejo, arração e cuidado com os animais

Os animais foram vacinados, desverminados e submetidos a período de adaptação de 14 dias com o objetivo de uniformizar a população ruminal dos mesmos e adaptação às instalações e ao manejo.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia e receberam água constante nos bebedouros automáticos. A dieta foi submetida a ajustes de quantidade diariamente, com base na quantidade de sobra nos cochos antes da primeira refeição e formulada segundo o sistema Cornell Net Carbohydrate and Protein System 5.0.40, nível 2 (CNCPS, 2000), esperando-se ganhos de peso diários de 1,500 a 1,600 kg/dia/animal.

O programa de alimentação foi dividido em quatro fases: Adaptação 1, Adaptação 2, Crescimento e Terminação, com a duração de 7, 7, 100 e 39 dias, respectivamente. A porcentagem de inclusão dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais e seus respectivos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  podem ser observados na tabela 3.

**Tabela 3.** Porcentagem de inclusão dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais e seus respectivos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (n=4).

<b>Dieta</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Adaptação 1 (7 dias)</b>	<b>Adaptação 2 (7 dias)</b>	<b>Crescimento (100 dias)</b>	<b>Terminação (39 dias)</b>
<b>C3</b>	Feno de aveia	44,72	34,91	25,35	15,04
	Farelo de trigo	31,04	37,22	41,90	48,36
	Farinha de mandioca	6,19	9,02	11,92	18,69
	Polpa citrica	8,67	9,60	11,82	15,04
	Farelo de amendoim	6,97	6,79	6,45	0
	Uréia	0,26	0,33	0,42	0,73
	Suplemento mineral	2,15	2,13	2,14	2,14
	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math> (‰)</b>	<b>-28,96‰ ± 1,07</b>	<b>-28,88‰ ± 0,91</b>	<b>-28,23‰ ± 0,83</b>	<b>-28,64‰ ± 1,01</b>
<b>C4</b>	Bagaço de cana	14,85	14,48	14,99	15,17
	Feno de Tifton	30,26	20,07	10,31	0
	Milho seco	8,33	11,21	16,85	22,50
	Milho úmido	24,77	34,06	37,74	47,46
	Farelo de amendoim	18,42	16,42	16,67	11,34
	Uréia	0,49	0,70	0,61	0,60
	Suplemento mineral	2,33	2,45	2,15	2,16
	Calcário	0,55	0,61	0,68	0,77
<b><math>\delta^{13}\text{C}</math> (‰)</b>	<b>-16,91‰ ± 1,02</b>	<b>-16,67‰ ± 1,09</b>	<b>-16,34‰ ± 0,95</b>	<b>-14,99‰ ± 0,98</b>	

### 2.2.3 Coletas e preparo dos tecidos

A substituição das dietas foi realizada no dia da entrada dos animais no confinamento e este, foi considerado o dia zero. Foram coletadas amostras de sangue nos dias: 0,1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 140, 153; e de fezes nos dias: 0,1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 21. A amostragem foi concentrada nos primeiros dias, devido à maior velocidade de troca do carbono.

As amostras de sangue foram coletadas pela veia jugular dos animais (30mL) e colocadas em tubos contendo EDTA. Em seguida, para retirada do plasma, o sangue passou pelo processo de centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. As amostras de sangue e plasma foram acondicionadas em micro tubos de 1,5mL e congeladas a -18°C até posterior mensuração isotópica.

Posteriormente, as amostras de sangue e plasma foram liofilizadas em aparelho Micromodulyo-115 (Edwardsvacuun®) onde foram secas á vácuo a -55°C e pressão de em torno 30  $\mu\text{HG}$  por 24 horas. Para a realização das análises isotópicas, as amostras de sangue e plasma liofilizadas foram colocados em cápsulas de estanho

(5mm x 3mm) e pesados (50-70 µg) em balança analítica de alta sensibilidade, com precisão de seis casas decimais.

As colheitas de fezes foram feitas diretamente na ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e congeladas a -18°C até posterior mensuração isotópica.

As amostras de fezes foram secas em estufa de ventilação forçada (Marconi - modelo MA 035) a 56°C por período de 48 horas. Posteriormente, foram moídas em moinho criogênico (Spex-modelo 6750 freezer/mill), a base de nitrogênio líquido (-196°C). Neste moinho, aproximadamente 2,0 g de amostra foram colocadas em frascos de policarbonato juntamente com uma barra magnética, o qual, devidamente fechado, foi imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a barra magnética, submetida ao campo magnético oscilante (15 impactos/s), pulverizou-se a amostra. A moagem compreendeu-se de primeira etapa de pré-congelamento de um minuto e segunda etapa de congelamento e pulverização de 3 minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que 60 µm (Licatti, 1997). Após moagem, foram pesadas entre 50 a 60 µg das amostras e acondicionadas em cápsulas de estanho para análise isotópica.

#### 2.2.4 Análise isotópica

Para determinação da composição isotópica das amostras foi utilizado o espectrômetro de massas DELTA-S (Finnigan Mat) acoplado ao Analisador Elementar EA 1108 CHN, do Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. Os resultados foram expressos em notação  $\delta^{13}\text{C}$ , em relação ao padrão *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \cdot 10^3 \quad (1)$$

Em que:

$\delta^{13}\text{C}$  = enriquecimento isotópico do carbono-13 da amostra relativo ao padrão internacional PDB. Adimensional.

R = razão isotópica ( $\text{C}^{13}/\text{C}^{12}$ ) da amostra e do padrão, respectivamente. Adimensional.

Os valores isotópicos do carbono-13 foram expressos em termos do padrão internacional, PeedeeBelemnite (PDB).

Para mensurar o *turnover* do carbono (substituição isotópica) nas fezes, plasma e sangue em determinado intervalo de tempo, foi utilizada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2 (DUCATTI et al., 2002), do software Origin® 6.0 Professional (MICROCAL SOFTWARE, 1999):

$$\delta^{13}\text{C} (t) = \delta^{13}\text{C} (f) + [\delta^{13}\text{C} (i) - \delta^{13}\text{C} (f)] e^{-kt} \quad (2)$$

Em que:

$\delta^{13}\text{C} (t)$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta^{13}\text{C} (f)$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C} (i)$  = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*) em dia<sup>-1</sup>

t = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

A meia-vida no tempo de substituição do <sup>13</sup>C, na condição de 50% da condição inicial e 50% da condição final, em t= T, foi calculada pela equação 3:

$$T = \ln 2/k \quad (3)$$

Em que:

T = meia-vida, em tempo (dias)

ln = logaritmo niperiano

k = constante da taxa de *turnover* no tecido, em dia-1

Para determinar o tempo de troca de 99% de átomos de carbono, foi utilizada a equação 4:

$$t = - \frac{1 \ln (1-F)}{k} \quad (4)$$

Onde:

t = tempo de troca do carbono

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo-1

F = fração de átomos trocados

As análises isotópicas foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP – Campus de Botucatu.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do período experimental (dia 0) o peso vivo médio dos bezerros foi  $236,67 \pm 16,62$  kg para o tratamento  $C_3$  e  $236,83 \pm 8,52$  kg para o tratamento  $C_4$ . O peso vivo final (dia 153) foi  $484,75 \pm 25,31$  kg para o tratamento  $C_3$  e  $447,17 \pm 22,40$  kg para o tratamento  $C_4$ .

Os valores do  $\delta^{13}C$  do sangue, plasma e fezes dos tratamentos  $C_3$  e  $C_4$  no início e no final do período experimental encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Média dos valores de  $\delta^{13}C$  das fezes, sangue e plasma dos tratamentos  $C_3$  e  $C_4$  no início e no final do período experimental (n=12 e n=6 para  $C_3$  e  $C_4$ , respectivamente).

Tecidos	Dia 0 (‰)	Dia 153 (‰)	Dia 0 (‰)	Dia 153 (‰)
	$C_3$	$C_3$	$C_4$	$C_4$
<b>Fezes</b>	$-17,70 \pm 0,80$	$-28,90 \pm 0,25$	$-17,46 \pm 0,73$	$-15,60 \pm 0,24$
<b>Sangue</b>	$-14,88 \pm 0,71$	$-24,77 \pm 0,23$	$-15,47 \pm 1,47$	$-15,97 \pm 0,50$
<b>Plasma</b>	$-14,91 \pm 0,89$	$-24,52 \pm 0,24$	$-15,50 \pm 0,73$	$-13,85 \pm 0,19$

No início do período experimental podemos observar (tabela 4) que os animais do tratamento  $C_3$  apresentavam valores médios de  $\delta^{13}C$  do sangue, plasma e fezes de  $-14,88‰$ ,  $-14,91‰$  e  $-17,70‰$ , respectivamente. Os valores apresentados se enquadram no intervalo de plantas  $C_4$ . Todavia, após 153 dias recebendo dieta exclusivamente  $C_3$ , os valores médios observados de  $\delta^{13}C$  do sangue, plasma e fezes foram de  $-24,77‰$ ,  $-24,52‰$  e  $-28,90‰$ , respectivamente, ou seja, tais mudanças reenquadram os novos valores apresentados no intervalo de plantas  $C_3$ .

Distinções semelhantes foram verificadas por Vieira Júnior (2013) que diferenciou sistemas de produção de bovinos de corte pela técnica da análise dos isótopos estáveis. Animais provenientes de confinamento, pasto e sistema superprecoce foram diferenciados pela diferença isotópica do  $\delta^{13}C$  no sangue.

De Smet et al. (2004), embora não tenham alcançado o patamar de equilíbrio isotópico com a substituição da dieta, os autores observaram clara distinção entre os tratamentos nas amostras de sangue total e plasma de touros jovens após 70 dias recebendo dieta com plantas  $C_3$  ou dieta mistas com plantas  $C_3$  e  $C_4$  (cerca de 59% de  $C_4$ ).

Bahar et al. (2008), estudaram o *turnover* do tecido muscular de bovinos (*Longissimus dorsi* e *Psoas major*), e ao substituírem a dieta de grãos inteiros de cevada ( $C_3$ ) por grãos de milho ( $C_4$ ), verificaram que o *turnover* do tecido não tinha sido completo após 168 dias de experimento, refletindo ainda o  $\delta^{13}C$  da antiga dieta.

Tais fatos foram possíveis devido à diferença existente no valor de  $\delta^{13}C$  entre as plantas  $C_4$  e  $C_3$ . Nas plantas  $C_4$ , o valor de  $\delta^{13}C$  varia de -9 e -16‰, dependendo da espécie e da parte da planta analisada, e nas plantas  $C_3$  este valor fica entre -22 e -34‰. Considerando-se a existência da diferença isotópica da ordem de 16‰ nos valores em  $\delta^{13}C$  entre as plantas do ciclo fotossintético  $C_3$  e  $C_4$ , pode-se caracterizar a dieta do animal pela análise isotópica do carbono dos tecidos (DUCATTI, 2004).

Os animais do tratamento  $C_4$  não apresentaram mudanças significativas nos valores médios de  $\delta^{13}C$  do sangue, plasma e fezes ao término do período experimental. Estes animais também se enquadraram no intervalo de plantas  $C_4$  no dia 0 porque apresentaram valores médios de  $\delta^{13}C$  do sangue, plasma e fezes de -15,47‰, -15,50‰ e -17,46‰, respectivamente. Mas, diferentemente do grupo  $C_3$ , os animais do tratamento  $C_4$  continuaram recebendo dieta  $C_4$  durante 153 dias e mantiveram o sinal isópico  $C_4$  nos tecidos e nas fezes. Ao término do período experimental os valores médios de  $\delta^{13}C$  do sangue, plasma e fezes para o grupo  $C_4$  foram -15,97‰, -13,85‰ e -15,60‰, respectivamente (Tabela 4).

De acordo com os resultados obtidos podemos afirmar que a análise da razão dos isótopos estáveis de tecidos animais e possíveis fontes de alimentos, pode prover uma ferramenta importante para a inferência das possíveis fontes dietéticas dos animais, além de fornecer suporte de cunho científico para os processos de autenticação de produtos cárneos, assegurando-lhes credibilidade.

No entanto, uma lacuna do conhecimento fundamental que pode confundir essa abordagem de processo de autenticação é a taxa de *turnover* dos diferentes tecidos bovinos. Por exemplo, a demora entre a troca de dieta e a manifestação nos diferentes tecidos dos bovinos pode ser potencialmente explorada de maneira fraudulenta, a fim de manipular a administração de dietas pré-abate por um tempo curto para a alegação de prêmios dados ao histórico de alimentação do animal durante o período inteiro de vida.

Por isso, é de suma importância a caracterização do *turnover* do carbono de diferentes tecidos bovinos. A escolha do tecido ou órgão animal para o estudo de *turnover* influencia nas conclusões na dieta, pois tecidos com rápido metabolismo indicam dietas recentes, enquanto aqueles com taxa de substituição lenta indicam

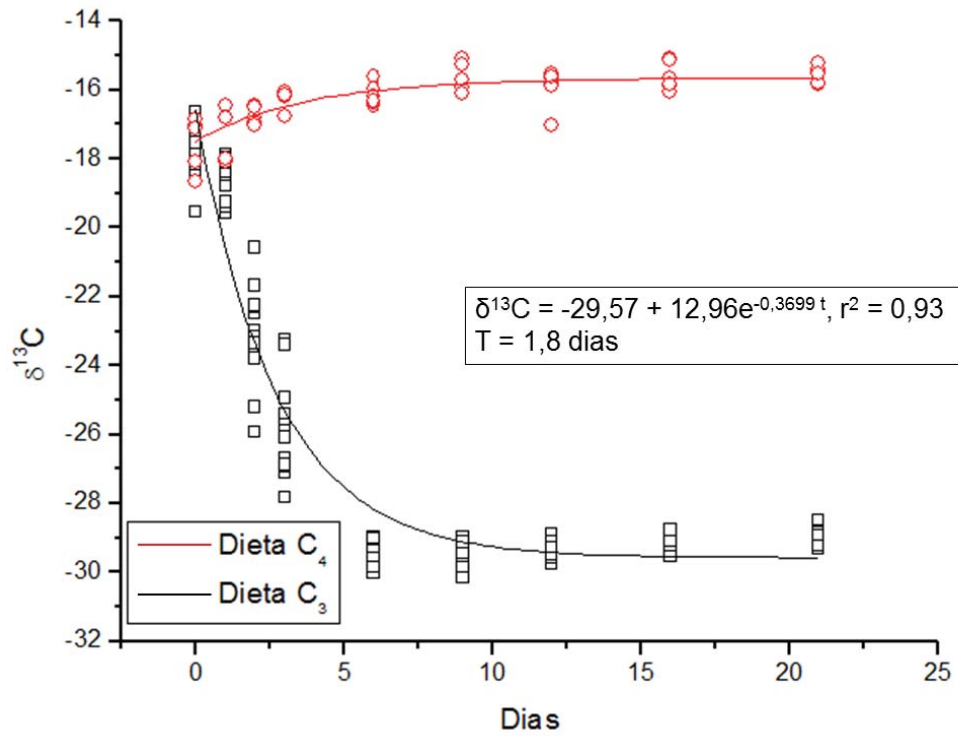
alimentos ingeridos anteriormente. A escolha do tipo de tecido para a análise isotópica depende, então, do objetivo da pesquisa (HOBSON e CLARK, 1992).

Este estudo de *turnover* utilizou as variações naturais do  $\delta^{13}\text{C}$  dos alimentos, com enfoque na velocidade de troca do carbono tecidual a partir da ingestão de alimentos com razões isotópicas distintas. Sendo assim, foi calculada a meia-vida do carbono nas fezes, sangue e plasma e o tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de Carbono somente para os animais do tratamento  $\text{C}_3$  (tabela 6), pois os animais tratamento  $\text{C}_4$  continuaram recebendo dietas de mesmo sinal isotópico ( $\text{C}_4$ ) do período pré-experimental, ou seja, não foi caracterizada a troca de sinal isotópico neste grupo de animais.

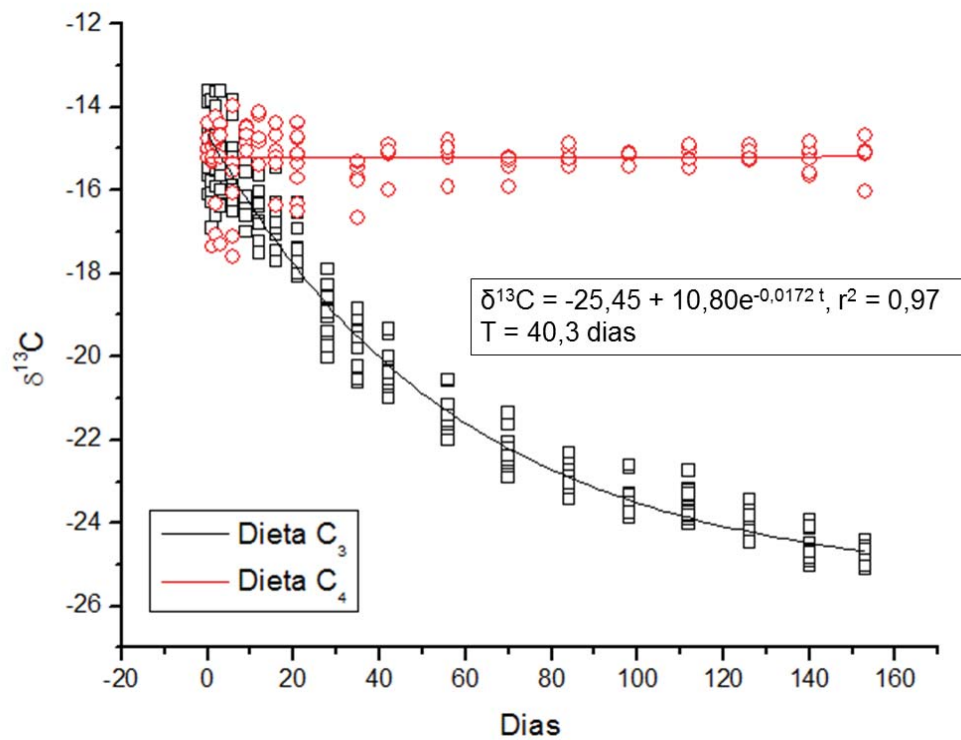
O comportamento da diluição isotópica nas fezes, sangue e plasma para os animais dos tratamentos experimentais  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  estão ilustrados nas Figuras 1, 2, e 3, respectivamente, e as equações exponenciais das diluições isotópicas em função do tempo para o tratamento  $\text{C}_3$  e seus respectivos coeficientes de determinação estão apresentados na tabela 5.

Os resultados de *turnover* obtidos foram explicitados pela função exponencial em função do tempo para as fezes, sangue e plasma. As equações geradas estão de acordo com os modelos propostos por Ducatti et al. (2002), e também por Zuanon et al. (2006) que afirmaram que o modelo pode ser utilizado para animais em crescimento, como foi o caso deste estudo.

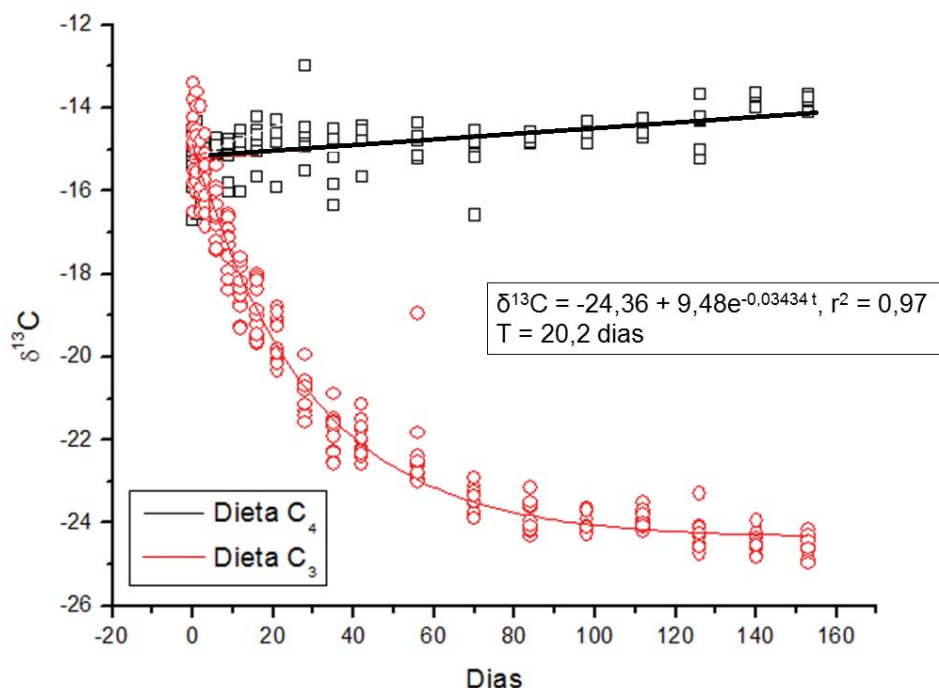




**Figura 1.** Curva de diluição isotópica do carbono das fezes em função do intervalo de avaliação.



**Figura 2.** Curva de diluição isotópica do carbono do sangue em função do intervalo de avaliação.



**Figura 3.** Curva de diluição isotópica do carbono do plasma em função do intervalo de avaliação.

**Tabela 5.** Equações exponenciais das diluições isotópicas em função do tempo, das fezes, sangue e plasma dos animais do tratamento C<sub>3</sub> com seus respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>).

Tecido	Equação	R <sup>2</sup>
Fezes	$\delta^{13}\text{C} = -29,57 + 12,96e^{-0,3699t}$	0,93
Sangue	$\delta^{13}\text{C} = -25,45 + 10,80e^{-0,0172t}$	0,97
Plasma	$\delta^{13}\text{C} = -24,36 + 9,48e^{-0,03434t}$	0,97

**Tabela 6.** Valores calculados da meia-vida (T) e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de Carbono (dias) das fezes, sangue e plasma e fezes dos animais do tratamento experimental C<sub>3</sub> a partir do dia de substituição das dietas.

Tecido	Meia-vida (dias)	99% de troca (dias)
<b>Fezes</b>	1,8	12
<b>Sangue</b>	40	267
<b>Plasma</b>	20	134

Observando as curvas de diluição isotópica das fezes, sangue e plasma para o tratamento C<sub>3</sub> (Figuras 1, 2 e 3 respectivamente), pode-se verificar que os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  alcançaram o novo patamar de equilíbrio isotópico, chegando os valores finais próximos aos valores isotópicos da dieta e que a mudança nos valores do  $\delta^{13}\text{C}$  no

plasma e sangue dos bovinos jovens ao longo do tempo ocorreu gradativamente, enquanto que a mudança nos valores do  $\delta^{13}\text{C}$  nas fezes ocorreu rapidamente.

A partir destes resultados, pode-se concluir que as amostras de plasma, sangue e fezes podem ser usadas para distinguir os bovinos alimentados com dieta  $\text{C}_3$  dos bovinos alimentados com dieta  $\text{C}_4$ .

Os valores de meia-vida fornecem indicativos de quão rapidamente estes carbonos foram incorporados no sangue e plasma ou trocados nas fezes. A expressão para a meia vida sugere que tecidos com meia vida curta (fígado, plasma) apresentam uma “alta velocidade” de metabolização ou incorporação dos isótopos estáveis no tecido em questão, e o inverso, como o caso do colágeno do osso, apresenta “baixa velocidade” de incorporação no tecido.

Para o tratamento  $\text{C}_3$ , a meia-vida dos átomos de carbono no sangue, plasma e fezes foram de 40, 20 e 1,8 dias, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Martins et al. (2012), que observou o tempo de substituição do  $\delta^{13}\text{C}$  das fezes de ovinos de 1,2 dias e 1 dia para as dietas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , respectivamente. Esse valor reflete a rapidez com que as fezes refletem a nova dieta, fato este associado a taxa de passagem da digesta pelo trato gastrointestinal.

Bahar et al. (2008), ao substituírem a dieta de bovinos de corte, de grãos de cevada ( $\text{C}_3$ ) por grãos de milho ( $\text{C}_4$ ), encontraram valores de meia vida do carbono da ordem de 151 e 134 dias para os músculos *Longissimus dorsi* e *Psoas major*, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Sponheimer et al., (2006) que encontraram valores de meia-vida de 179 dias nos tecidos de alpacas. Segundo Bahar et al. (2005), a composição do músculo esquelético é difícil de ser manipulada pela dieta em curto prazo, pois o turnover no músculo esquelético de bovinos é um processo lento. O músculo contém a informação isotópica de longo período de tempo, meses ou anos.

Lo Tierzo (2012) estudou o *turnover* de carbono nos tecidos de suínos em diferentes fases de crescimento e observou valores de meia-vida do carbono no sangue dos animais de 15,9; 19 e 16,8 dias para os tratamentos com substituição de dietas aos 21, 42 e 63 dias de idade, respectivamente.

O turnover de carbono mais lento nos músculos esqueléticos de grandes mamíferos, comparados aos pequenos, incluindo-se camundongos (24 dias) e gerbils (28 dias) (TIESZEN et al., 1983; MACAVOY et al., 2005) pode ser atribuído à grande massa corporal dos bovinos, porque animais maiores apresentam menores metabolismos gerais (SINGER et al., 1995).

Estes resultados mostraram que as fezes refletem mudanças na dieta em poucos dias. No entanto, ela não expressa os nutrientes incorporados ao tecido animal e fornece apenas indicativo do que foi ingerido pelo animal no curto prazo. Já parâmetros como o sangue, plasma e músculos podem indicar a antiga dieta incorporada por período mais longo. Portanto, a escolha do tecido a ser estudado deve levar em consideração o período que se quer avaliar.

Para o tratamento C<sub>3</sub>, os tempos de substituição de 99% dos átomos de carbono do plasma e fezes pelos da nova dieta foram de 134 e 12 dias, respectivamente. Ao término do período experimental, o sangue havia trocado 93% dos átomos de carbono no período de 153 dias. O valor calculado para 99% de troca dos átomos de carbono para o sangue foi de 267 dias.

Segundo Norman et al. (2009), o tempo de substituição de 95% do  $\delta^{13}\text{C}$  das fezes de ovinos ocorreu 6 dias após a mudança de uma dieta C<sub>3</sub> por dieta C<sub>4</sub>. Jones et al. (1979) observaram completo *turnover* nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de fezes em novilhos e vacas 6 dias após mudança de dieta C<sub>4</sub> para C<sub>3</sub>.

Martins et al. (2012), observou o tempo de substituição do  $\delta^{13}\text{C}$  das fezes de ovinos de 6,5 dias e 8,3 dias para as dietas C<sub>4</sub> e C<sub>3</sub>, respectivamente. Contudo, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do sangue não alcançaram o novo patamar de equilíbrio isotópico em 104 dias, indicando que houve troca mais lenta do carbono da nova dieta para este tecido.

Knobbe et al. (2006) encontraram valores do  $\delta^{13}\text{C}$  do leite e da urina, em vacas leiteiras, 10 dias após a mudança de dieta C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub> ( $\delta^{13}\text{C} = -19,9\text{‰}$ ) para C<sub>3</sub> ( $\delta^{13}\text{C} = -27,4\text{‰}$ ). Após mudança da alimentação de C<sub>3</sub> para C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  foram alcançados em 6 dias.

Estes estudos comprovam que a escolha do tecido ou órgão animal para o estudo de *turnover*, influencia nas conclusões sobre a dieta, pois tecidos com rápido metabolismo indicam dietas recentes, enquanto aqueles com taxa de substituição lenta indicam alimentos ingeridos anteriormente.

#### 4. CONCLUSÕES

Bovinos jovens Aberdeen Angus x Nelore alimentados com plantas  $C_3$  podem ser diferenciados de bovinos alimentados com plantas  $C_4$ . Diferenças analisadas entre as fezes, sangue e plasma demonstram que o tipo de tecido em estudo influencia o *turnover*, ou seja, a troca mais rápida ou mais lenta do carbono.

As fezes refletem mudanças na ingestão a curto prazo da dieta de bovinos, porém não expressa os nutrientes incorporados. Já o sangue e o plasma indicam a dieta incorporada por um período mais longo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES.

**Exportações de carne bovina do Brasil. 2012.** Disponível em:

< [http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=839#.UWCEV6LU\\_H1](http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=839#.UWCEV6LU_H1) >. Acesso em: 07 março. 2013.

BAHAR B, MONAHAN F.J, MOLONEY A.P, O'KIELY P, SCRIMGEOUR C.M, SCHMIDT O. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2005; 19:1937.

BAHAR, B.; MOLONEY, A.P.; MONAHAN, F.J.; HARRISSON, S.M. ZAZZO, A.; SCRIMGEOUR, C.M.; BEGLEY, I.S. and SCHIMDT, O. Turnover of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: Implications for isotopic authentication of meat. **Journal of Animal Science**, 2008; 87:905-913.

CNCPS - Cornell Net Carbohydrate and Protein System. The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrients excretion. Version 5.0. Ithaca, NY. p.37, 2000.

DeSMET, S.; BALCAEN, A.; CLAEYS, E.; BOECKX, P.;VAN CLEEMPUT, O. Stable carbon isotope analysis of different tissues of beef animals in relation to their diet. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v.18, p.1227-1232, 2004.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono – <sup>13</sup>C em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, v.59. n.1, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, 2004, 138p. (Apostila).

FRANCO, M. Especial rastreabilidade. **DBO Rural**, n. 255, p. 102-117, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal. 2011.** Disponível em:

<<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2241>>. Acesso em: 07 março. 2013.

JONES R.; LUDLOW M.; TROUGHTON J. Estimation of the proportion of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species in diet of animals from the ratio of natural <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v.18, p.91-100; v.92, p.91-100, 1979.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W. et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.386, p.104-108, 2006.

LICATTI, F. Isótopos estáveis do carbono (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) em plantas do ciclo bioquímico C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 1997, 65f. (Monografia).

LO TIERZO, V. *Turnover do carbono nos tecidos de suínos em diferentes fases de crescimento*. Botucatu, FMVZ/UNESP, 52p. **Tese de Doutorado**, 2012.

MACAVOY, S.E., MACKO, S.A. AND ARNESON. L.S. Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. **Canadian Journal of Zoology**, 83:631–641. 2005.

MACDANIEL, H.A.; SHERIDAN, M.K. Rastreabilidade de animais y productos de origen animal. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties, Paris**, v. 20, n. 2, 2001.

MACHADO, J.G. de C.F.; NANTES, J.F.D. Avaliação de um sistema de identificação eletrônica de animais na rastreabilidade de informações. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 13-21,2001.

MARTINS, M.B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; DENADAI, J.C.; NATEL, A.S.; SOUZA-KRULISKI, C.R.; SARTORI, M.M.P. Stable isotopes for determining carbon turnover in sheep feces and blood. **Livestock Science**, v.149, p. 137-142, 2012.

NORMAN, H.C.; WILMOT, M.G.; THOMAS, D.T. et al. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C<sub>3</sub> annual pastures and saltbush or C<sub>4</sub> perennial grasses. **Livestock Science**, v.121, p.162-172, 2009.

PRACHE, S. Diet authentication in sheep from the composition of animal tissues and products. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.362-370, 2009. (supl. Especial)

SINGER, D., SCHUNCK, O., BACH, F., AND KUHN. H-J. Size effects on metabolic rate in cell, tissue, and body calorimetry. **Thermochimica Acta**, v.251, p.227–240.1995.

SPONHEIMER, M., ROBINSON, T.F., CERLING, T.E., TEGLAND, L., ROEDER, B.L., AYLIFFE, L., DEARING, M.D. AND EHLERINGER. J.R. Turnover of stable carbon isotopes in the muscle, liver, and breath CO<sub>2</sub> of alpacas (*Lama pacos*). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 20:1395–1399, 2006.

TIESZEN, L.L., BOUTTON, T.W., TESDAHL, K.G. AND SLADE. N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for delta C analysis of diet. **Oecologia**, 57:32–37. 1983.

VIEIRA JÚNIOR, L.C. Diferenciação de sistemas de produção de bovinos de corte pela técnica da análise dos isótopos estáveis. Botucatu, FMVZ/UNESP, 68p. **Tese de Doutorado**, 2013.

ZUANON, J.A.S.; PEZZATO, A.C.; PEZZATO, L.E.; PASSOS, J.R.S.; BARROS, M.M.; DUCATTI, C. Muscle  $\delta^{13}\text{C}$  change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects of growth and carbon turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.145, p.101-107, 2006.





### **CAPÍTULO 3**

## IMPLICAÇÕES

Interferências no histórico de dietas de bovinos de corte são possíveis de serem detectadas a partir da técnica de isótopos estáveis. Entretanto, é necessário determinar o período que se quer analisar para poder escolher o tecido mais adequado para análise.

A partir dos resultados obtidos, ficou clara a viabilidade da técnica dos isótopos estáveis como ferramenta de rastreabilidade bovina. Esta técnica pode ser utilizada como complemento aos programas de rastreabilidade de carne bovina já existentes, pois proporciona suporte de cunho científico, garantindo resultados seguros e confiáveis que não podem ser assegurados através das metodologias analíticas convencionais.

Entretanto, a aplicabilidade desta técnica na rastreabilidade da carne bovina no Brasil ainda está distante. A utilização dos isótopos estáveis como ferramenta aplicada em estudos para ruminantes é muito recente, por isso, outros estudos são necessários para contribuir com o desenvolvimento desta técnica. Sugere-se estudos metodológicos que avalie o *turnover* do carbono-13 de outros tecidos, categorias animais, sistemas de produção e épocas do ano.