

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

RASTREABILIDADE DA CAMA DE AVIÁRIO POR ISÓTOPOS
ESTÁVEIS EM BOVINOS LEITEIROS

MARCO ANTÔNIO GONZALES DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre

BOTUCATU - SP
JUNHO - 2015

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

RASTREABILIDADE DA CAMA DE AVIÁRIO POR ISÓTOPOS
ESTÁVEIS EM BOVINOS LEITEIROS

MARCO ANTÔNIO GONZALES DE CARVALHO
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ducatti
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Célia Denadai

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre

BOTUCATU - SP
JUNHO - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Carvalho, Marco Antônio Gonzales de.

Rastreabilidade da cama de aviário por isótopos estáveis em bovinos leiteiros / Marco Antônio Gonzales de Carvalho. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Ducatti

Coorientador: Juliana Célia Denadai

Capes: 50400002

1. Ruminante - Alimentação e rações. 2. Isótopos estáveis. 3. Leite - Proteínas. 4. Sangue - Análise e química. 5. Cama de galinha. 6. Bovino de leite.

Palavras-chave: isótopos estáveis; leite; rastreabilidade; ruminantes; sangue; cama de frango.

DEDICATÓRIA

A DEUS, por proporcionar a vida, e por todas as bênçãos concedidas, especialmente
minha família.

A MEUS PAIS, Tânia Maria Santarém Gonzales e Carlos Augusto Rosa por todo apoio
e amor.

A MEU PAI, Júlio Lourenço Ribeiro de Carvalho por todo apoio e amor.

A MEUS IRMÃOS, Júlio Augusto Gonzales de Carvalho, Marina Gonzales de
Carvalho, Vinícius Gustavo Rosa, Gabriela Doninho Rosa, Thiago Moya de Carvalho,
Tamires Moya de Carvalho e Sebastian Moya de Carvalho, pelo amor e carinho.

A MEUS AVÓS E TODA MINHA FAMÍLIA, especialmente à minha avó Clayde
Catharina Pinheiro de Carvalho (*in memoriam*), pela convivência, amor e carinho.

A MINHA NOIVA, Adriele Nayara Dias Ishizuka pelo amor e companheirismo, e por
ser tão especial em minha vida.

AOS ANIMAIS, especialmente à Aratana e Kate Blue, e às vacas leiteiras que
participaram desse projeto: Banana, Chifrinha, Dilma, Formiga, Mococa, Vermelha,
Canária, Morgana, Negona, Solteira, Ursa e Valdirene.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de Mestrado e à FAPESP pelo auxílio financeiro (projeto temático n° 2008/57411-4) concedidos para execução do projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP-Botucatu, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, pela orientação, confiança e conselhos.

À Profa. Dra. Juliana Célia Denadai, pela coorientação, confiança, e apoio no ingresso e desenvolvimento do Mestrado.

À Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pelos conselhos, análises estatísticas e ensinamentos.

À Profa. Dra. Cyntia Ludovico Martins pela doação da silagem de grão úmido de milho e disponibilização de pessoal.

Ao Prof. Dr. André Mendes Jorge, por disponibilizar o Setor de Bubalinos e permitir as adaptações necessárias à realização do projeto.

Ao Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto pelos conselhos.

Ao Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos e ao pessoal do Setor de Gado de Leite pelo auxílio na destinação do leite e disponibilização de pessoal.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Factori, pela formulação das dietas experimentais e ensinamentos.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e à Coordenação da Raiva dos Herbívoros e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, pela autorização da execução do projeto através da Informação CRHE n° 79/2013, referente ao processo n° 21052.009187/2013-02.

Aos Fiscais Federais Agropecuários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Jean Guilherme Fernandes Joaquim, Juliana do Amaral Moreira C. Vaz, e Elaine Fátima de Sena, e ao diretor do Escritório de Defesa Agropecuária de Botucatu, Francisco Pereira Neto, pelo apoio técnico e acompanhamento do projeto.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da FMVZ, Seila Cristina Cassineli, Ellen Cassemiro Guilhen e Carlos Pazini, pela atenção e auxílios prestados.

Aos colaboradores do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais IBB/UNESP, Cibele Regina de Souza-Kruliski, Evandro Tadeu da Silva, Juliana Célia Denadai,

Maria Márcia Pereira Sartori, Mariana Sasso Andreasi e Silvia Américo Maschette pela ajuda e paciência.

A José Guilherme Ishizuka, Lindalva Dias e Jorge Ishizuka, pelo apoio e carinho.

A Francisco Javier Pastor López, Natália Mitiko Aono, e Dona Isabel Silvério pelo convívio e amizade.

A Felipe Antônio Parise e Rodrigo da Silva Gennari pelo auxílio na execução do projeto piloto.

A Tiago Leiva, pelo auxílio em todas as etapas do projeto, desde a aquisição até a destinação final dos animais.

À Adriele Nayara Dias Ishizuka, Calebe dos Santos, Matheus Betelli Piccolo e Rodrigo da Silva Gennari pelo auxílio diário no manejo dos animais e condução do experimento, e aos demais colaboradores: Ana Paula Danti Bueno, Anna Julia Stecca Tavernaro, Antônio Marcos Silvestre, Diogo Wittingham da Silva, Felipe Augusto Pereira Dal Farra, Guilherme Baptistella, Isabela Garcia Coccato, Isabella Goulart Oliveira da Silva, Ramon Rizzieri, Leonardo Vieira Santos, Luana Forte Raposo, Lucas José da Silva, Lucas Parra, Marcela Checco, Matheus Zorzetto Ferreira e Natália Mitiko Aono.

Aos funcionários da Fazenda Experimental Lageado, Cidão, Carlinho, Desidério, Lipi e Liu.

À equipe da Clínica de Grandes Animais do Departamento de Clínica Veterinária: funcionários César Leme da Silva e Marcos Antônio S. da Silva, residentes Natália Moraes Dias, Paula Casado Dias Pires, Bianca Ribeiro de Souza e Danilo G. A. de Andrade, pela realização da eutanásia dos animais.

À equipe da Patologia do Departamento de Clínica Veterinária: funcionários Maury Raul e Claudinei Domingues, residentes Juliano Nóbrega, Mônica Regina de Matos e Juan Carlos Ramirez Ante, e ao Prof. Dr. Alexandre Hataka, pelo auxílio no descarte das carcaças dos animais.

Aos amigos do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais IBB/UNESP, Adriele Nayara Dias Ishizuka, Ana Cristina Stradiotti, Bárbara Cristina da Silva Fernandes, Danilo Vanci Fernandez, Guilherme Emygdio Mendes Pimenta, Luciane Seraphim, Marcela Buosi Martins, Michelle Ravelli, Natália Mitiko Aono, Priscila Cavalca de Araújo, Renata Sena, Rhani Ducatti, Rodrigo da Silva Gennari, Thatiane Mendes Mitsunaga, Vanessa Cristina Pelícia, e Vânia Fornou.

E a todos que contribuíram neste projeto, muito obrigado!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. Revisão de literatura.....	2
1.1. Panorama do leite.....	2
1.2. Cama de aviário	3
1.3. Isótopos estáveis em bovinos leiteiros.....	6
1.4. Justificativa e objetivos.....	13
2. Referências bibliográficas.....	14
CAPÍTULO 2 ISÓTOPOS ESTÁVEIS NO LEITE: RASTREABILIDADE DA CAMA DE AVIÁRIO UTILIZADA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES	21
Resumo.....	22
Abstract	23
1. Introdução	24
2. Materiais e métodos	25
3. Resultados e discussão	28
4. Conclusões	33
5. Referências.....	42
CAPÍTULO 3 RASTREABILIDADE DA CAMA DE AVIÁRIO EM BOVINOS LEITEIROS PELA ANÁLISE MULTI-ISOTÓPICA DE SANGUE E FEZES.....	44
Resumo.....	45
Abstract	46
1. Introdução	47
2. Materiais e métodos	48
3. Resultados e discussão	51
4. Conclusões	55
5. Referências.....	64
CAPÍTULO 4 IMPLICAÇÕES	66
1. Implicações	67
ANEXO 1.....	69
ANEXO 2.....	70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composição percentual, valor isotópico (n=3) e desvio padrão das dietas experimentais	26
Tabela 2	Cronograma de dietas fornecidas durante período experimental.....	27
Tabela 3	Valores isotópicos médios (n=6) e desvio padrão do leite e suas frações, de vacas leiteiras alimentadas ou não com cama de aviário	30
Tabela 4	Valores de participação das razões isotópicas de carbono, nitrogênio, oxigênio e deutério no primeiro e segundo componente das análises de componentes principais do leite e suas frações.....	31

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Composição percentual, valor isotópico (n=3) e desvio padrão das dietas experimentais	48
Tabela 2	Cronograma de dietas fornecidas durante período experimental.....	49
Tabela 3	Valores isotópicos médios (n=6) e desvio padrão do sangue e suas frações, e das fezes de vacas leiteiras alimentadas ou não com cama de aviário	53
Tabela 4	Valores de participação das razões isotópicas de carbono, nitrogênio, oxigênio e deutério, no primeiro e segundo componente das análises de componentes principais do sangue, soro, plasma e fezes.....	54

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Fig. 1.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e hidrogênio ($\delta^2\text{H}$), do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....34
- Fig. 2.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo período experimental) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....35
- Fig. 3.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....36
- Fig. 4.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....37
- Fig. 5.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da proteína do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....38

- Fig. 6.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da proteína do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90)..... 39
- Fig. 7.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da gordura do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90)..... 40
- Fig. 8.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da gordura do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).... 41

CAPÍTULO 3

- Fig. 1.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do sangue coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90) 56
- Fig. 2.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do sangue coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90)..... 57

- Fig. 3.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro sanguíneo coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....58
- Fig. 4.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro sanguíneo coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....59
- Fig. 5.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do plasma sanguíneo coletado nos dias 1, 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....60
- Fig. 6.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do plasma sanguíneo coletado nos dias 1, 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....61
- Fig. 7.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), das fezes coletadas nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....62
- Fig. 8.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), das fezes coletadas nos dias 55 e 90,

de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).....	63
--	----

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Revisão de literatura

1.1. Panorama do leite

O leite é o produto proveniente da ordenha de vacas sadias, sendo aquele oriundo de outros animais denominado de acordo com a espécie procedente (BRASIL, 1952). É considerado um dos alimentos mais completos, pois apresenta alto valor biológico, devido à composição equilibrada de nutrientes e sua fácil metabolização (TRONCO, 2008).

Além da presença de vitaminas e de todos os minerais biologicamente importantes, como o cálcio e o fósforo, contém diversos aminoácidos essenciais aos seres humanos (TRONCO, 2008). Somadas às suas propriedades nutricionais, o leite ainda contém elementos anticarcinogênicos, como o ácido linoleico conjugado, a esfingomiéline, o ácido butírico, o β caroteno e as vitaminas A e D (MÜLLER, 2002).

A produção mundial de leite aumentou em 20% de 2004 a 2013, crescendo a uma média de 2% ao ano (FAO, 2013). Além do consumo *in natura*, o leite é utilizado na fabricação de pães, bolos, massas e diversos produtos alimentícios, principalmente os derivados lácteos, como queijos, iogurtes, creme de leite e manteiga, favorecendo o consumo.

Atualmente, os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de leite, seguidos pela China e Índia. O Brasil ocupa a 4ª posição, com 5,4% da produção (FAO, 2013), tendo contribuído no ano de 2012 com aproximadamente 32,3 bilhões de litros, dos quais 69,1% foram adquiridos por estabelecimentos inspecionados (IBGE, 2012). Dentre os estados brasileiros destacam-se Minas Gerais, na primeira colocação, seguido pelo Rio Grande do Sul e Paraná. O estado de São Paulo é o sexto produtor, responsável por 5,2% da produção nacional (IBGE, 2012).

Em contrapartida, o interesse dos consumidores em conhecer a origem do leite e ter uma garantia da sua qualidade também aumentou, sendo estimulado pelos recentes casos de contaminação ocorridos nesse alimento. Em 2012, produtos lácteos fabricados pela maior exportadora mundial de lácteos, localizada na Nova Zelândia, estavam contaminados por bactérias patogênicas (HON; LEUNG, 2014). No ano de 2008 houve adulteração com melamina do leite em pó produzido na China e distribuído nesse país e

na Europa, contaminando mais de 290.000 chineses, dentre os quais 56.000 crianças adoeceram (XIU; KLEIN, 2010). O impacto na economia chinesa foi estimado em 3 bilhões de dólares, ocasionando ainda a perda de 200.000 vagas de emprego, além de diminuir a confiança dos consumidores nos alimentos chineses (BÁNÁTI, 2011).

No Brasil, entre os anos de 2012 e 2014, houve diversas denúncias de adulterações no leite, que teriam sido realizadas por laticínios localizados nos Estados do Rio Grande Sul e de Santa Catarina (BRASIL, 2014). As análises e fiscalizações realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, indicaram o peróxido de hidrogênio, a soda cáustica, o álcool etílico e o citrato como possíveis adulterantes utilizados (BRASIL, 2014).

Após identificação das amostras foi realizada a rastreabilidade dos lotes fraudados, sendo constatado que o leite adulterado foi processado por grandes laticínios dos estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Espírito Santo, o que demonstra a dificuldade em controlar a qualidade desse produto e garantir um alimento seguro ao consumidor. Além dos adulterantes citados, também podem ser adicionados água e sal, caseinomacropéptídeos, neutralizantes e reconstituintes.

Paralelamente à adulteração direta do leite, com o intuito de ampliar os lucros, o uso de alimentos proibidos na alimentação das vacas leiteiras também tem ocorrido o que pode ser considerado um método de fraude, que é o uso da cama de aviário nas dietas desses animais.

1.2. Cama de aviário

A cama de aviário é o produto resultante da criação de frangos de corte em galpões, forrados geralmente com um material higroscópico, como a maravalha, pó de pinus, casca de amendoim ou casca de arroz, a fim de absorver a umidade resultante dos dejetos desses animais, e a água que porventura cai dos bebedouros. Também pode conter restos de ração animal e até mesmo frangos inteiros ou partes destes. Em granjas comerciais, a cama de aviário é reutilizada diversas vezes até ser descartada.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, tendo produzido 12,9 milhões de toneladas em 2013 (FAO, 2013). Considerando uma geração de 4,98 kg de cama de aviário por frango alojado (USDA, 2009), e que o Brasil alojou

6,2 bilhões de pintos de corte em 2014 (CONAB, 2015), a produção anual de cama de frango é estimada em 30,9 milhões de toneladas. Dentre os estados brasileiros, São Paulo tem grande participação nesse montante, pois contém o segundo maior efetivo nacional de galináceos.

Devido à grande disponibilidade e baixo custo desse resíduo em regiões produtoras de frango, e pela dificuldade de uma destinação correta, a cama de aviário era amplamente utilizada na alimentação de ruminantes. Além disso, pode conter mais de 20% proteína bruta, proporcionando em condições específicas, a diminuição nos custos com alimentação do rebanho (PEREIRA et al., 2003; RODRIGUES FILHO et al., 2002).

Apesar dessa vantagem econômica, a cama de aviário pode carrear sérios problemas de saúde aos animais, como o botulismo (DUTRA; DÖBEREINER; SOUZA, 2005; KRÜGER et al., 2012) que pode afetar o ser humano (LINDSTRÖM et al., 2010), e a encefalopatia espongiiforme bovina (EEB) (HUESTON, 2013), existindo evidências da associação da EEB com a encefalopatia espongiiforme transmissível denominada variante da doença de Creutzfeldt-Jacob, relatada em humanos que ingeriram carne de bovinos infectados pela EEB, caracterizando-se como zoonose (GOTELIPE, 2006).

A EEB teria sido originada a partir da alimentação de ruminantes com produtos animais contaminados com o agente infeccioso, os príons, que são formas alteradas de proteína com membrana de funções desconhecidas, resistentes à ação de enzimas (proteases) (GOTELIPE, 2006). A forma normal dessa proteína está presente na maioria das membranas plasmáticas das células, principalmente no sistema nervoso central. Os príons induziriam a conversão da proteína normal na forma alterada (GOTELIPE, 2006), afetando o sistema nervoso e causando alterações no comportamento dos animais, por isso a doença ficou conhecida como “mal da vaca louca”.

A doença da vaca louca descoberta no Reino Unido, em 1986, acometeu principalmente o gado leiteiro, e constatou-se que o principal veículo de infecção era a farinha de carne e ossos, pois devido à alta exigência nutricional o rebanho leiteiro era alimentado com dietas contendo altos teores dessa farinha, para suprir as necessidades proteicas (SMITH; BRADLEY, 2003). Como a cama de aviário pode conter resíduos de farinha de carne e ossos bovinos em sua composição, devido à presença de restos da

ração fornecida aos frangos, que geralmente é formulada com esse tipo de farinha, a cama de aviário pode carrear o mal da vaca louca.

Após a crise da vaca louca e os surtos de gripe aviária no Japão, Rússia e Europa, a utilização de subprodutos de aves na alimentação de animais ficou mais restrita. Com o aumento dessas doenças, o receio dos consumidores quanto à segurança sanitária dos alimentos levou os países a implantarem novas barreiras e leis para assegurar a confiança dos mercados consumidores.

Devido às pressões do mercado internacional, o uso de algumas proteínas provenientes de mamíferos na alimentação de ruminantes foi proibido na Europa pelo Regulamento (CE) n° 999/2001 (PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO, 2001), e no Brasil pela Instrução Normativa n° 08 (BRASIL, 2004), com o intuito de prevenir, controlar e erradicar determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis, ficando proibido o uso da cama de aviário nas dietas de ruminantes. Posteriormente, também foi proibida a alimentação de animais terrestres de uma determinada espécie, com proteínas animais derivadas de animais da mesma espécie (PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO, 2009).

No Brasil foram constatados dois casos não clássicos da doença da vaca louca nos Estados do Paraná e Mato Grosso nos anos de 2010 e 2014, respectivamente (BRASIL, 2012; 2014). No entanto como os casos foram considerados atípicos, ou seja, ocorreram de forma esporádica e espontânea, sem relação com a ingestão de alimentos contaminados, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) manteve o status do Brasil de risco insignificante para a EEB (OIE, 2014).

Visto que o Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina e carne de frango e o quarto produtor de leite (FAO, 2013), além dos riscos sanitários, a ocorrência de um caso clássico de vaca louca poderia ocasionar embargos à importação de produtos pecuários brasileiros, gerando perdas econômicas, como ocorridas no Reino Unido que sofreu um prejuízo de US\$ 10 bilhões após a crise da vaca louca (BÁNÁTI 2011).

No Brasil, há evidências do uso da cama de aviário como alimento a ruminantes (PEREIRA; DUTRA, 2012). Atualmente, a identificação dessas irregularidades é confirmada quando os animais tem acesso à cama de aviário pura ou associada a outros alimentos, sendo necessária a confirmação da presença de penas ou

outros indícios de resíduos animais na dieta, pelos métodos oficiais de PCR (reação de polimerização em cadeia) ou microscopia eletrônica (COMISSÃO EUROPEIA, 2013). Isso causa dificuldades na autuação do proprietário do animal quando não são encontrados esses vestígios na alimentação fornecida, visto que alguns criadores fornecem a cama de aviário aos animais no período noturno, quando não há fiscalização.

Com isso, é necessário buscar novas tecnologias, que deem suporte à fiscalização da qualidade dos produtos e evitem o uso de práticas ilegais, que colocam em risco a saúde do consumidor e a economia nacional. Dessa forma, é necessária uma técnica que possibilite detectar o uso dessa substância ilícita na alimentação animal através da análise do leite ou de outras substâncias retiradas do animal, diminuindo as possibilidades do infrator burlar a fiscalização.

1.3. Isótopos estáveis em bovinos leiteiros

Uma alternativa promissora para identificar a origem e qualidade de produtos de origem animal e vegetal é a técnica dos isótopos estáveis (CARRIJO et al., 2006), podendo ser utilizada como ferramenta nos estudos de rastreabilidade (MARTINS et al., 2012). Apesar do uso dessa técnica em diversas pesquisas de rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de aves (CARRIJO et al., 2006; DENADAI et al., 2008, 2009; KANAYAMA et al., 2012; MÓRI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010), são escassos os estudos na área de ruminantes.

Isótopos estáveis são átomos do mesmo elemento químico, que possuem o mesmo número atômico (Z), ou número de prótons. Como os átomos são dispostos na tabela periódica pelo número atômico, os isótopos estáveis são aqueles que ocupam o mesmo (ISO) lugar (TOPOS) na tabela, e são estáveis por não emitirem radiação, podendo ser utilizados como marcadores naturais em estudos científicos, sem riscos à saúde.

O núcleo dos átomos é constituído de nêutrons (N) e prótons (Z), enquanto os elétrons estão dispostos ao redor do núcleo, na eletrosfera. A diferença entre os isótopos está no núcleo, por possuírem número de nêutrons distintos, o que lhes confere diferente número de massa (A), pois $A=Z+N$. Por ser um sistema eletricamente neutro, os átomos

tem o número de elétrons idêntico ao número de prótons, o que atribui aos isótopos eletrosferas idênticas, e como as reações químicas ocorrem na eletrosfera, os isótopos de um mesmo elemento não são diferenciados pelas membranas celulares.

A eletrosfera determina o comportamento químico do átomo, enquanto o núcleo é responsável pelas suas propriedades físicas. Por isso, os isótopos estáveis de um mesmo elemento têm propriedades químicas semelhantes e propriedades físicas diferentes, o que permite a discriminação isotópica pelo espectrômetro de massa, que separa os átomos e moléculas de acordo com suas massas, cargas e movimentos em campos elétricos e magnéticos (HOEFS, 2009).

A ocorrência natural dos isótopos estáveis na biosfera, litosfera, hidrosfera e atmosfera (DUCATTI, 2007) contribuiu para a ampla gama de utilização dessa ferramenta nas diversas áreas do conhecimento, como a paleontologia (RAMÍREZ, 2012), arqueologia (SALGAN et al., 2012), oceanologia (QUIJANO et al., 2012), hidrogeologia (MONGELLI et al., 2013), aquicultura (DUCATTI, 2007), ecologia (PEREIRA, 2007), e entre outras também está a aplicação na zootecnia (DUCATTI et al., 2011).

Os elementos de principal interesse são o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre (CHON'S), pois estão presentes nos compostos biológicos (carboidratos, lipídeos, proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos) (DUCATTI et al., 2011). Dentre as diversas linhas de pesquisa com aplicação da técnica de isótopos estáveis na zootecnia, exemplifica-se os estudos da preferência alimentar dos animais (MARTINS, 2010), estimativa da idade de desmame de ruminantes (SILVA et al., 2010), distinção dos diversos sistemas de produção de carne (YANAGI et al., 2012), certificação da origem geográfica da carne (SUN et al., 2012), do leite (CRITTENDEN et al., 2007), de produtos lácteos (CAMIN et al., 2012) e na rastreabilidade da dieta animal pela análise do leite (RENOU et al., 2004).

Apesar dos isótopos estáveis serem traçadores potenciais no leite (PRACHE et al., 2005), são escassos os estudos quanto à rastreabilidade de dietas contendo subprodutos de origem animal na alimentação do gado leiteiro, pela análise isotópica do leite e dos produtos lácteos, sendo os isótopos de carbono e nitrogênio considerados ótimos indicadores para correlacionar os produtos de origem animal com o seu ambiente de criação (SUN et al., 2012).

Naturalmente, existem dois ou mais isótopos estáveis dos átomos de interesse, sendo o átomo mais leve de maior abundância, como ocorre para o carbono e o nitrogênio que possuem dois isótopos estáveis, ^{12}C e ^{13}C , e ^{14}N e ^{15}N , respectivamente.

A distribuição isotópica nos animais é geralmente relacionada à composição isotópica da dieta, sendo que para o carbono e o nitrogênio ocorre o enriquecimento do isótopo pesado nos animais em relação às suas dietas (PETERSON; FRY, 1987), o que torna o isótopo estável do carbono-13 e do nitrogênio-15 excelentes traçadores em variação natural (DUCATTI et al., 2011).

A razão do enriquecimento isotópico de uma amostra em relação ao seu padrão é denominada variabilidade isotópica, e pode ser estimada através do animal como um todo, ou individualmente pelos seus tecidos e compostos bioquímicos. A variabilidade isotópica dos elementos é calculada pela equação 1 (PETERSON; FRY, 1987):

$$\delta x(\text{amostra}, \text{padrão}) = \left[\left(\frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} \right) - 1 \right] \quad (1)$$

Na qual:

- $\delta x(\text{amostra}, \text{padrão})$ é o enriquecimento da razão isotópica do elemento de uma amostra em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil (‰).

- R é a razão isotópica do isótopo pesado em relação ao leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$) da amostra e do padrão, respectivamente.

O padrão utilizado para o carbono é o Peedee Belemnite (PDB), um carbonato sólido de Belemnitela da era cretácea, Belemnitela americana, da formação Peedee da Carolina do Sul, que produz CO_2 quando reagido com 100% H_3PO_4 a $25,2^\circ\text{C}$ (CRAIG, 1957). Os valores isotópicos do ^{13}C são expressos em delta per mil ($\delta^{13}\text{C}$) da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do produto em relação ao padrão.

A principal diferenciação isotópica do carbono-13 ocorre pela distinção nos processos de fotossíntese das plantas C_3 (arroz, aveia, trigo, leguminosas, gramíneas temperadas) e C_4 (milho, cana-de-açúcar, gramíneas tropicais), onde o primeiro composto orgânico a ser sintetizado é o ácido carboxílico, com três e quatro átomos de carbono, respectivamente. Durante a captação de CO_2 e produção de carboidratos, as plantas C_3 incorporam mais carbono-12 do que carbono-13, em comparação às plantas C_4 , o que torna a composição de $\delta^{13}\text{C}$ das plantas C_3 mais leve que as C_4 , com valores médios de -28‰ e -13‰ para as plantas C_3 e C_4 , respectivamente (SUN et al., 2011).

A variabilidade isotópica do nitrogênio é expressa em delta per mil ($\delta^{15}\text{N}$) da razão isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ do produto em relação ao padrão internacional, o ar atmosférico, que é bem homogeneizado, com uma composição isotópica constante a 0‰ (FRY, 2006). Nas plantas a diferenciação da razão isotópica do nitrogênio ocorre de acordo com o tipo da fonte de nitrogênio utilizada, não sendo interferido pelo ciclo fotossintético, como no carbono (DUCATTI et al., 2011).

As plantas que possuem em suas raízes bactérias fixadoras de nitrogênio, como a maioria das leguminosas, utilizam o N_2 do ar atmosférico como fonte de fixação, tendo a razão isotópica muito próxima ao padrão (DUCATTI et al., 2011). Como os processos de absorção de nitrogênio causam pouco fracionamento isotópico, a razão isotópica de plantas não fixadoras, como as gramíneas, geralmente refletem a assinatura das fontes de nitrogênio (SUN et al., 2011), sendo os valores de $\delta^{15}\text{N}$ influenciados pelas condições do solo, tipo de clima e intensidade do uso agrícola (KORNEXL et al., 1997).

As plantas cultivadas em solos adubados com fertilizantes industrializados tendem a menores valores de $\delta^{15}\text{N}$ em relação àquelas cultivadas em solos ricos em matéria orgânica ou adubados com fertilizantes orgânicos, pois os adubos industrializados são fabricados a partir do nitrogênio atmosférico, possuindo valores de $\delta^{15}\text{N}$ próximos a 0‰, enquanto a matéria orgânica possui valores próximos a 10‰ (KENDALL; DOCTOR, 2005).

Os valores de ^{15}N nos animais também reflete a composição das suas dietas, com um enriquecimento de 2 a 4‰ em cada nível trófico, devido ao fracionamento isotópico associado com o metabolismo catabólico (EHLERINGER; RUNDEL; NAGY, 1986). O enriquecimento em relação à dieta deve-se principalmente a maior excreção do isótopo leve na urina, sendo o animal e as fezes enriquecidos em ^{15}N (PETERSON; FRY, 1987).

Os isótopos de hidrogênio e oxigênio também são utilizados nos estudos animais, e devido a estarem sujeitos a processos de fracionamento como evaporação, condensação e precipitação, que tem forte ligação com a latitude, tem sido empregados principalmente em pesquisas de certificação de origem geográfica de produtos (DUCATTI et al., 2011) como o azeite de oliva (CAMIN et al., 2010), vinagre de vinho

(CAMIN et al., 2013), carne (HEATON et al., 2008), queijo (CAMIN et al., 2012) e do leite (RENOU et al., 2004).

Apesar dos valores isotópicos de carbono e nitrogênio estarem mais intimamente ligados à dieta animal, os isótopos de hidrogênio e oxigênio seriam ferramentas adicionais na rastreabilidade, pois análises combinadas utilizando multielementos, podem auxiliar na ligação entre informações, a fim de promover melhor entendimento sobre o objeto em estudo (DUCATTI et al., 2011).

O hidrogênio tem dois isótopos estáveis, o hidrogênio (^1H) e o deutério (^2H ou D), sendo os valores isotópicos expressos em delta per mil ($\delta^2\text{H}$ ou δD) da razão isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ do produto em relação ao padrão internacional, e devido ao isótopo pesado ter o dobro da massa do leve, o fracionamento é mais evidente (FRY, 2006), apresentando a maior variação na razão isotópica de todos os elementos (HOEFS, 2009). A água dos oceanos é o maior reservatório de hidrogênio da biosfera, sendo utilizada a média das águas dos oceanos (SMOW) como padrão internacional.

O oxigênio tem três isótopos estáveis, ^{16}O , ^{17}O e ^{18}O , mas por causa da maior abundância natural e da diferença entre as massas do ^{16}O e do ^{18}O , os valores isotópicos do oxigênio são expressos em delta per mil ($\delta^{18}\text{O}$) da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ do produto em relação ao padrão internacional (HOEFS, 2009), que pode ser o padrão SMOW ou o PDB (FRY, 2006).

A análise de isótopos estáveis de outros elementos, como o oxigênio e hidrogênio, também foi utilizada por outros autores (BONTEMPO et al., 2012; CAMIN et al., 2008; NOVELLI et al., 2013) em conjunto com as análises de carbono e nitrogênio em estudos de rastreabilidade.

A rastreabilidade é o conjunto de informações pelo qual é possível descrever o histórico de produção de um alimento, e os processos e transformações pelos quais passou até chegar ao consumidor, sustentando uma maior garantia da qualidade desse produto, permitindo uma rápida detecção de problemas durante a produção (WILSON; CLARKE, 1998). De acordo com Zhou et al. (2010), em pesquisa realizada em Pequim, a maioria dos consumidores estaria disposta a pagar mais pelo leite que tivesse um sistema de rastreabilidade, pois estão preocupados com a segurança alimentar.

Crittenden et al. (2007) encontraram impressões isotópicas distintas no leite coletado no outono, de vacas criadas a pasto em sete regiões distintas da Austrália e

Nova Zelândia, indicando que as diferentes impressões isotópicas das dietas se refletiram no leite. Os autores relacionaram as razões isotópicas de ^{13}C e ^{18}O com a latitude, além de uma clara ligação do ^{18}O com a relação chuva/evaporação, concluindo que a análise isotópica multielementar tem grande potencial para determinar a origem geográfica dos produtos lácteos na Austrália.

Lourenço et al. (1984) verificaram que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados nas fezes e no leite modificaram-se rapidamente nos três primeiros dias após a substituição da silagem de milho (C_4) pelo feno de soja perene (C_3) na alimentação das vacas, enquanto no sangue a variabilidade foi pequena. Para avaliar as alterações isotópicas de carbono e nitrogênio no soro sanguíneo, Silva et al. (2012) forneceram a búfalos da raça Murrah uma dieta estritamente vegetal, encontrando um aumento nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do soro sanguíneo após substituição da dieta inicial por outra contendo farinha de carne e ossos bovinos como fonte proteica.

Ao compararem as razões isotópicas de carbono entre vacas criadas em diferentes pastos de plantas C_3 ou C_4 , Minson et al. (1975) concluíram que a determinação da dieta e a origem do animal pode ser determinada pela mensuração das razões isotópicas do carbono-13 de seus produtos e tecidos, pois os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram de -15,5‰, -15,0‰, -22,5‰ e -26,0‰ no leite e -12,1‰, -15,1‰, -22,3‰ e -26,2‰ no pelo, refletindo os valores de -14,0‰ (C_4), -12,4‰ (C_4), -25,4‰ (C_3) e -28,9‰ (C_3) das pastagens.

Knobbe et al. (2006) trabalharam com vacas leiteiras previamente alimentadas por seis meses com uma dieta mista de plantas C_4 e C_3 , sendo substituída gradativamente durante sete dias por uma dieta de plantas C_3 , para determinar a correlação dos isótopos de ^{13}C e ^{15}N em diferentes regimes de alimentação. Durante a alimentação mista os conteúdos de $\delta^{13}\text{C}$ do leite e da urina diminuíram em relação à dieta, enquanto na alimentação exclusivamente com plantas C_3 o leite e a urina foram enriquecidos em ^{13}C em relação à dieta, sendo os valores de $\delta^{13}\text{C}$ menores no leite em relação à urina, em ambas as dietas. Apesar de não haver diferenças significativas dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ no leite com a alteração das dietas, os valores foram enriquecidos no leite, e empobrecidos significativamente na urina em relação à dieta. Foram encontrados valores estáveis do $\delta^{13}\text{C}$ do leite total e da urina 10 dias após o início da mudança de dieta de C_4/C_3 para C_3 , e quando alterada a dieta de C_3 para C_4/C_3 demorou seis dias

para estabilizar no valor previamente encontrado. Já os valores de $\delta^{15}\text{N}$ no leite não foram alterados com a troca de dietas, enquanto o $\delta^{15}\text{N}$ na urina estabilizaram após 42 dias na troca de dieta de C_4/C_3 para C_3 , e apenas 12 dias quando realizada a volta da dieta mista, provavelmente pelo maior valor de $\delta^{15}\text{N}$ na dieta C_4/C_3 e pela maior excreção do isótopo ^{14}N na urina.

Após alternar a alimentação de vacas leiteiras entre dietas compostas por feno de alfafa e cevada (C_3) para outra composta de milho (C_4), Boutton et al. (1988) obtiveram uma maior enriquecimento em ^{13}C no leite total das vacas alimentadas com a dieta C_4 em relação ao das vacas alimentadas com dieta C_3 . A composição isotópica do leite aproximou-se da composição isotópica da dieta em apenas quatro dias após a troca, indicando rápida transferência do carbono dietético para o leite. No entanto os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do leite empobreceram em relação às dietas. Os resultados encontrados demonstram que a contribuição dos nutrientes armazenados previamente no corpo animal é desprezível na formação do leite em vacas no fim da lactação (193 a 333 dias de lactação).

Scampicchio et al. (2012) conseguiram discriminar leites produzidos em diferentes regiões e tipos de processamento, pela análise de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da proteína, caseína e gordura do leite, enquanto Bontempo et al. (2012), combinando as razões dos isótopos de C, H, O e N, encontraram um bom nível de diferenciação de produtos oriundos de dois pastos diferentes em dois locais montanhosos distintos, indicando que esses isótopos estáveis no leite e no queijo estão ligados ao local, tipo de vegetação e ambiente.

Analisando o soro do leite, Renou et al. (2004) obtiveram valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ menores na região montanhosa (1100m) em comparação à de menor altitude (200m), refletindo as diferenças significativas entre as águas de bebida fornecidas aos animais. No entanto as águas de bebida não sofreram alterações isotópicas entre as estações de primavera e inverno nas suas respectivas regiões, aparentando o $\delta^{18}\text{O}$ ser o melhor parâmetro para discriminar a origem geográfica ou a dieta. Kornexl et al. (1997) encontraram um enriquecimento de ^{18}O entre 2 e 6‰ no soro do leite em relação à água de bebida.

Os isótopos estáveis de ^{13}C , ^{15}N , ^2H e ^{18}O podem ser uma ferramenta promissora de apoio na rastreabilidade dos alimentos (NOVELLI et al., 2013), podendo

auxiliar na rastreabilidade da cama de aviário na alimentação de bovinos de leite, surgindo como nova ferramenta na fiscalização e controle de qualidade dos alimentos.

1.4. Justificativa e objetivos

Dentro desse contexto, visto que o leite é consumido em larga escala no mundo, e devido aos riscos sanitários e econômicos citados, o objetivo foi avaliar as alterações nos valores dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$) no leite, gordura do leite, soro do leite, proteína do leite, sangue, soro sanguíneo, plasma sanguíneo e fezes, ocasionadas pela inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, e identificar o isótopo e o componente animal mais indicado na rastreabilidade desse resíduo.

Os dados obtidos neste estudo servirão de base para auxiliar em futuras fiscalizações e em experimentos de rastreabilidade em bovinos leiteiros pela análise dos componentes animais e elementos estudados, além de fortalecer o uso dos isótopos estáveis como ferramenta nas pesquisas de autenticação da qualidade e origem do leite.

O *Capítulo 2*, denominado “*Isótopos estáveis no leite: rastreabilidade da cama de aviário utilizada na alimentação de ruminantes*” apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **International Dairy Journal**. O objetivo deste estudo foi avaliar os isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$) no leite e suas frações (gordura, soro e proteína) de vacas alimentadas com ou sem cama de aviário.

O *Capítulo 3*, denominado “*Rastreabilidade da cama de aviário em bovinos leiteiros pela análise multi-isotópica de sangue e fezes*” apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **International Dairy Journal**. O objetivo deste estudo foi avaliar os isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$) no sangue e suas frações (plasma e soro sanguíneo) e nas fezes de vacas alimentadas com ou sem cama de aviário.

2. Referências bibliográficas

BÁNÁTI, D. Consumer response to food scandals and scares. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 2, p. 56-60, 2011.

BONTEMPO, L; LOMBARDI, G.; PAOLETTI, R.; ZILLER, L; CAMIN, F. H , C , N and O stable isotope characteristics of alpine forage , milk and cheese. **International Dairy Journal**, v. 23, n. 2, p. 99-104, 2012.

BOUTTON, T. W.; TYRRELL, H. F.; PATTERSON, B. W.; VARGA, G. A.; KLEIN, P. D. Carbon kinetics of milk formation in holstein cows in late lactation. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 10, p. 2636-2645, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sislegis, versão 1.0**. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952. Art. 475. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao/sislegis>>, Acesso em: 09/05/2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sislegis, versão 1.0**. Instrução Normativa nº 08 de 26 de março de 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao/sislegis>>, Acesso em: 25/04/2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Oficial de 07 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/12/nota-oficial>>, Acesso em: 01/03/2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Oficial de 09 de maio de 2014. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/05/laboratorio-de-referencia-da-oie-reforca-o-posicionamento-das-autoridades-brasileiras-que-o-caso-de-eeb-e-atipico>>, Acesso em: 01/03/2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Notícia de 20 de agosto de 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/08/operacao-leite-adulterado-i-e-ii>>, Acesso em: 01/03/2015.

CAMIN, F; BONTEMPO, L; PERINI, M; TONON, A.; BREAS, O.; GUILLOU, C., MORENO-ROJAS, J. M., GAGLIANO, G. Control of wine vinegar authenticity through $\delta^{18}\text{O}$ analysis. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 107-111, 2013.

CAMIN, F.; LARCHER, R.; PERINI, M.; BONTEMPO, L.; BERTOLDI, D.; GAGLIANO, G.; NICOLINI, G.; VERSINI, G. Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. **Food Chemistry**, v. 118, n. 4, p. 901-909, 2010.

CAMIN, F; PERINI, M.; COLOMBARI, G.; BONTEMPO, L.; VERSINI, G. Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope

ratios of milk. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 11, p. 1690-1696, 2008.

CAMIN, F.; WEHRENS, R.; BERTOLDI, D.; BONTEMPO, L.; ZILLER, L.; PERINI, M.; NICOLINI, G.; NOCETTI, M.; LARCHER, R. H , C , N and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 54-59, 2012.

CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; TRINCA, L; SILVA, E. T. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 1, p. 63-68, 2006.

COMISSÃO EUROPEIA. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (UE) nº 51/2013 de 16 de Janeiro de 2013. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0051&qid=1425826722085&from=PT>>. Acesso em 07/03/2015.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária 2015**. Ano XXII, n. 1, jan. 2015, p. 01-92. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_02_18_17_40_51_revista_janeiro_2015.pdf>. Acesso em: 08/03/2015.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et cosmochimica acta**, v. 12, n. 1-2, p. 133-149, 1957.

CRITTENDEN, R. G.; ANDREW, A. S.; LEFOURNOUR, M.; YOUNG, M. D.; MIDDLETON, H.; STOCKMAN, R. Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 5, p. 412-428, 2007.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; MÓRI, C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M. A. O.; BORDINHON, A. M. I. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.10, n. 3. P. 189-194, 2008.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; MÓRI, C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M. A. O. Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovinos em ovos de poedeiras alimentadas com ingredientes alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 1-7, 2009.

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

DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. D. B.; MARTINS, M. B.; JUNIOR, L. C. V.; DENADAI, J. C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 68-75, 2011. Suplemento especial.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A. M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 115-119, 2005.

EHLERINGER, J. R.; RUNDEL, P. W.; NAGY, K. A. Stable Isotopes in Physiological Ecology and Food Web Research. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 1, n. 2, p. 42-45, 1986.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. **FAOSTAT**. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E> >. Acesso em: 08/13/2015.

FRY, B. **Stable Isotope Ecology**. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2006. 308 p.

GOTELIPE, F. M. S. **Avaliação do sistema de vigilância da encefalopatia espongiforme bovina no brasil**, 2006. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

HEATON, K.; KELLY, S. D.; HOOGEWERFF, J.; WOOLFE, M. Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 506-515, 2008.

HON, K. L.; LEUNG, T. F. Issues associated with formula milk: the Hong Kong's experience. **World Journal of Pediatrics**, v. 10, n. 1, p. 5-6, 2014.

HOEFS, J. **Stable isotope geochemistry**. 6th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. 285 p.

HUESTON, W. D. BSE and variant CJD: Emerging science, public pressure and the vagaries of policy-making. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 3-4, p. 179-184, 2013.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 40, 2012. 71p.

KANAYAMA, J. S.; PEZZATO, A. C.; SARTORI, J. R.; DUCATTI, C.; NOVAES, V. H. C.; FASCINA, V. B.; ARAÚJO, P. C.; CARVALHO, F. B. Traceability of animal by product meals in broilers fed sugarcane yeast using stable isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 1, p. 51-55, 2012.

KENDALL, C.; DOCTOR, C. H. Stable isotope applications in hydrologic studies. In: HOLLAND, H. D.; TUREKIAN, K. K. **Treatise on geochemistry**. vol. 5. Oxford, UK: Elsevier Ltd, 2005. cap. 11, p. 319-364.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W.; PANNE, U.; FRY, H.; LOCHOTZKE, H. M.; PREISS-WEIGERT, A. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle

depending on the diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 1, p. 104-108, 2006.

KORNEXL, B. E.; WERNER, T.; ROSSMAN, A.; SCHMIDT, H.-L. Measurement of the stable isotope abundances in milk and milk ingredients - a possible tool for origin assignment and quality control. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v. 205, n. 1, p. 19-24, 1997.

KRÜGER, M.; GROSSE-HERRENTHE, A.; SCHRÖDL, W.; GERLACH, A.; RODLOFF, A. Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany e Prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust. **Anaerobe**, v. 18, n. 2, p. 221-223, 2012.

LINDSTRÖM, M.; MYLLYKOSKI, J.; SIVELÄ, S.; KORKEALA, H. *Clostridium botulinum* in Cattle and Dairy Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 281-304, 2010.

LOURENÇO, A. J.; MATSUI, E.; JÚNIOR, I. A. Variações de valores de ^{13}C nas fezes, leite e sangue de vacas em lactação mantidas em pastagens exclusivas de gramíneas ou consorciadas. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.41 (Único), p.183-192, 1984.

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, n. 1-2, p. 137-142, 2012.

MARTINS, M. B. **Turnover de carbono e a preferência alimentar de ovelhas por isótopos estáveis**, 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

MINSON, D. J.; LUDLOW, M. M.; TROUGHTON, J. H. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. **Nature**, v. 256, n. 5518, p. 602, 1975.

MONGELLI, G.; MONNI, S.; OGGIANO, G.; PATERNOSTER, M.; SINISI, R. Tracing groundwater salinization processes in coastal aquifers : a hydrogeochemical and isotopic approach in Na-Cl brackish waters of north-western Sardinia, Italy. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 10, n. 1, p. 1041-1070, 2013.

MÓRI, C.; GARCIA, E. A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J. C.; PELÍCIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, A. O. M.; BORDINHON, A. M. Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) stable isotopes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, n. 4, p. 263-269, 2007.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2002, Maringá. **Anais ... Maringá**, 2002.

NOVELLI, E.; BALZAN, S.; PERINI, M; ANTONETTI, P.; FASOLATO, L.; CAMIN, F. Analytical employment of stable isotopes of carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen for food authentication. **Italian Journal of Food Safety**, v. 1, n. 1, p. 71-75, 2013.

OIE, World Organization for animal Health, 2014. Resolution n° 18 of 82nd General Session, Adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE on 27 May 2014. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/2014_A_RESO-18_BSE.pdf>. Acesso em: 03/04/2015.

OLIVEIRA, R. P.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A. C.; DENADAI, J. C.; CRUZ, V. C.; SARTORI, J. R.; CARRIJO, A. S.; CALDARA, F. R. Traceability of poultry offal meal in broiler feeding using isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of different tissues. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 1, p. 13-20, 2010.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) n° 999/2001 de 22 de Maio de 2001. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:147:0001:0040:PT:PDF>>. Acesso em 25/04/2013.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) n° 1069/2009 de 21 de Outubro de 2009. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069&qid=1425822763700&from=PT>>. Acesso em 07/03/2015.

PEREIRA, A. L. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista de Biociências de Taubaté**, v. 13, n. 1-2, p. 16-27, 2007.

PEREIRA, F. B.; DUTRA, I. S. Diagnóstico de situação das práticas de manejo sanitário em sistemas de produção de bovinos de corte. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 522-530, 2012.

PEREIRA, J. C.; CARVALHO E SILVA, P. R.; CECON, P. R.; RESENDE FILHO, M. A.; OLIVEIRA, R. L. Cama de Frango e Suplemento à Base de Microbiota Ruminal em Dietas de Novilhas Leiteiras: Desempenho Produtivo e Avaliação Econômica. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 653-662, 2003.

PETERSON, B. J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. **Annual Review of Ecology And Systematics**, v. 18, n. 1, p. 293-320, 1987.

PRACHE, S.; CORNU, A.; BERDAGUÉ, J. L.; PRIOLO, A. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 59, n. 2-3, p. 157-168, 2005.

QUIJANO, M. L.; CASTRO, J. M.; PANCOST, R. D.; GEA, G. A.; NAJARRO, M.; AGUADO, R.; ROSALES, I; MARTÍN-CHIVELET, J. Organic geochemistry , stable isotopes , and facies analysis of the Early Aptian OAE — New records from Spain (Western Tethys). **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 365-366, p. 276-293, 2012.

RAMÍREZ, K. A. O. Aportes al estudio paleodietario mediante el análisis de isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en restos óseos humanos de la región centro-oriental del Cauca medio. **Revista Colombiana de Antropología**, v. 48, n. 1, p. 125-141, 2012.

RODRIGUES FILHO, M. ; MANCIO, A. B.; GOMES, S. T.; SILVA, F. F.; LANA, R. P.; RODRIGUES, N. E. B.; SOARES, C. A.; VELOSO, C. M. Avaliação Econômica do Confinamento de Novilhos de Origem Leiteira, Alimentados com Diferentes Níveis de Concentrado e de Cama de Frango. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 2055-2069, 2002.

RENOU, J.; DEPONGE, C.; GACHON, P.; BONNEFOY, J. ; COULON, J.; GAREL, J.; VÉRITÉ, R.; RITZ, P. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry : cow milk. **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 63-66, 2004.

SALGAN, L.; TUCKER, H.; LUNA, L.; ARANDA, C.; GIL, A. Estudios arqueológicos y bioarqueológicos en la cuenca media del río malargüe (provincia de Mendoza): el sitio bajada de las tropas 1. **Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología**, v. XXXVII, n. 1, p. 113-135, 2012.

SCAMPICCHIO, M.; MIMMO, T.; CAPICI, C.; HUCK, C.; INNOCENTE, N.; DRUSCH, S.; CESCO, S. Identification of milk origin and process-induced changes in milk by stable isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.45, p. 11268-11273, 2012.

SILVA, J. J.; COSTA, C.; DUCATTI, C.; MONTEIRO, A. L. G.; GARCIA, C. A. Determinação da fase lactente-ruminante de cordeiros pela técnica do $\delta^{13}\text{C}$. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 264-270, 2010.

SILVA, D. A. F.; BISCOLA, N. P.; SOUZA, R. M. F.; CAETANO, D. A; DENADAI, J. C.; SARTORI, M. M. P.; SILVA, E. T.; DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; JORGE, A. M.; SANTOS, L. D.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B. Carbon-13 and nitrogen-15 turnover in serum of bubaline donors of biological material for medical use. **Toxicon**, v. 60, n. 2, p. 117, 2012.

SMITH, P. G.; BRADLEY, R. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. **British Medical Bulletin**, v. 66, n. 1, p. 185-198, 2003.

SUN, Z.; MOU, X.; LI, X.; WANG, L.; SONG, H.; JIANG, H. Application of stable isotope techniques in studies of carbon and nitrogen biogeochemical cycles of ecosystem. **Chinese Geographical Science**, v. 21, n. 2, p. 129-148, 2011.

SUN, S.; GUO, B.; WEI, Y.; FAN, M. Classification of geographical origins and prediction of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of lamb meat by near infrared reflectance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 508-514, 2012.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ª ed. Santa Maria, RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2008. 206p.

USDA, United States Department of Agriculture. **Manure Use for Fertilizer and for Energy**, 2009. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/media/377381/ap037a_1.pdf>. Acesso em: 08/03/2015.

WILSON, T. P.; CLARKE, W. R. Food safety and traceability in the agricultural supply chain using the internet to deliver traceability. **Supply Chain Management: An International Journal**, v. 3, n. 3, p. 127-133, 1998.

XIU, C.; KLEIN, K. K. Melamine in milk products in China: Examining the factors that led to deliberate use of the contaminant. **Food Policy**, v. 35, n. 5, p. 463-470, 2010.

YANAGI, Y.; HIROOKA, H.; OISHI, K.; CHOUMEI, Y.; HATA, H.; ARAI, M.; KITAGAWA, M.; GOTOH, T.; INADA, S.; KUMAGAI, H. Stable carbon and nitrogen isotope analysis as a tool for inferring beef cattle feeding systems in Japan. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 502-506, 2012.

ZHOU, H.; NANSEKI, T.; HOTTA, K.; SHINKAI, S.; XU, Y. Analysis of consumers' attitudes toward traceability system on dairy products in China. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 55, n. 1, p. 167-172, 2010.

CAPÍTULO 2
ISÓTOPOS ESTÁVEIS NO LEITE: RASTREABILIDADE DA
CAMA DE AVIÁRIO UTILIZADA NA ALIMENTAÇÃO DE
RUMINANTES

Isótopos estáveis no leite: rastreabilidade da cama de aviário utilizada na alimentação de ruminantes

Resumo

A rastreabilidade da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras foi realizada pela análise dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$) no leite e suas frações (gordura, soro do leite, e proteína). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do leite e suas frações foram maiores nos animais alimentados com a dieta contendo cama de aviário em comparação aos da dieta vegetal, enquanto os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ foram semelhantes entre os tratamentos. As análises de componentes principais do leite e suas frações proteína e soro permitiram distinguir o grupo alimentado com cama de aviário dos grupos alimentados com a dieta vegetal, sendo os isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ os mais representativos. No entanto, a rastreabilidade não foi possível na gordura extraída do leite. Os resultados demonstraram a possibilidade de rastrear a presença da cama de aviário na dieta de bovinos leiteiros pela análise isotópica do leite e suas frações proteína e soro, surgindo como nova ferramenta na fiscalização e controle de qualidade deste alimento.

Palavras-chave: rastreabilidade, isótopos estáveis, leite, vacas leiteiras, cama de aviário

Stable isotopes in milk: traceability of poultry litter in dairy cow diet

Abstract

Traceability of poultry litter in dairy cow diet was performed by analysis of stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$), oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) and deuterium ($\delta^2\text{H}$) in milk and its fractions (fat, whey, and protein). The values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were higher in milk and fractions of animals fed diet containing poultry litter than those fed with vegetable diet, while the values of $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ remained similar. The principal component analysis of milk and fractions (protein and water) differed among the group which diet contained poultry litter from those fed vegetable diet, where the stable isotopes of carbon and nitrogen were more representative. However, by stable isotopes in the fat was not possible to differentiate between treatments. The results demonstrate the capacity to track the presence of poultry litter in dairy cow diet by isotopic analysis of milk and its components (protein and whey), emerging as a new tool in the supervision and quality control of this food.

Key-words: traceability, stable isotopes, milk, dairy cows, poultry litter

1. Introdução

A produção mundial de leite aumentou em 20% entre 2004 e 2013, crescendo a uma média de 2% ao ano (FAO, 2013). Em contrapartida, também aumentou o interesse dos consumidores quanto à qualidade e origem do leite, impulsionado pelo caso de contaminação de produtos lácteos com bactérias patogênicas ocorrido em 2012 na maior exportadora mundial de lácteos (Hon & Leung, 2014), além da adulteração com melamina na China, contaminando mais de 290.000 pessoas em 2008 (Xiu & Klein, 2010) e gerando um prejuízo na economia chinesa estimado em 3 bilhões de dólares (Bánáti, 2011).

Além da adulteração do leite, o uso de alimentos proibidos na alimentação das vacas leiteiras também é considerado um método de fraude. Dentre os produtos proibidos na alimentação de ruminantes, está a cama de aviário, que pode conter restos de farinha de carne e ossos e até carcaças inteiras ou partes de frangos, podendo carrear sérios problemas de saúde aos animais, como o botulismo (Krüger, Grosse-Herrenthe, Schrödl, Gerlach, & Rodloff, 2012), e a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) conhecida como “mal-da-vaca-louca”, que é associada à encefalopatia espongiforme transmissível que acomete os humanos, denominada variante da doença de Creutzfeldt-Jacob (Hueston, 2013).

Apesar da proibição do uso de alimentos contendo proteínas de origem animal na alimentação de ruminantes, na União Europeia e em diversos países, como consequência da crise sanitária da EEB que acometeu mais de 180 mil bovinos somente no Reino Unido (Smith & Bradley, 2003), o uso da cama de aviário é favorecido pela proximidade entre granjas leiteiras e regiões produtoras de aves, aliada à indiferença de muitos produtores.

Diante do exposto, é necessário buscar novas tecnologias que possibilitem detectar essa prática ilegal, que coloca em risco a integridade dos animais, a saúde do consumidor e a economia da cadeia leiteira. Nesse contexto, os isótopos estáveis são traçadores potenciais no leite (Prache, Cornu, Berdagué, & Priolo, 2005), pois correlacionam os produtos de origem animal com o seu ambiente de criação (Sun, Guo, Wei, & Fan, 2012).

Como são escassos os estudos de rastreabilidade de dietas contendo proteína animal na alimentação do gado leiteiro, o objetivo foi rastrear a inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, pela análise dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$) no leite e suas frações (gordura, soro do leite, e proteína), para identificar qual isótopo e tecido é mais indicado nessa rastreabilidade, contribuindo na fiscalização do uso de produtos proibidos na dieta de ruminantes.

2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Setor de bubalinos da Fazenda Experimental Lageado, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, em Botucatu/SP, no período de 21/01/2014 a 05/05/2014, totalizando 105 dias, incluindo o período de adaptação de 15 dias para adequação do consumo dos animais à dieta contendo silagem de milho, pois eram animais habituados ao pastejo de forragens.

Foram utilizadas 12 vacas mestiças, com produção média de 6 litros de leite/dia, distribuídas em dois tratamentos, o controle, com dieta estritamente vegetal durante todo período experimental, e o tratamento cama de aviário, com inclusão de 50% de cama de aviário na dieta durante o primeiro período experimental de 55 dias. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (14% PB) e isoenergéticas (67% NDT), com base no NRC (2001) (Tabela 1).

O projeto foi autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Coordenadoria da Raiva dos Herbívoros e das encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, pela Informação CRHE n° 79/2013 (Anexo 1) através do processo n° 21052.009187/2013-02, devido à proibição do uso da cama de aviário na dieta de ruminantes. A pesquisa foi acompanhada por fiscais federais do MAPA, desde sua implantação até a conclusão. Os animais alimentados com cama de frango foram identificados com brincos individuais e eutanasiados após o término do experimento.

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu/SP com protocolo de

n° 152-2013/CEUA (Anexo 2), sendo realizado de acordo com a Diretiva 63 (União Europeia, 2010).

Tabela 1

Composição percentual, valor isotópico (n=3) e desvio padrão das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas	
	Cama de aviário	Vegetal
Silagem de milho	40	70
Silagem de grão úmido de milho	10	15
Farelo de soja	-	15
Cama de aviário	50	-
Total	100	100
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) ^a	-17,4±0,4	-13,7±0,1
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	10,5±0,1	3,0±0,0
$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	11,6±0,0	13,0±0,0
$\delta^2\text{H}$ (‰)	19,3±1,6	1,2±0,7

^a δ : enriquecimento das razões isotópicas dos elementos carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) de uma amostra, em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil.

As vacas foram ordenhadas diariamente pelo sistema manual às 6:00 h, e alimentadas, *ad libitum*, duas vezes ao dia (8:00 h e 16:00 h), permitindo uma sobra de até 10% na matéria natural. Durante o primeiro período experimental os animais do tratamento controle receberam a dieta estritamente vegetal, enquanto os animais do tratamento cama de aviário foram alimentados com a dieta cama de aviário (Tabela 2).

No segundo período, após 55 dias de experimento, a dieta do tratamento controle não foi alterada, enquanto os animais do tratamento cama de aviário passaram a receber a dieta estritamente vegetal, durante 35 dias, totalizando 90 dias de avaliação (Tabela 2).

O leite foi coletado individualmente de cada vaca após limpeza e higienização dos tetos, e amostrado no dia inicial e nos dias 55 e 90 da fase experimental. As amostras de leite foram processadas em centrífuga (Sorvall ST16R, Thermo Electron

Led GmbH, Osterode, Alemanha) a 20000 g por 30 min a 4 °C conforme método utilizado por Scampicchio et al. (2012), resultando em três frações, denominadas de gordura (sobrenadante), soro do leite (parte intermediária) e proteína (precipitado). Também foram coletadas amostras das dietas experimentais.

Tabela 2

Cronograma de dietas fornecidas durante período experimental.

Tratamento	Período experimental	
	1° (1 a 55 dias)	2° (55 a 90 dias)
Cama de aviário	Dieta cama de aviário	Dieta vegetal
Controle	Dieta vegetal	Dieta vegetal

As amostras de leite foram liofilizadas a vácuo (Liotop L108, Liobras, São Carlos, Brazil) a -55 °C e pressão de 50 µHg por 72 h. Depois de secas, foram moídas em moinho criogênico (Geno/Grinder 2010, Spex SamplePrep LLC, Metuchen, EUA) em frequência de 700 rpm durante 2 min. Após a coleta e processamento todas as amostras foram armazenadas a -20 °C até a utilização.

Depois de descongeladas, as amostras sólidas foram pesadas em balança de precisão (MX5, Mettler Toledo, Suíça), e as amostras líquidas de leite, soro do leite e proteína foram pipetadas diretamente em cápsulas individuais de estanho, nas quantidades de 0,2 µL, 0,4 µL e 0,2 µL para as análises de carbono, e nas quantidades de 6 µL, 6 µL e 2 µL para as análises de nitrogênio, respectivamente. Para as amostras de leite liofilizado, gordura e das dietas experimentais foram utilizados os intervalos de massas de 80 a 120 µg, 50 a 70 µg e de 80 a 120 µg, para as análises de carbono. Devido à quantidade insignificante de nitrogênio na gordura, não foi realizada a análise dos isótopos de nitrogênio nessa amostra. Para as análises de nitrogênio do leite liofilizado e das dietas experimentais foram utilizadas massas de 4000 a 4500 µg e de 2000 a 2500 µg, respectivamente.

Foram utilizadas quantidades iguais de amostras para as análises de oxigênio e deutério, colocadas em cápsulas de prata, no volume de 0,4 µL para leite líquido, soro do leite e proteína, e nas massas de 200 a 250 µg, 140 a 165 µg, e de 200 a 250 µg para as análises de gordura, leite liofilizado e dietas experimentais, respectivamente.

As amostras foram analisadas por meio do espectrômetro de massas de razão isotópica (Finnigan DELTA-V; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha) acoplado ao analisador elementar (Flash 2000 Organic EA for IRMS; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha), no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu/SP, para obtenção da razão isotópica.

A razão do enriquecimento isotópico de uma amostra em relação ao seu padrão é denominada variabilidade isotópica, e pode ser estimada através do animal como um todo, ou individualmente pelos seus tecidos e compostos bioquímicos. A variabilidade isotópica dos elementos foi calculada pela equação 1 (Peterson & Fry, 1987):

$$\delta X_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \quad (1)$$

Na qual:

- $\delta X_{(\text{amostra, padrão})}$ é o enriquecimento da razão isotópica do elemento de uma amostra em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil (‰).
- R é a razão isotópica do isótopo pesado em relação ao leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$) da amostra e do padrão, respectivamente.

Foram utilizados os padrões PDB e N_2 do ar atmosférico para o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente, e o padrão SMOW para as análises de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$.

Os dados isotópicos obtidos foram submetidos à análise multivariada de componentes principais pela matriz de correlação, no programa Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, 2010), para verificar o isótopo mais indicado na rastreabilidade da cama de aviário no leite e suas frações e avaliar a formação de diferentes grupos de resposta. Foi realizada a plotagem dos dados isotópicos em gráficos de dispersão, que possibilitam rastrear a possível dieta fornecida ao animal, pelo confronto de amostras aleatórias com o gráfico.

3. Resultados e discussão

A inclusão do ingrediente cama de aviário na dieta diminuiu o valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ da dieta cama de aviário em comparação à dieta vegetal (Tabela 1), pois seu

valor isotópico se aproxima aos das plantas C₃, devido à presença de maravalha em sua composição, enquanto a composição isotópica da dieta vegetal, por conter maior quantidade de silagem de milho, se assemelha às plantas C₄. O $\delta^{15}\text{N}$ foi mais elevado na dieta cama de aviário, pois a cama de aviário contém muitas excretas de frango, o que enriquece o valor isotópico de nitrogênio na cama de aviário ($\delta^{15}\text{N}=10,6\%$).

Para os valores isotópicos de oxigênio e deutério, a inclusão da cama de aviário aumentou a razão isotópica de $\delta^2\text{H}$ e diminuiu o valor de $\delta^{18}\text{O}$ da dieta cama de aviário em relação à dieta vegetal (Tabela 1), pois a cama de aviário utilizada tinha valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de 125,1‰ e 1,22‰, enquanto a silagem de milho, que contribuiu em maior percentual na dieta vegetal, tinha menor valor de $\delta^2\text{H}$ (-16,6‰) e maior valor de $\delta^{18}\text{O}$ (37,9‰) em comparação à cama de aviário.

Pelas análises isotópicas realizadas dos leites liofilizado e líquido, constatou-se que os dados do leite líquido tiveram altas porcentagens do coeficiente de variação para os isótopos de oxigênio (75,6) e deutério (21,5), sendo utilizados os dados de leite liofilizado para comparação entre os tratamentos, devido à menor variação, com 21,2% e 19,6% para oxigênio e deutério, respectivamente.

O valor isotópico médio inicial (n=12) do $\delta^{13}\text{C}$ do leite liofilizado foi de -11,9‰, e após 55 dias do fornecimento das dietas houve uma diminuição nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no leite dos dois tratamentos, pois os valores isotópicos das dietas eram mais empobrecidos que o valor inicial do carbono-13 no leite.

O valor inicial médio (n=12) de $\delta^{15}\text{N}$ foi de 7,7‰, aumentando nas vacas alimentadas com cama de aviário, enquanto diminuiu no leite do tratamento controle (Tabela 3), aproximando dos valores isotópicos das dietas em ambos os tratamentos. Os valores médios iniciais (n=12) de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ do leite liofilizado foram de -14,3‰ e 639,7‰, respectivamente, permanecendo semelhantes ao longo do experimento, devido aos altos valores de variação das amostras, representadas pelo desvio padrão (Tabela 3). Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ não foram semelhantes aos das dietas experimentais, indicando que esses isótopos sofreram influência da água fornecida aos animais.

Foi realizada a análise de componentes principais do leite, que representou 84,3% da informação contida nos dados. O primeiro componente foi responsável por 59,1% da variação encontrada, com maior participação dos isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela 4).

Tabela 3

Valores isotópicos médios (n=6) e desvio padrão do leite e suas frações, de vacas leiteiras alimentadas ou não com cama de aviário.

δX^a	Amostra	Cama de aviário ^b		Controle ^b	
		55	90	55	90
$\delta^{13}C$	Leite	-13,3±0,4	-14,5±0,5	-15,1±0,5	-15,0±0,6
	Soro	-13,9±0,5	-15,4±0,4	-16,2±0,7	-15,8±0,6
	Proteína	-12,8±1,0	-15,2±0,6	-15,2±1,5	-15,0±2,0
	Gordura	-15,7±0,6	-16,0±0,5	-16,5±0,6	-16,6±0,5
$\delta^{15}N$	Leite	9,7±0,5	3,5±0,3	4,3±0,5	3,3±0,4
	Soro	12,4±0,4	6,1±0,4	5,7±0,4	6,1±0,4
	Proteína	12,6±0,5	6,3±0,3	5,7±0,6	6,1±0,3
$\delta^{18}O$	Leite	-18,6±2,8	-18,5±1,7	-18,1±4,4	-15,4±3,1
	Soro	45,9±50,0	57,7±29,5	-5,9±45,0	28,7±40,9
	Proteína	-40,4±23,0	-45,8±3,4	-39,7±2,5	-34,4±3,4
	Gordura	5,4±0,9	5,3±0,8	6,8±1,3	6,5±1,3
δ^2H	Leite	745,6±89,3	714,8±41,1	596,1±57,7	507,4±27,7
	Soro	1094,0±123,4	1342,2±24,6	1411,1±313,0	1521,1±228,8
	Proteína	361,9±50,3	340,7±51,9	316,5±53,8	408,8±141,4
	Gordura	-170,0±5,1	-175,0±3,9	-179,2±9,1	-179,6±3,8

^a δ : enriquecimento das razões isotópicas dos elementos carbono ($\delta^{13}C$), nitrogênio ($\delta^{15}N$), oxigênio ($\delta^{18}O$) e hidrogênio (δ^2H) de uma amostra, em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil.

^b Tratamentos experimentais: 55: amostras coletadas após 55 dias de fornecimento da dieta cama de aviário ao tratamento cama de aviário e da dieta vegetal ao tratamento controle; 90: amostras coletadas após 35 dias da troca da dieta cama de aviário pela dieta vegetal no tratamento cama de aviário.

Pela análise de componentes principais dos isótopos estáveis do leite do tratamento cama, constatou-se que o grupo alimentado com cama de aviário (cama-55) distinguiu-se dos demais grupos (Fig. 1). Após a retirada da cama de aviário da dieta dos animais do tratamento cama, e o fornecimento da dieta vegetal por 35 dias, o grupo

dessas vacas (cama-90) aproximou-se dos grupos do tratamento controle (controle-55 e controle-90).

Tabela 4

Valores de participação das razões isotópicas de carbono, nitrogênio, oxigênio e deutério no primeiro e segundo componente das análises de componentes principais do leite e suas frações.

δX^a	Leite		Soro		Proteína		Gordura	
	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
$\delta^{13}C$	0,610	0,035	0,588	-0,176	0,701	-0,104	0,466	0,728
$\delta^{15}N$	0,570	-0,090	0,617	0,133	0,667	-0,206	-	-
$\delta^{18}O$	0,018	0,995	0,239	-0,848	0,240	0,644	-0,728	-0,007
δ^2H	0,550	0,022	-0,465	-0,481	0,077	0,730	0,502	-0,686

^a δ : enriquecimento das razões isotópicas dos elementos carbono ($\delta^{13}C$), nitrogênio ($\delta^{15}N$), oxigênio ($\delta^{18}O$) e hidrogênio (δ^2H) de uma amostra, em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil.

Foram utilizados os períodos de 55 dias de fornecimento da dieta contendo cama de aviário, e 35 dias após a substituição da dieta cama pela dieta vegetal, pois dados publicados indicam que a incorporação e estabilização do valor isotópico da dieta no leite podem ocorrer entre 3 a 12 dias (Boutton, Tyrrell, Patterson, Varga, & Klein, 1988; Braun, Schneider, Auerswald, Bellof, & Schnyder, 2013; Knobbe et al., 2006).

As relações entre os pares isotópicos representadas nos gráficos de dispersão (Fig. 2) demonstraram a possibilidade de rastrear o leite proveniente de animais alimentados com cama de aviário, principalmente quando utilizadas as razões isotópicas de nitrogênio-15.

No soro do leite, os valores isotópicos médios iniciais (n=12) de $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, $\delta^{18}O$ e δ^2H antes do início experimental foram de -12,7‰, 9,9‰, 32,3‰ e 999,7‰, respectivamente. Os valores de $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, $\delta^{18}O$ e δ^2H apresentaram o mesmo comportamento do leite.

A análise de componentes principais do soro do leite representou 84% da informação dos dados, diferenciando o grupo alimentado com cama de aviário dos

grupos alimentados com a dieta vegetal (Fig. 3). O primeiro componente foi responsável por 57,6% da variação encontrada, sendo o $\delta^{13}\text{C}$ e o $\delta^{15}\text{N}$ as variáveis com maior participação (Tabela 4).

Os gráficos de dispersão dos isótopos presentes no soro do leite representam a possibilidade de rastrear o grupo alimentado com cama de aviário, com maior destaque para as relações contendo $\delta^{15}\text{N}$, apesar do $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^2\text{H}$ também apresentar diferenciação entre os grupos (Fig. 4).

Os valores isotópicos da proteína também apresentaram o mesmo comportamento do leite e do soro do leite, com os valores de $\delta^{13}\text{C}$ diminuindo após fornecimento das dietas experimentais. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram mais negativos no leite e frações quando fornecida a dieta vegetal em comparação à dieta contendo cama de aviário. No entanto, houve um enriquecimento do $\delta^{15}\text{N}$ na proteína coletada dos animais que ingeriram cama de aviário, e um empobrecimento do $\delta^{15}\text{N}$ na proteína daqueles alimentados com a dieta vegetal. Assim como no leite e soro do leite, os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e o $\delta^2\text{H}$ permaneceram semelhantes (Tabela 3).

A inclusão de cama de aviário na dieta dos animais também foi detectada pela análise de componentes principais da proteína do leite (Fig. 5). A representatividade da análise foi de 66,7%, com maior participação do primeiro componente, contribuindo com 40,5% da variação encontrada, sendo o $\delta^{13}\text{C}$ e o $\delta^{15}\text{N}$ as variáveis com maior participação (Tabela 4).

As relações isotópicas da proteína do leite tiveram maior destaque na rastreabilidade da inclusão da cama de aviário em dietas de bovinos quando o nitrogênio-15 foi representado nos gráficos de dispersão (Fig. 6).

A análise dos isótopos da gordura do leite não possibilitou diferenciar os grupos estudados (Fig. 7). A baixa quantidade de nitrogênio na composição da gordura impossibilitou a análise dos isótopos de nitrogênio nessa fração, prejudicando a identificação das dietas (Fig. 8), pois nas amostras de leite, soro do leite e proteína, o nitrogênio-15 foi fundamental na distinção entre as dietas.

4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, as análises de componentes principais do leite e suas frações soro e proteína permitiram diferenciar o grupo alimentado com cama de aviário dos grupos alimentados com a dieta vegetal. O carbono-13 e o nitrogênio-15 foram os principais responsáveis por essa diferenciação pela análise de componentes principais dos isótopos estáveis do leite, soro do leite e proteína. Os isótopos de oxigênio e hidrogênio tiveram pouca representatividade nos resultados das análises de componentes principais.

As representações dos pares isotópicos do leite e suas frações (soro e proteína) nos gráficos de dispersão permitiram rastrear as amostras provenientes de animais alimentados com cama de aviário, principalmente quando utilizado o $\delta^{15}\text{N}$.

Dentre os componentes animais avaliados, o leite é o mais indicado na rastreabilidade do uso da cama de aviário na alimentação de bovinos leiteiros, pois em comparação às suas frações, obteve a maior representatividade dos dados isotópicos, além de diminuir a etapa de centrifugação, sendo indicadas as análises isotópicas de carbono-13 e nitrogênio-15.

Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de rastrear a presença da cama de aviário na dieta de animais, pela análise isotópica do leite e suas frações (soro e proteína), indicando que esses componentes refletem os valores isotópicos das dietas dos bovinos leiteiros, surgindo como nova ferramenta na fiscalização e controle de qualidade dos alimentos.

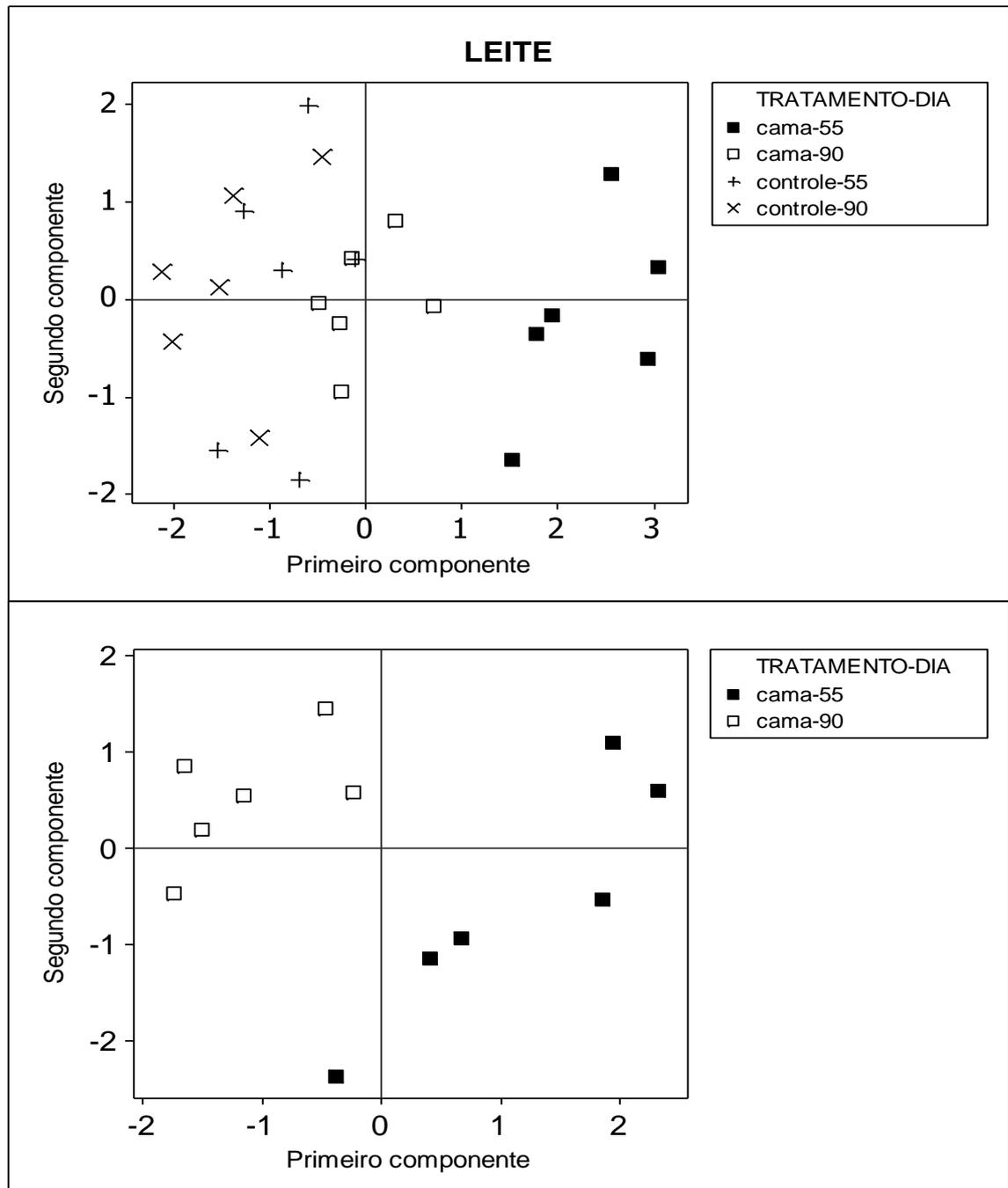


Fig. 1. Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e hidrogênio ($\delta^2\text{H}$), do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

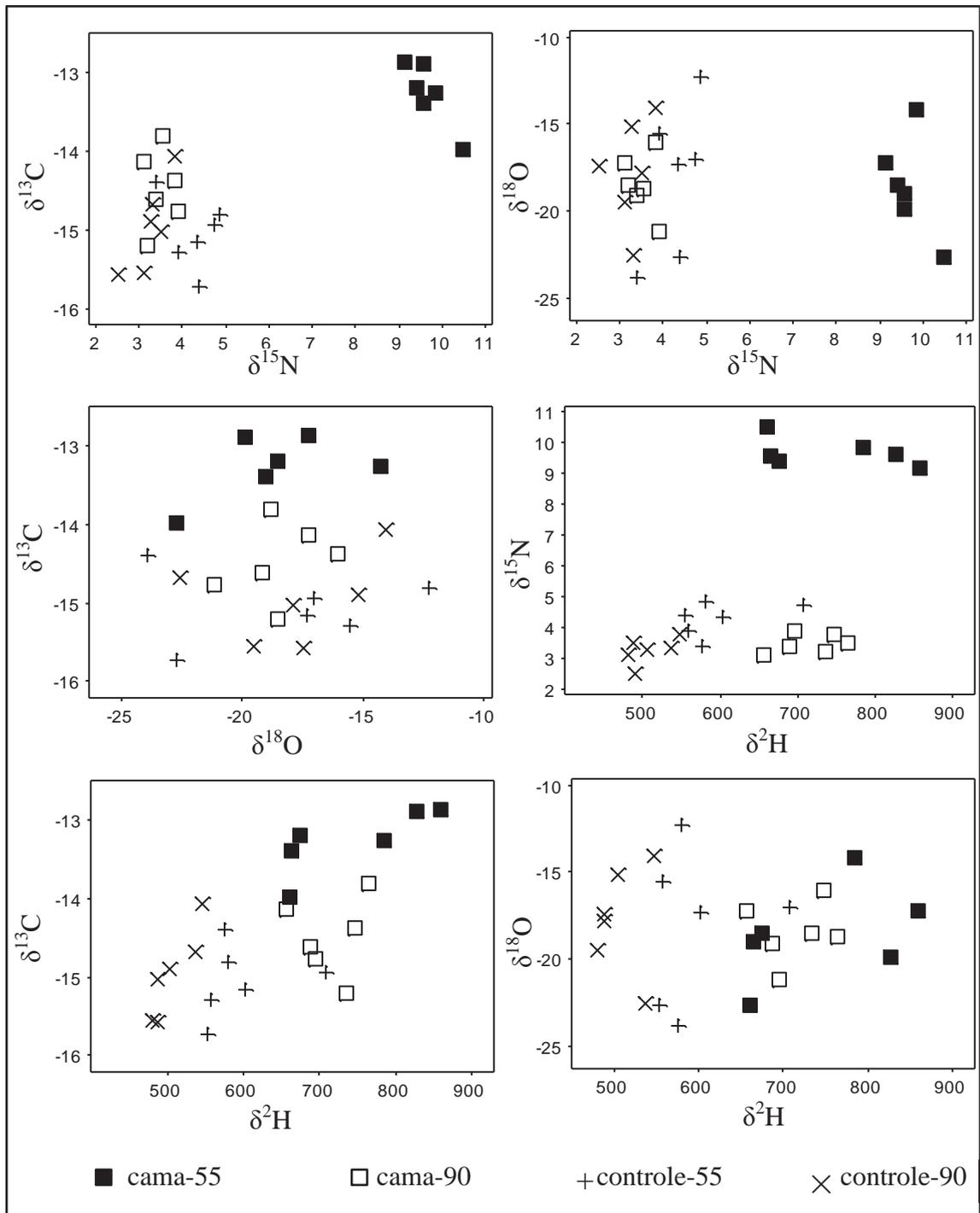


Fig. 2. Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo período experimental) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

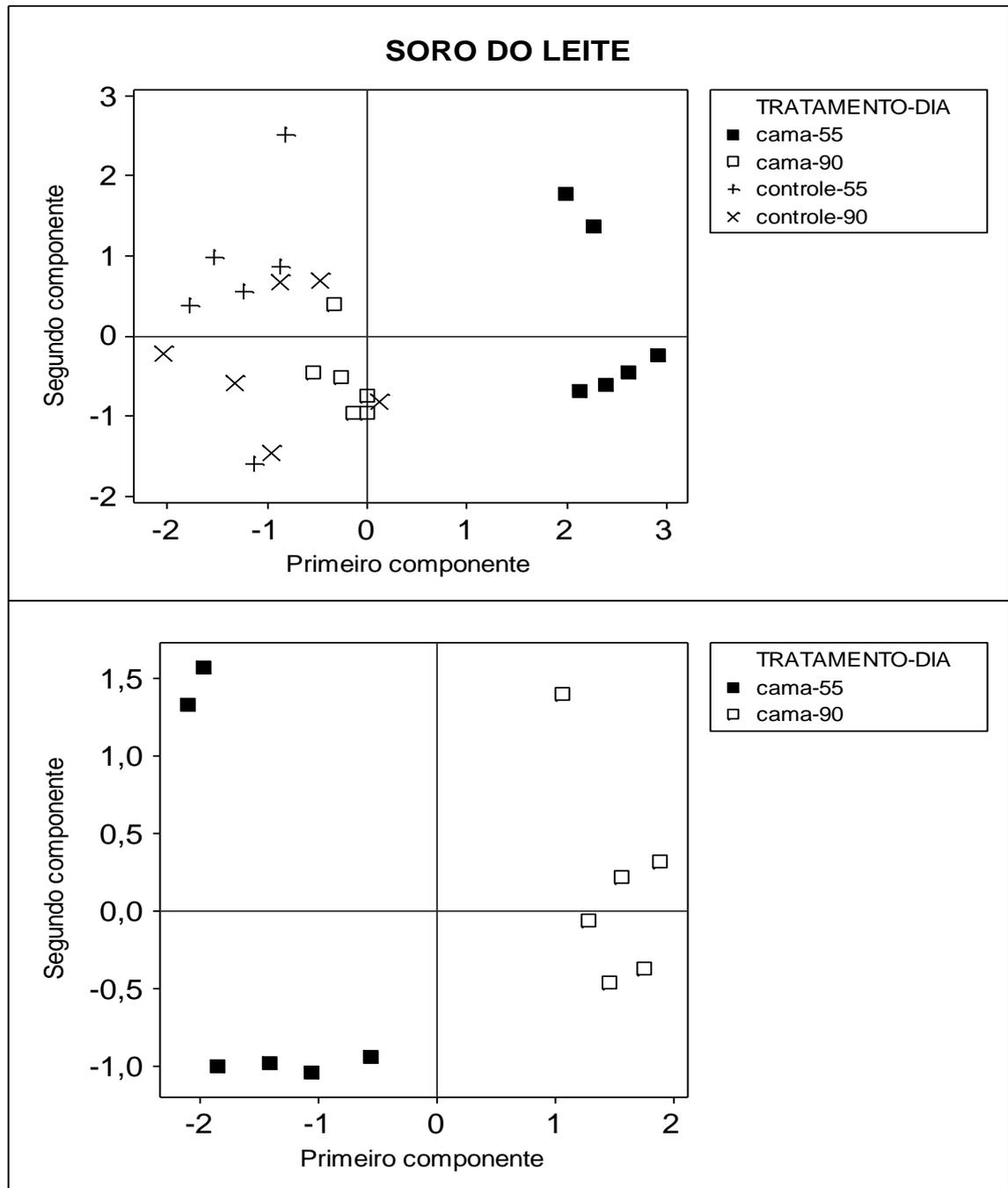


Fig. 3. Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

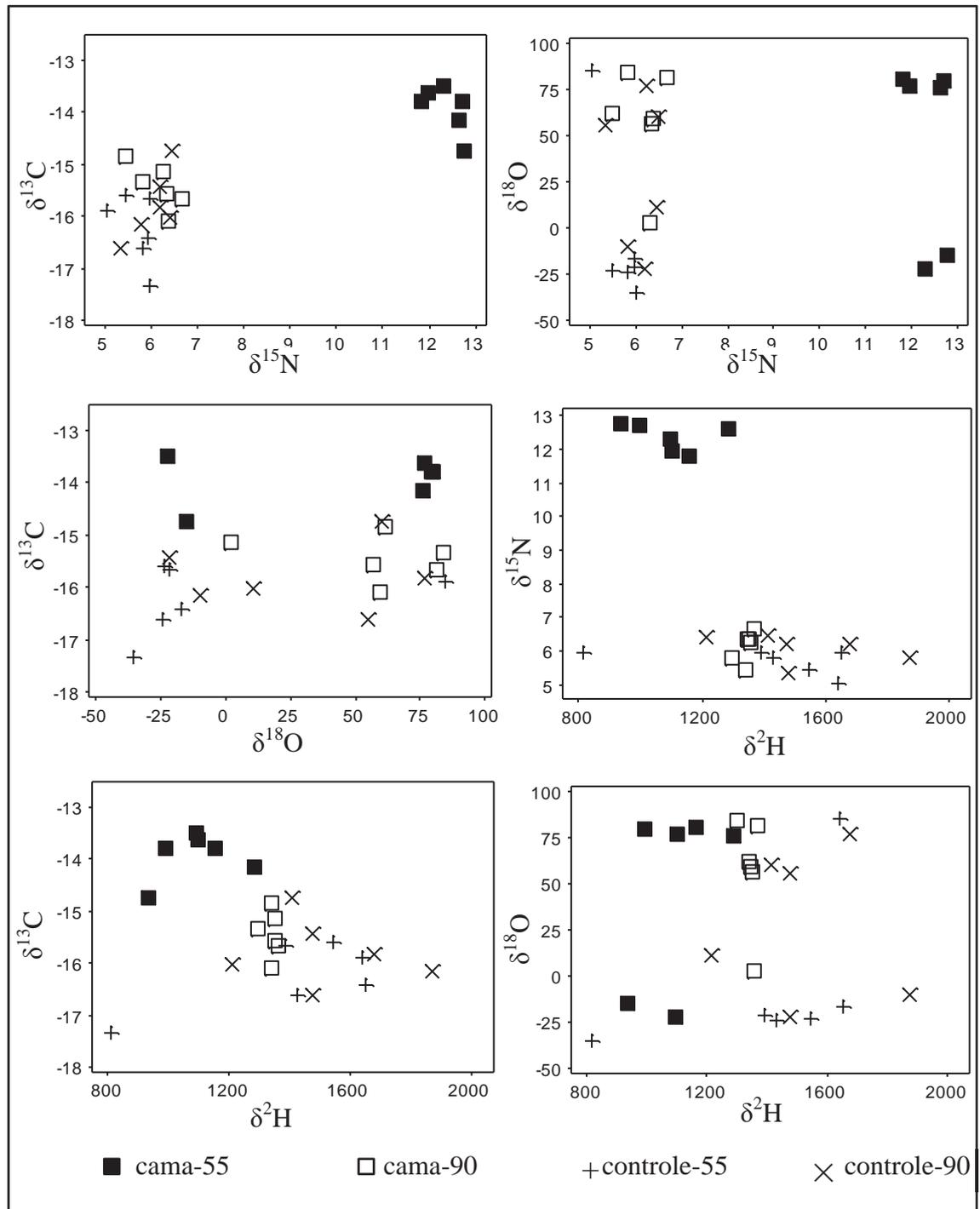


Fig. 4. Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

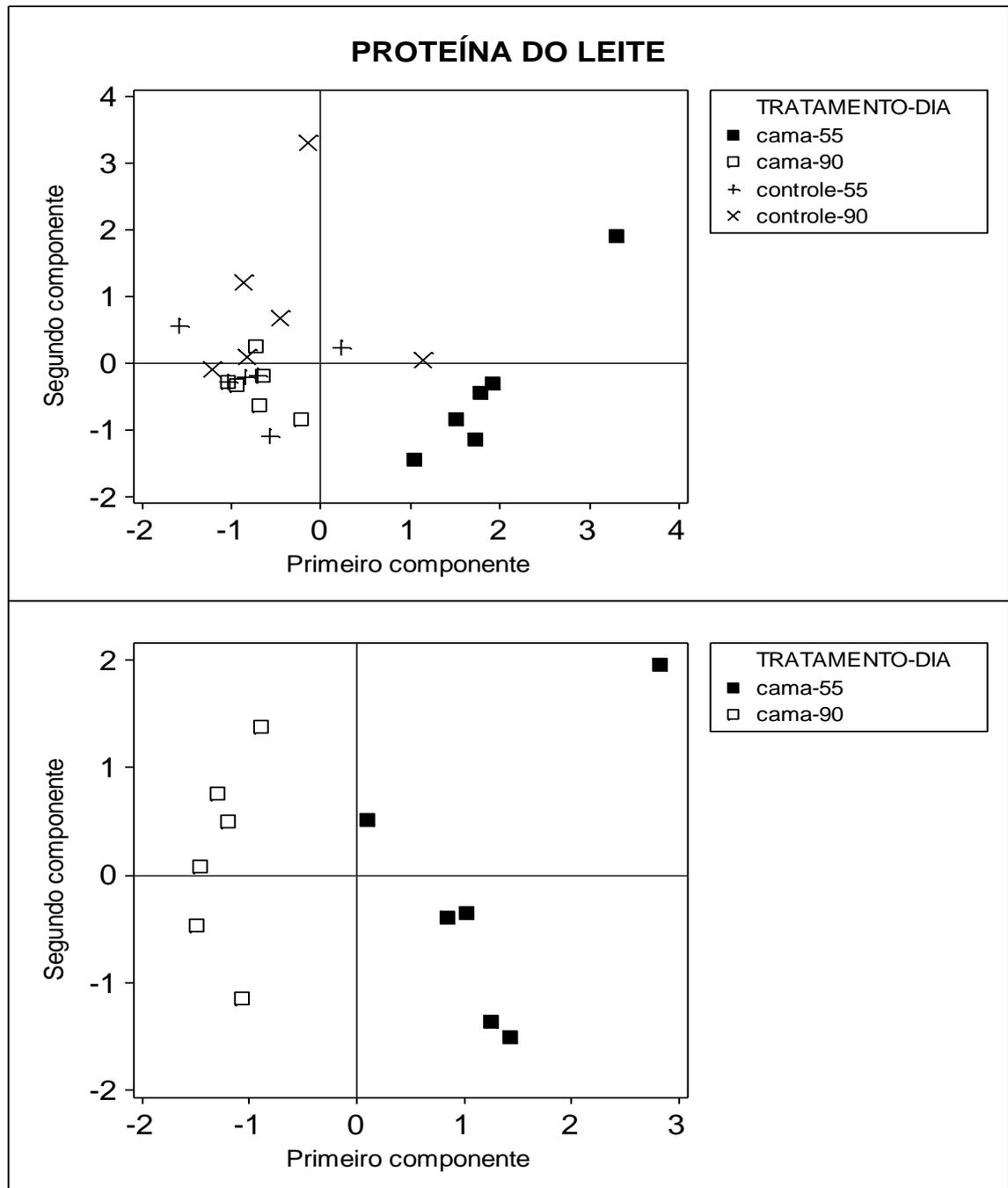


Fig. 5. Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da proteína do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

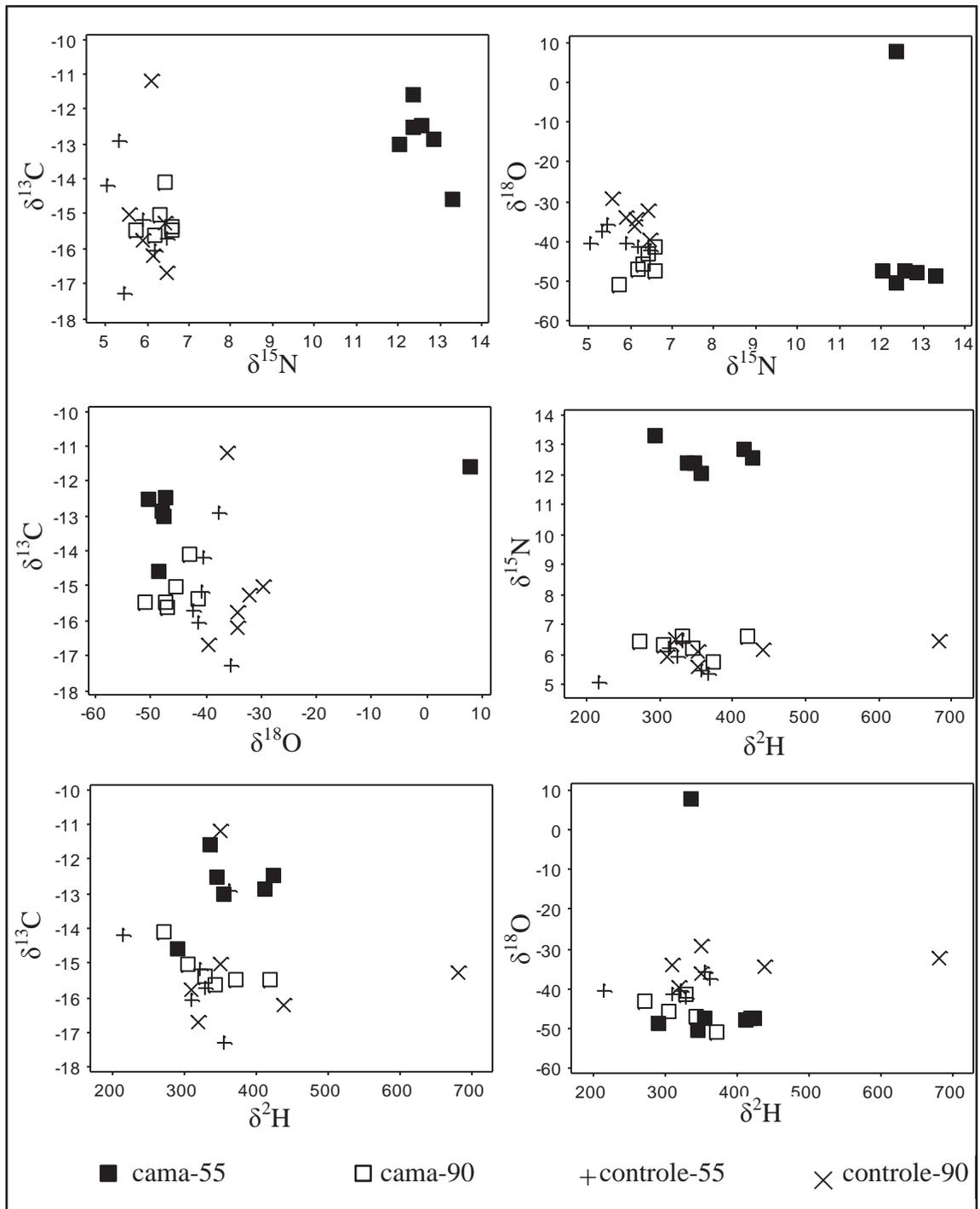


Fig. 6. Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da proteína do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

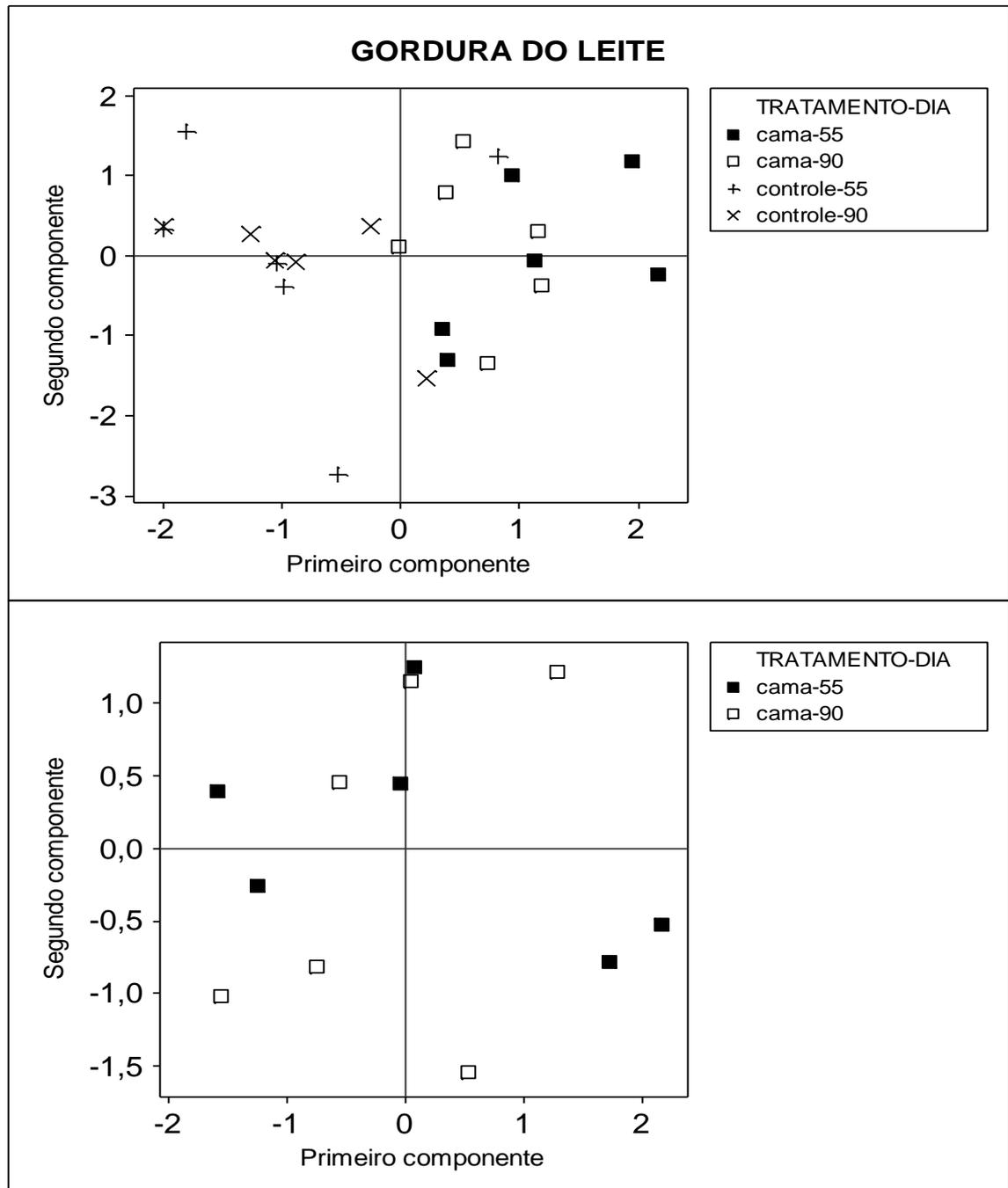


Fig. 7. Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da gordura do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

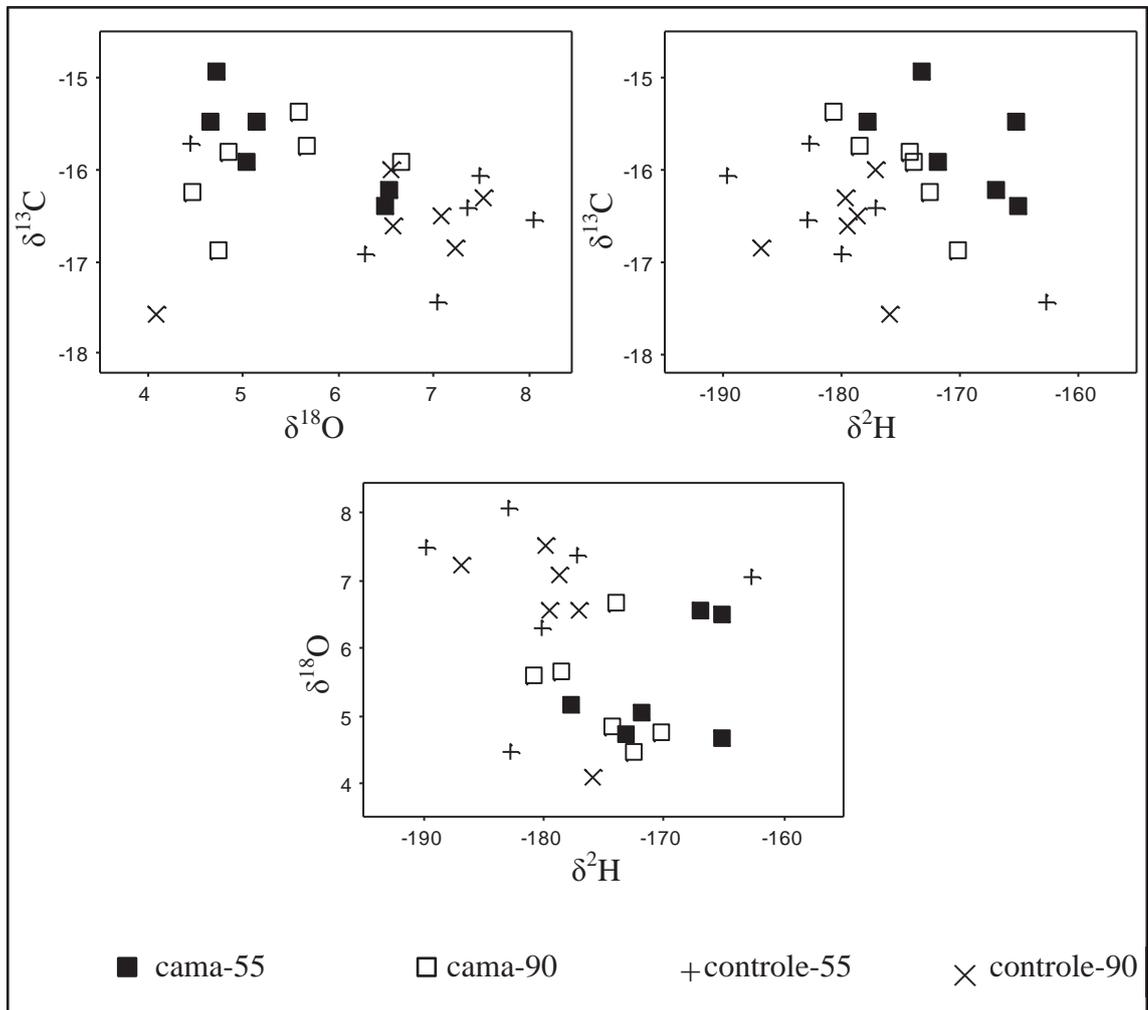


Fig. 8. Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), da gordura do leite coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

5. Referências

Bánáti, D. Consumer response to food scandals and scares. (2011). *Trends in Food Science & Technology*, 22, 56-60.

Boutton, T. W., Tyrrell, H. F., Patterson, B. W., Varga, G. A., & Klein, P. D. (1988). Carbon kinetics of milk formation in holstein cows in late lactation. *Journal of Animal Science*, 66, 2636-2645.

Braun, A., Schneider, S., Auerswald, K., Bellof, G., & Schnyder, H. (2013). Forward modeling of fluctuating dietary ^{13}C signals to validate ^{13}C turnover models of milk and milk components from a diet-switch experiment. *PloS One*, 8, e85235.

FAO. (2013). *Production of Top 5 producers of cow milk, whole, fresh, in 2012*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>>. Acessado em: 08/03/2015.

Hon, K. L., & Leung, T. F. (2014). Issues associated with formula milk: the Hong Kong's experience. *World Journal of Pediatrics*, 10, 5-6.

Hueston, W. D. (2013). BSE and variant CJD: Emerging science, public pressure and the vagaries of policy-making. *Preventive Veterinary Medicine*, 109, 179-184.

Knobbe, N., Vogl, J., Pritzkow, W., Panne, U., Fry, H., Lochotzke, H. M., & Preiss-Weigert, A. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. (2006) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 104-108.

Krüger, M., Grosse-Herrenthe, A., Schrödl, W., Gerlach, A., & Rodloff, A. (2012). Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany e Prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust. *Anaerobe*, 18, 221-223.

NRC. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle (7th ed.). Washington, DC, USA: National Academy Press.

Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology And Systematics*, 18, 293-320.

Prache, S., Cornu, A., Berdagué, J. L., & Priolo, A. (2005). Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research*, 59, 157-168.

Scampicchio, M., Mimmo, T., Capici, C., Huck, C., Innocente, N., Drusch, S., & Cesco, S. (2012). Identification of milk origin and process-induced changes in milk by stable isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11268-11273.

Smith, P. G., & Bradley, R. (2003) Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *British Medical Bulletin*, 66, 185-198.

Sun, S., Guo, B., Wei, Y., & Fan, M. (2012). Classification of geographical origins and prediction of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of lamb meat by near infrared reflectance spectroscopy. *Food Chemistry*, 135, 508-514.

União Europeia. (2010). Directiva 63/2010/UE de 22 de setembro de 2010 do parlamento europeu e do conselho relativa à proteção de animais utilizados para fins científicos. *Jornal Oficial da União Europeia*, 276, 33-79.

Xiu, C., & Klein, K. K. (2010). Melamine in milk products in China: Examining the factors that led to deliberate use of the contaminant. *Food Policy*, 35, 463-470.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

CAPÍTULO 3

12

RASTREABILIDADE DA CAMA DE AVIÁRIO EM BOVINOS

13

LEITEIROS PELA ANÁLISE MULTI-ISOTÓPICA DE SANGUE E

14

FEZES

1 **Rastreabilidade da cama de aviário em bovinos leiteiros pela análise**
2 **multi-isotópica de sangue e fezes**

3

4 **Resumo**

5

6 A alteração dos valores isotópicos ocasionados pela inclusão da cama de
7 aviário na dieta de vacas leiteiras foi avaliada pela análise multi-isotópica de sangue,
8 plasma, soro sanguíneo e fezes, para verificar quais as variáveis mais indicadas no
9 processo de rastreabilidade. Entre todas as amostras utilizadas, a análise das fezes
10 permitiu a melhor distinção entre o grupo alimentado com cama de aviário e aqueles
11 alimentados com a dieta vegetal, possibilitando a rastreabilidade do grupo alimentado
12 com cama de aviário pela relação de qualquer par isotópico nos gráficos de dispersão.
13 Dentre o sangue e suas frações, a análise do plasma é a mais indicada, apresentando a
14 maior representatividade dos resultados. O $\delta^{15}\text{N}$ e o $\delta^{13}\text{C}$ tiveram mais
15 representatividade nas análises de componentes principais, sendo os isótopos mais
16 indicados nessa rastreabilidade. Os resultados indicam que a técnica dos isótopos
17 estáveis pode ser utilizada na detecção do uso da cama de aviário na dieta de vacas
18 leiteiras, principalmente pela análise das fezes, podendo ser complementada pela análise
19 isotópica do plasma, auxiliando assim na rastreabilidade desse resíduo.

20

21 **Palavras-chave:** rastreabilidade, vacas leiteiras, cama de aviário, fezes, plasma, sangue,
22 soro

1. Introdução

Após a crise da encefalopatia espongiforme bovina (EEB), ou mal da vaca louca, ocorrida na década de 90, foi proibido o uso de proteínas de mamíferos na alimentação de ruminantes, com intuito de controlar e erradicar essa doença (Comissão Europeia, 2001), sendo posteriormente ampliada a proibição para o uso de todo alimento que contivesse qualquer proteína animal em sua composição (União Europeia, 2005).

Dentre os subprodutos de origem animal, a cama de aviário se enquadra na proibição, pois geralmente contem resíduos de farinha de carne e ossos bovinos. No entanto, há indícios do uso da cama de aviário na alimentação de ruminantes, por conter mais de 20% de proteína bruta em sua composição. Além dos riscos sanitários do uso da cama de aviário, a ocorrência de um caso clássico de vaca louca poderia causar perdas econômicas, como o prejuízo de 10 bilhões de dólares gerados ao Reino Unido pela crise da vaca louca (Bánáti, 2011).

Atualmente, a Comunidade da União Europeia recomenda os métodos de microscopia eletrônica e reação de polimerização em cadeia (PCR) para a detecção de constituintes de origem animal no alimento fornecido a ruminantes (União Europeia, 2013). No entanto, a eficácia dessas técnicas está condicionada à coleta da alimentação fornecida aos animais, que pode ser facilmente alterada antes da fiscalização.

Assim, um método que permita detectar o uso de um alimento proibido pela análise do sangue e fezes dos animais seria mais eficaz, visto que dificultaria a adulteração no momento da fiscalização. Algumas pesquisas indicam que o uso dos isótopos estáveis possibilita a rastreabilidade de dietas pela análise dos componentes dos animais que a ingeriram, tornando possível rastrear a inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação de ruminantes.

No entanto, são escassos os estudos de rastreabilidade de subprodutos proibidos na alimentação de ruminantes. Portanto o objetivo do trabalho foi rastrear a inclusão da cama de aviário na dieta de ruminantes, pela análise dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$) no sangue, soro sanguíneo, plasma sanguíneo e fezes de vacas leiteiras e verificar quais as variáveis mais indicadas para auxiliar no processo de rastreabilidade.

1 **2. Materiais e métodos**

2

3 A pesquisa foi realizada no Setor de Bubalinos da Fazenda Experimental
 4 Lageado, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus
 5 Botucatu/SP. Foram utilizadas 12 vacas girolando em período de lactação, distribuídas
 6 em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e dois tratamentos,
 7 avaliadas por 90 dias. Durante 15 dias, anteriormente ao período experimental, foi
 8 realizada a adaptação dos animais ao consumo de silagem. As dietas experimentais
 9 foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais dos animais (NRC, 2001)
 10 (Tabela 1).

11

12 **Tabela 1**

13 Composição percentual, valor isotópico (n=3) e desvio padrão das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas	
	Cama de aviário	Vegetal
Silagem de milho	40	70
Silagem de grão úmido de milho	10	15
Farelo de soja	-	15
Cama de aviário	50	-
Total	100	100
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) ^a	-17,4±0,4	-13,7±0,1
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	10,5±0,1	3,0±0,0
$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	11,6±0,0	13,0±0,0
$\delta^2\text{H}$ (‰)	19,3±1,6	1,2±0,7

14 ^a δ : enriquecimento das razões isotópicas dos elementos carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio
 15 ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) de uma amostra, em relação ao padrão
 16 internacional desse elemento, em partes per mil.

17

18 O projeto foi autorizado pela Coordenadoria da Raiva dos Herbívoros e das
 19 Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (CRHE), subordinada ao Ministério da
 20 Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Informação CRHE n° 79/2013

1 (Anexo 1), sob n° de processo 21052.009187/2013-02, além de ser aprovado pela
 2 Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e
 3 Zootecnia, UNESP, campus de Botucatu/SP sob n° 152-2013 (Anexo 2), sendo
 4 realizado de acordo com a Diretiva 63/2010 (União Europeia, 2010). Os animais que
 5 ingeriram cama de aviário foram identificados individualmente com brincos, sendo
 6 eutanasiados após o término do experimento, com posterior incineração. Todos os
 7 procedimentos foram acompanhados por Fiscais Federais do MAPA.

8 Os animais foram divididos em tratamento controle e tratamento cama de
 9 aviário. Os animais do tratamento controle receberam a dieta vegetal durante o primeiro
 10 e segundo período experimental, enquanto os animais do tratamento cama de aviário
 11 foram alimentados com a dieta cama de aviário durante o primeiro período
 12 experimental, com duração de 55 dias, alterando para a dieta vegetal durante o segundo
 13 período, que se prolongou por 35 dias (Tabela 2).

14

15 **Tabela 2**

16 Cronograma de dietas fornecidas durante período experimental.

Tratamento	Período experimental	
	1° (1 a 55 dias)	2° (55 a 90 dias)
Cama de aviário	Dieta cama de aviário	Dieta vegetal
Controle	Dieta vegetal	Dieta vegetal

17

18 As vacas eram alimentadas duas vezes ao dia (8:00 h e 16:00 h), *ad libitum*,
 19 permitindo sobras de até 10% na matéria natural. A ordenha era realizada manualmente,
 20 às 6:00 h, com média de 6 litros de leite/vaca/dia. As coletas das amostras de sangue e
 21 fezes foram realizadas nos dias 1, 55 e 90, logo após a ordenha dos animais.

22 As amostras de sangue foram coletadas da veia coccígea dos animais com
 23 auxílio de agulha e tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA para amostragens de
 24 sangue total e plasma, e sem anticoagulante para a amostragem de soro sanguíneo. Após
 25 a coleta, o sangue foi centrifugado a 1500 g por 10 min a temperatura ambiente, para
 26 obtenção do plasma e do soro. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da
 27 ampola retal dos animais, sendo secas em estufa de ventilação forçada (MA035,

1 Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) e moídas em moinho criogênico (Geno/Grinder 2010;
2 Spex Sample Prep LLC, Metuchen, NJ, EUA).

3 Todas as amostras foram armazenadas em microtubos, a -20 °C, após a coleta e
4 processamento. Depois de descongeladas, as amostras sólidas foram pesadas em balança
5 de precisão (MX5, Mettler Toledo, Suíça), e as amostras líquidas foram pipetadas.

6 As amostras de sangue, plasma e soro, foram pipetadas nas quantidades de 2, 6
7 e 6 µL para as análises de nitrogênio, respectivamente, enquanto foram utilizados os
8 volumes de 0,2 µL para as análises de carbono, e acondicionadas em cápsulas de
9 estanho, para os dois isótopos mencionados. Para as análises de carbono e nitrogênio
10 nas fezes foram utilizados intervalos de massa de 100 a 120 µg e de 4000 a 4500 µg,
11 respectivamente.

12 Para as análises de oxigênio e deutério, foram utilizadas as mesmas
13 quantidades de amostra, colocadas em cápsulas de prata, nos volumes de 0,2 µL para
14 sangue e soro sanguíneo, e de 0,4 µL para plasma, e nas massas de 100 a 150 µg para
15 fezes.

16 As análises isotópicas foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis
17 Ambientais do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu/SP, pelo
18 espectrômetro de massas de razão isotópica (Finnigan DELTA-V; Thermo Fisher
19 Scientific Inc., Bremen, Alemanha) acoplado ao analisador elementar (Flash 2000
20 Organic EA for IRMS; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha). A razão do
21 enriquecimento isotópico foi obtida pela equação 1 (Peterson & Fry, 1987).

22

$$23 \quad \delta X_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \quad (1)$$

24

25 Onde:

26 - $\delta X(\text{amostra, padrão})$ é o enriquecimento da razão isotópica do elemento de uma
27 amostra em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil (‰).

28 - R é a razão isotópica do isótopo pesado em relação ao leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$,
29 $^2\text{H}/^1\text{H}$) da amostra e do padrão, respectivamente.

30

31 Foram utilizados os padrões PDB e N₂ do ar atmosférico para o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$,
32 respectivamente, e o padrão SMOW para as análises de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$.

1 As razões isotópicas obtidas foram submetidas à análise de componentes
2 principais pela matriz de correlação, no programa Minitab 16 (Minitab Inc., Statte
3 College, PA, 2010), para verificar o isótopo com maior influência na rastreabilidade da
4 cama de aviário pela análise do sangue, soro, plasma e fezes, além de avaliar diferentes
5 grupos de resposta. Os dados isotópicos também foram dispostos em gráficos de
6 dispersão, para verificar a possibilidade de rastrear o grupo alimentado com cama de
7 aviário.

8

9 **3. Resultados e discussão**

10

11 O ingrediente cama de aviário utilizado na dieta continha valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$,
12 $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ de -19,6‰, 10,6‰, 1,22‰ e 125,1‰, respectivamente, o que diminuiu os
13 valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$, e aumentou os valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^2\text{H}$ da dieta cama de
14 aviário em comparação à dieta vegetal (Tabela 1).

15 O valor isotópico inicial médio (n=12) do $\delta^{13}\text{C}$ do sangue foi -14‰, não
16 havendo alterações após 55 dias de alimentação com as dietas experimentais. No
17 tratamento controle foi observada uma diminuição no $\delta^{13}\text{C}$ após 90 dias de
18 fornecimento da dieta vegetal, indicando que os 55 dias de fornecimento da dieta cama
19 de aviário no primeiro período e os 35 dias após substituição das dietas não foram
20 suficientes para alterar os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ no sangue (Tabela 3).

21 Nas frações sanguíneas de soro e plasma dos animais alimentados com a dieta
22 vegetal houve empobrecimento do $\delta^{13}\text{C}$, enquanto não foi alterado quando fornecida a
23 dieta contendo cama de aviário. Nas fezes houve diminuição do carbono-13 em todas as
24 coletas, com maior empobrecimento nas fezes das vacas ingerindo cama de aviário.

25 Apesar do menor valor de $\delta^{13}\text{C}$ observado na dieta cama de aviário em relação
26 à dieta vegetal (Tabela 1), os valores de $\delta^{13}\text{C}$ no sangue, plasma e soro dos animais
27 alimentados com a dieta cama de aviário foram maiores que daqueles alimentados com
28 a dieta vegetal, sugerindo que os animais alimentados com cama de aviário tiveram
29 menor aproveitamento do alimento ingerido.

30 Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de sangue, soro e plasma também não foram
31 alterados após 55 dias de fornecimento da cama de aviário, enquanto houve uma
32 diminuição após o fornecimento da dieta vegetal (Tabela 3). No entanto, houve um

1 enriquecimento do nitrogênio-15 nas fezes das vacas alimentadas com cama de aviário
2 enquanto houve um empobrecimento nas fezes das vacas que ingeriam a dieta vegetal.

3 Os comportamentos isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ indicam que os períodos de 55
4 dias de fornecimento da dieta contendo cama de aviário, e de 35 dias após a substituição
5 da dieta cama pela dieta vegetal, não foram suficientes para que ocorresse a
6 incorporação do valor isotópico da nova dieta no sangue, soro e plasma das vacas
7 leiteiras avaliadas.

8 As razões isotópicas de oxigênio-18 no sangue e suas frações, e nas fezes após
9 fornecimento das dietas experimentais permaneceram semelhantes aos valores iniciais,
10 com exceção do plasma dos animais do tratamento controle onde ocorreu uma
11 diminuição do $\delta^{18}\text{O}$. Os valores de hidrogênio tiveram grande variabilidade em todas as
12 amostras avaliadas, não apresentando uma tendência coerente (Tabela 3).

13 A análise de componentes principais dos isótopos do sangue representou
14 79,8% da informação contida nos dados. O primeiro componente foi responsável por
15 52,5% da variação encontrada, sendo o $\delta^{15}\text{N}$ e o $\delta^{13}\text{C}$ as variáveis com maior influência
16 (Tabela 4), possibilitando diferenciar entre os animais alimentados com cama de aviário
17 (cama-55) e os animais alimentados com a dieta vegetal experimental (Fig. 1). Os
18 gráficos de dispersão dos isótopos do sangue (Fig. 2) demonstram a possibilidade de
19 rastrear o uso da cama de aviário na dieta de bovinos leiteiros, principalmente quando
20 utilizadas as razões isotópicas de nitrogênio-15, e pela relação $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^2\text{H}$.

21 Pelos isótopos estáveis do soro sanguíneo também foi possível diferenciar o
22 grupo alimentado com cama de aviário dos animais alimentados com a dieta vegetal
23 experimental, pela análise de componentes principais (Fig. 3), que representou 85,1%
24 da informação contida nos dados. O primeiro componente foi responsável por 65,4% da
25 variação encontrada, com maior influência do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela 4).

26 As representações gráficas dos pares isotópicos do soro sanguíneo também
27 demonstraram a possibilidade de rastrear o grupo alimentado com cama de aviário (Fig.
28 4) quando as razões isotópicas de nitrogênio-15 foram relacionadas com os demais
29 isótopos avaliados e pela relação $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^2\text{H}$, como ocorrido nos dados isotópicos do
30 sangue (Fig. 2).

1 A análise de componentes principais dos isótopos estáveis do plasma também
 2 distinguiu os animais alimentados com cama de aviário dos animais alimentados com a
 3 dieta vegetal experimental (Fig. 5), com 93,9% de representatividade.

4
 5 **Tabela 3**

6 Valores isotópicos médios (n=6) e desvio padrão do sangue e suas frações, e das fezes
 7 de vacas leiteiras alimentadas ou não com cama de aviário.

δX^a	Amostra	Cama de aviário ^b		Controle ^b	
		55	90	55	90
$\delta^{13}C$	Sangue	-13,5±0,4	-14,8±0,2	-15,7±0,7	-15,9±0,7
	Soro	-13,7±0,3	-15,8±0,8	-15,7±0,7	-15,6±0,7
	Plasma	-13,5±0,2	-15,4±0,5	-15,9±0,7	-16,5±0,6
	Fezes	-19,0±0,6	-14,9±0,5	-14,9±0,4	-15,0±0,3
$\delta^{15}N$	Sangue	10,8±1,1	7,6±0,3	6,0±1,7	5,9±0,3
	Soro	12,1±0,6	7,3±0,4	5,6±0,4	5,4±0,2
	Plasma	11,9±0,5	7,0±0,4	6,1±0,4	5,8±0,5
	Fezes	10,0±0,5	4,6±0,4	5,3±0,4	5,1±0,2
$\delta^{18}O$	Sangue	-65,0±3,3	-65,3±4,0	-64,3±3,7	-61,3±3,2
	Soro	-48,2±21,4	-71,7±7,7	-63,5±4,4	-63,4±10,3
	Plasma	-55,2±3,6	-55,5±4,0	-85,0±5,4	-77,4±5,7
	Fezes	2,3±2,7	8,0±5,3	9,9±3,4	8,0±3,1
δ^2H	Sangue	219,6±37,4	229,8±10,0	87,7±78,9	240,2±24,3
	Soro	263,2±9,2	58,2±62,2	174,9±10,7	243,3±36,2
	Plasma	270,0±13,2	285,3±11,9	106,4±67,4	257,1±31,3
	Fezes	297,5±16,8	67,9±30,5	90,2±9,9	72,0±3,4

8 ^a δ : enriquecimento das razões isotópicas dos elementos carbono ($\delta^{13}C$), nitrogênio
 9 ($\delta^{15}N$), oxigênio ($\delta^{18}O$) e hidrogênio (δ^2H) de uma amostra, em relação ao padrão
 10 internacional desse elemento, em partes per mil.

11 ^b Tratamentos experimentais: 55: amostras coletadas após 55 dias de fornecimento da
 12 dieta cama de aviário ao tratamento cama de aviário e da dieta vegetal ao tratamento
 13 controle; 90: amostras coletadas após 35 dias da troca da dieta cama de aviário pela
 14 dieta vegetal no tratamento cama de aviário.

O primeiro componente da análise de componentes principais dos isótopos do plasma foi responsável por 70,1% da variação encontrada, com maior participação do $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela 4). As relações entre os pares isotópicos representadas nos gráficos de dispersão do plasma contendo $\delta^{13}\text{C}$ ou o $\delta^{15}\text{N}$ demonstram a possibilidade de rastrear o uso da cama de aviário na dieta de bovinos leiteiros (Fig. 6).

O grupo alimentado com cama de aviário também foi distinguido dos animais alimentados com a dieta vegetal experimental, pela análise de componentes principais dos isótopos estáveis das fezes (Fig. 7), que representou 98,7% dos dados analisados. O primeiro componente foi responsável por 85,2% da variação encontrada, com maior participação do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ (Tabela 4). Os gráficos de dispersão das fezes demonstram a possibilidade de rastrear o uso da cama de aviário na dieta de bovinos leiteiros, pela combinação de qualquer dupla de isótopos (Fig. 8).

Tabela 4

Valores de participação das razões isotópicas de carbono, nitrogênio, oxigênio e deutério, no primeiro e segundo componente das análises de componentes principais do sangue, soro, plasma e fezes.

δX	Sangue		Soro		Plasma		Fezes	
	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
$\delta^{13}\text{C}$	0,643	0,024	0,557	-0,291	0,520	-0,454	0,537	-0,069
$\delta^{15}\text{N}$	0,651	-0,085	0,499	-0,601	0,528	-0,417	-0,517	0,377
$\delta^{18}\text{O}$	-0,211	0,792	0,493	0,336	0,539	0,307	0,410	0,889
$\delta^2\text{H}$	0,343	0,603	0,445	0,664	0,401	0,725	-0,525	0,253

Dentre as análises do sangue e suas frações, as relações entre os pares isotópicos do plasma foi o que apresentou a maior quantidade de isótopos relacionados que possibilitam rastrear a inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras (Fig. 6).

Em comparação ao sangue, plasma e soro sanguíneo, as fezes permitiram uma melhor detecção da inclusão da cama de aviário nas dietas dos animais, com melhor agrupamento dos dados nas análises de componentes principais e gráficos de dispersão, indicando menor variabilidade dos dados. Somente nas fezes foi possível a detecção do

1 grupo que ingeriu cama de aviário pela relação de $\delta^{18}\text{O}$ x $\delta^2\text{H}$. Isso se deve à
2 incorporação do valor isotópico nas fezes, que pode ocorrer em até seis dias (Jones,
3 Ludlow, Troughton, & Blunt, 1979), sendo mais rápida que no sangue e suas frações.

4

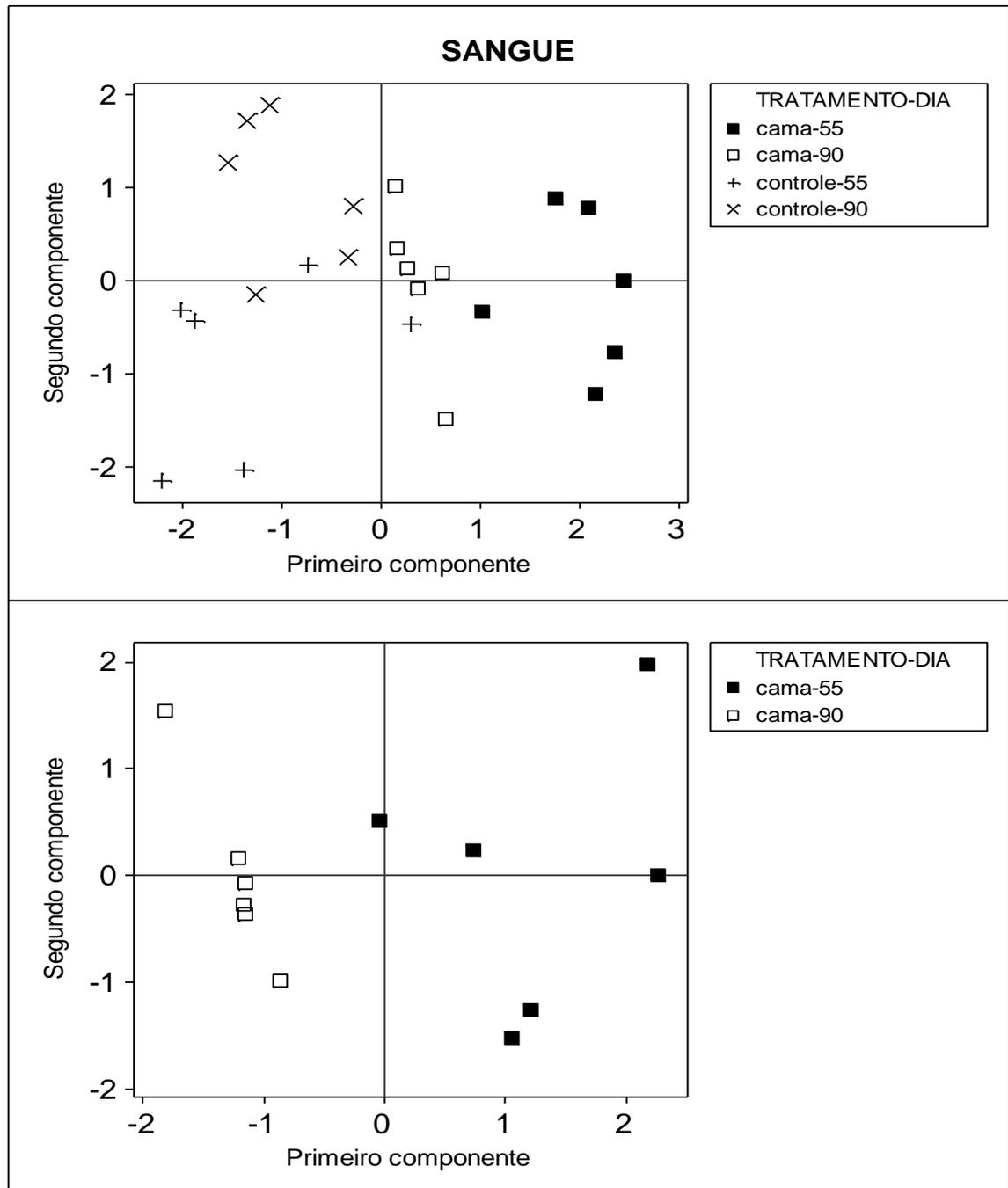
5 **4. Conclusões**

6

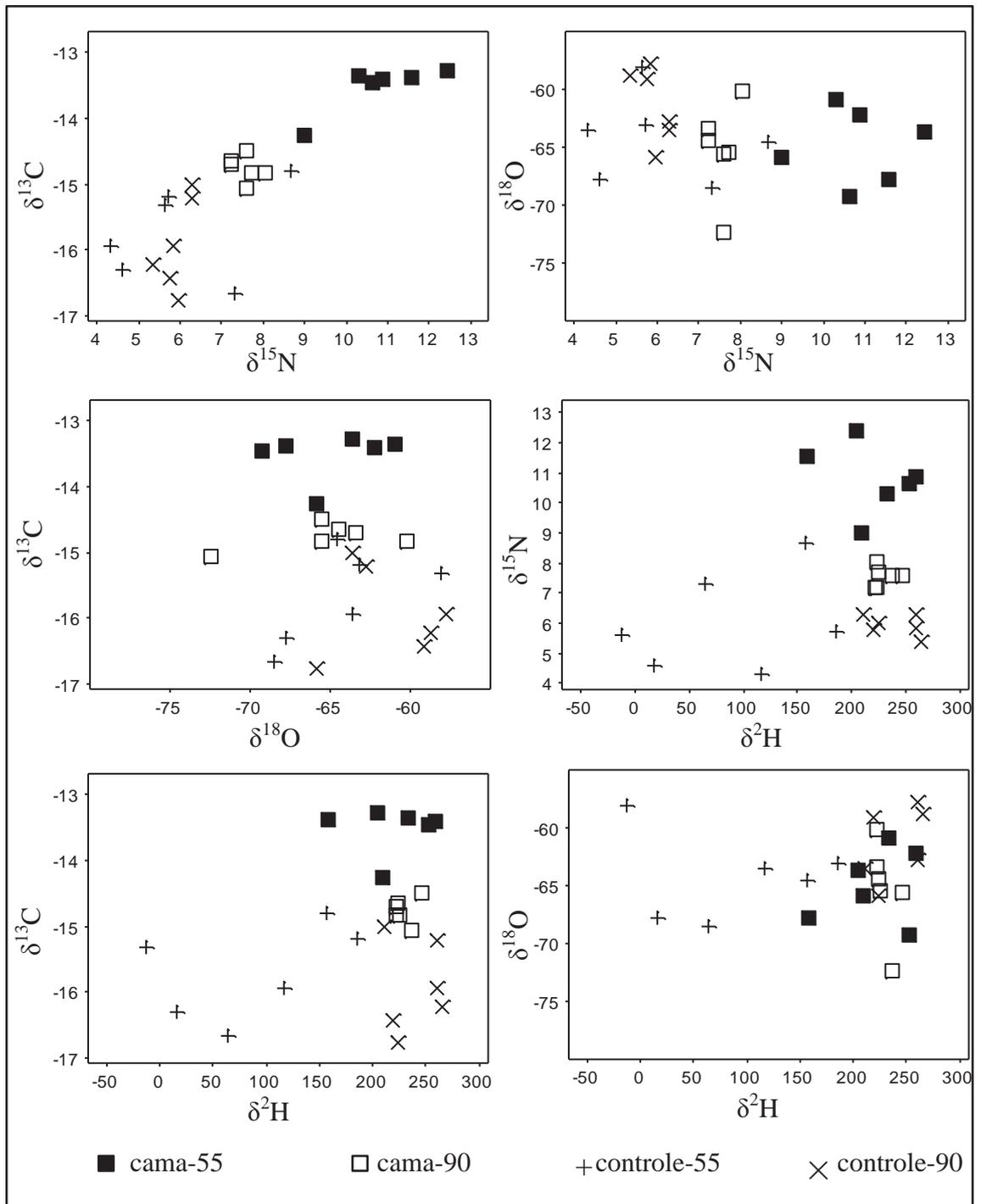
7 O plasma permitiu a diferenciação mais nítida entre as dietas em comparação
8 ao sangue e soro sanguíneo, apresentando a maior representatividade dos dados
9 (93,9%). No entanto, entre todas as amostras utilizadas, a análise das fezes permitiu a
10 melhor distinção entre as amostras provenientes de vacas alimentadas com cama de
11 aviário e aquelas das dietas vegetais, com a possibilidade de rastrear o grupo alimentado
12 com cama de aviário pela relação de qualquer par isotópico nos gráficos de dispersão.

13 Considerando as análises de componentes principais dos isótopos estáveis do
14 sangue, plasma, soro e fezes, o $\delta^{15}\text{N}$ e o $\delta^{13}\text{C}$ tiveram mais representatividade em
15 comparação ao $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$, sendo os isótopos mais indicados nessa rastreabilidade.

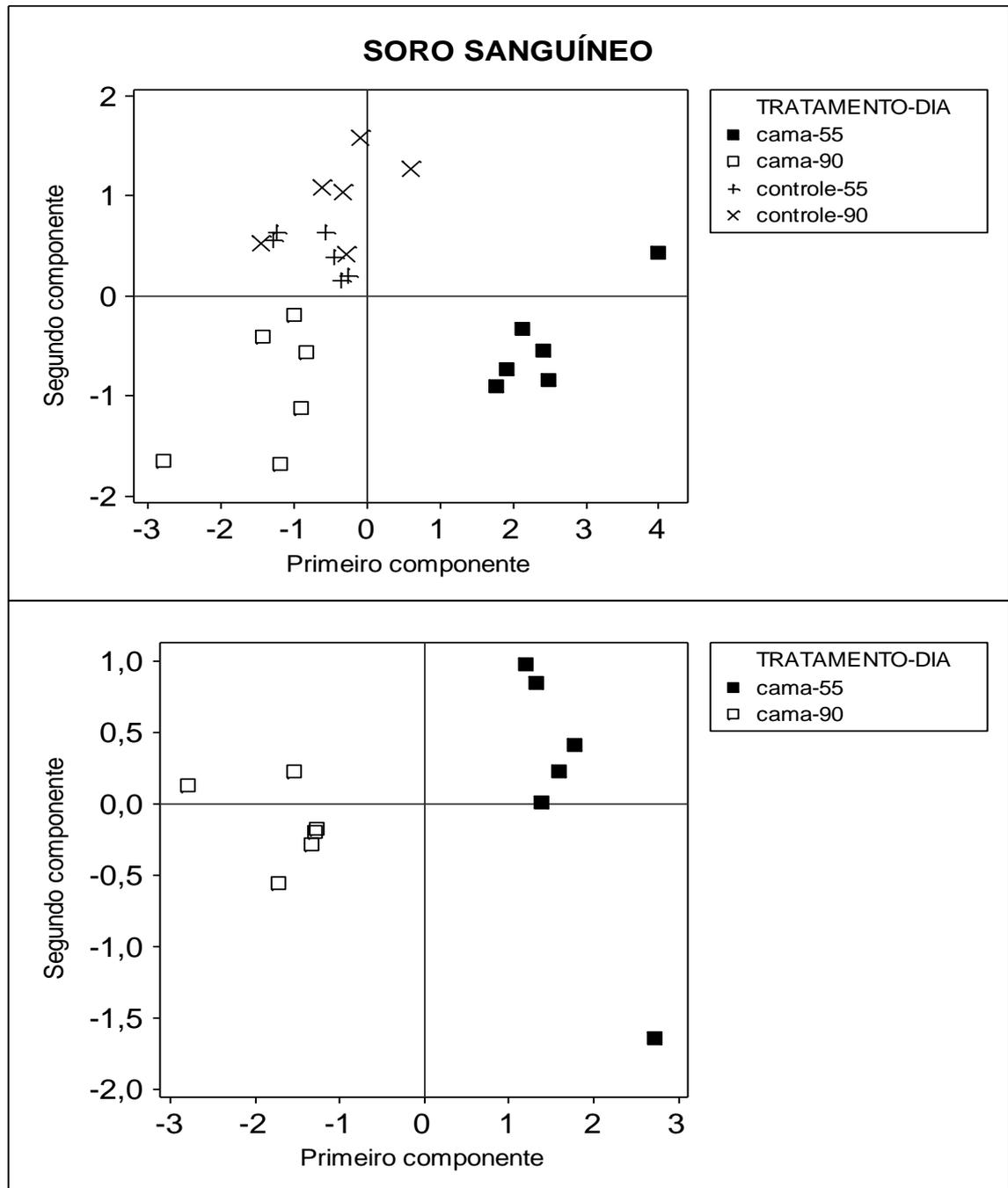
16 Os resultados indicam que a técnica dos isótopos estáveis pode ser utilizada na
17 detecção do uso da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, principalmente pela
18 análise das fezes, podendo ser complementada pela análise isotópica do plasma,
19 auxiliando assim na rastreabilidade desse resíduo.



1 **Fig. 1.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$),
 2 nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do sangue coletado nos dias 55 e 90,
 3 de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento)
 4 e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias,
 5 sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

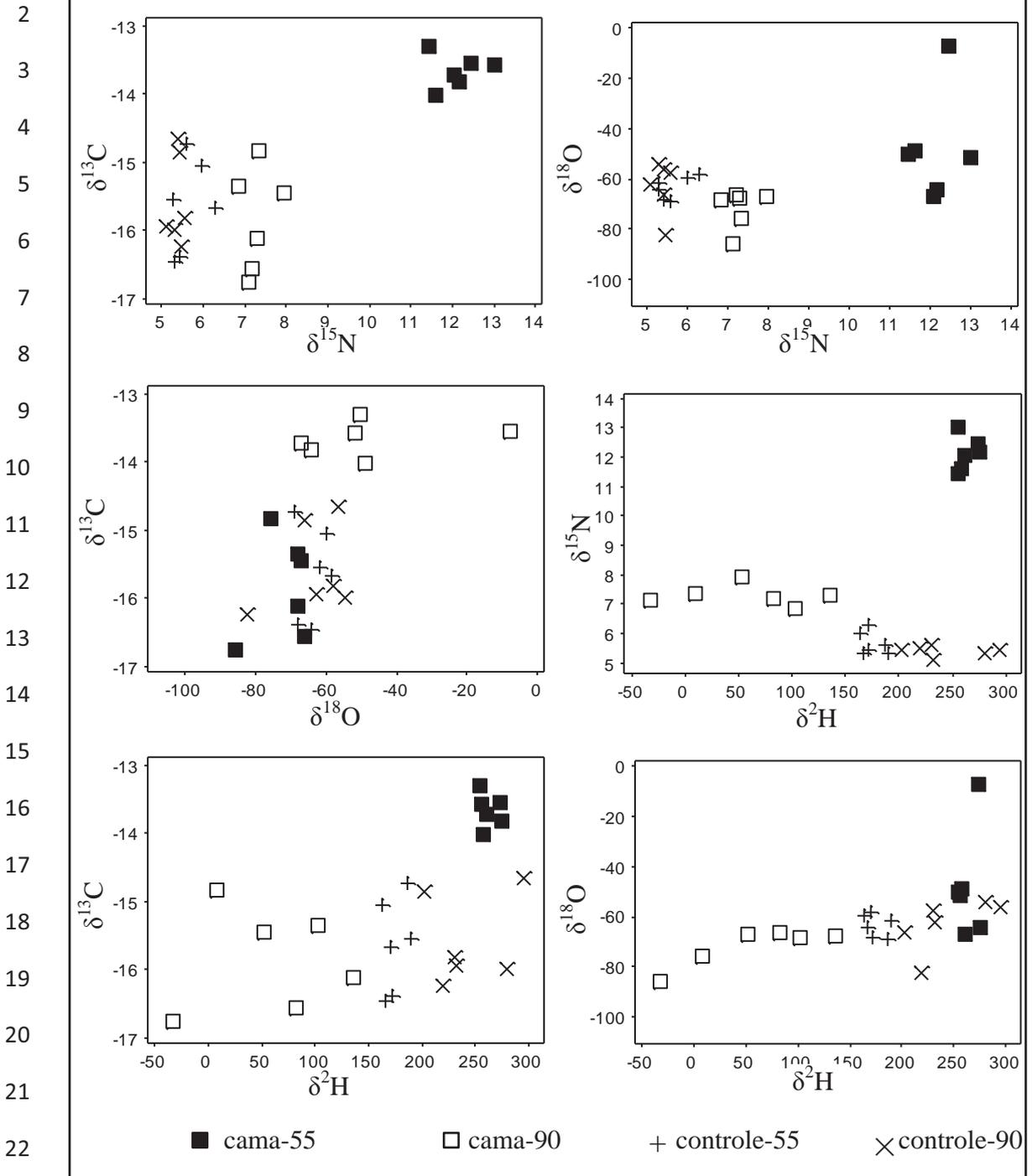


1 **Fig. 2.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$),
 2 oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do sangue coletado nos dias 55 e 90, de vacas dos
 3 tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de
 4 aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo
 5 substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

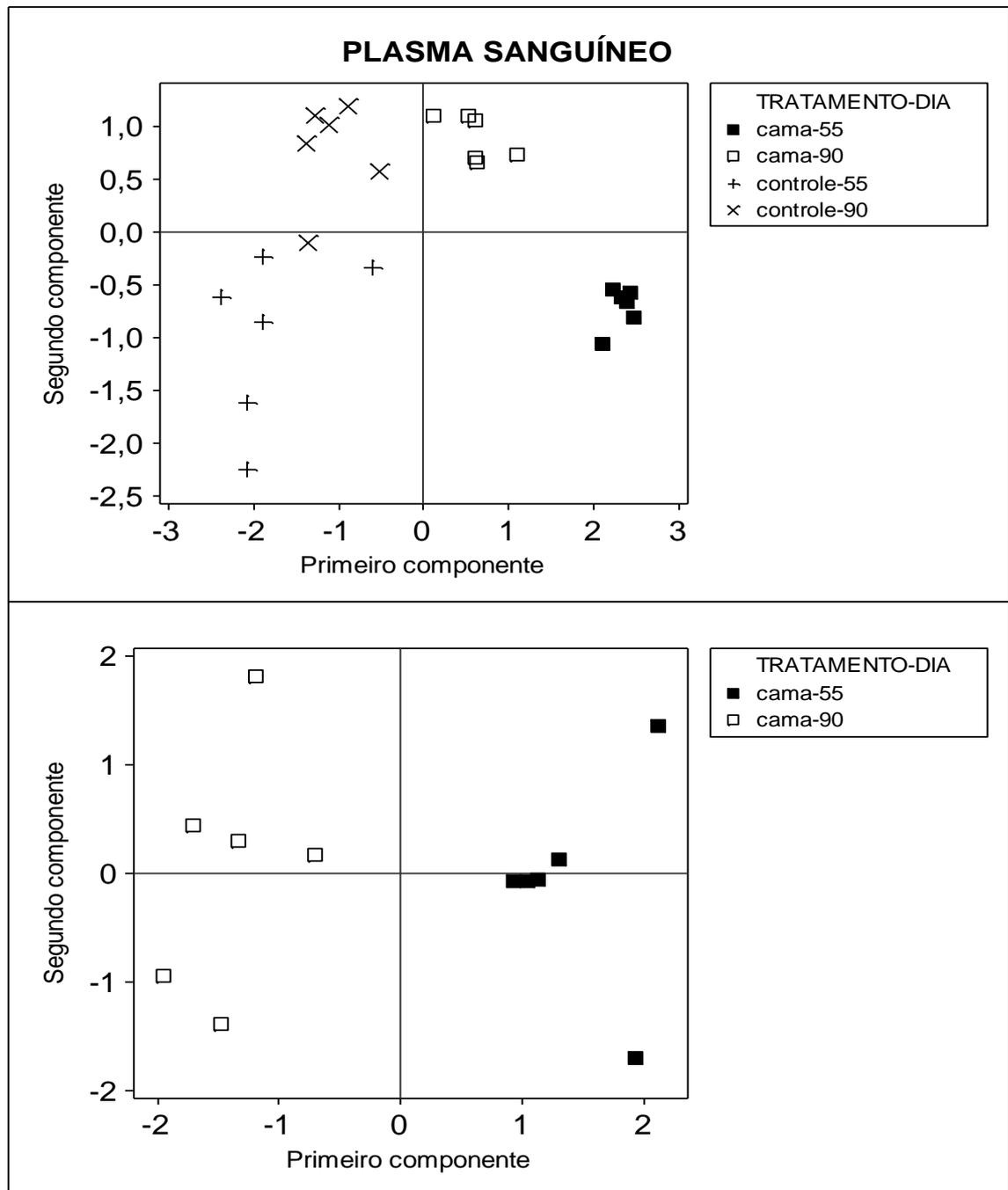


1 **Fig. 3.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$),
 2 nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro sanguíneo coletado nos dias
 3 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo
 4 experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário
 5 durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

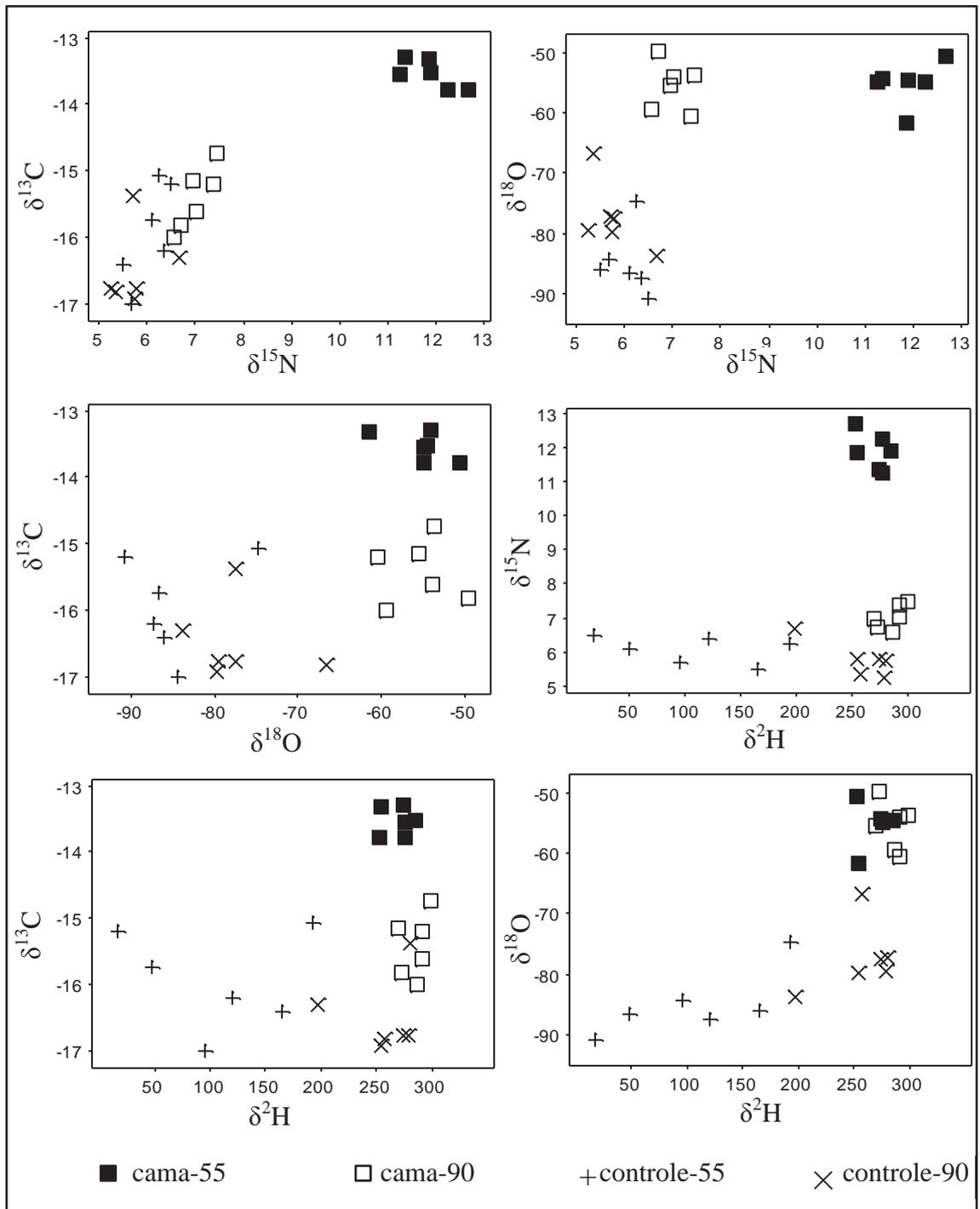
1



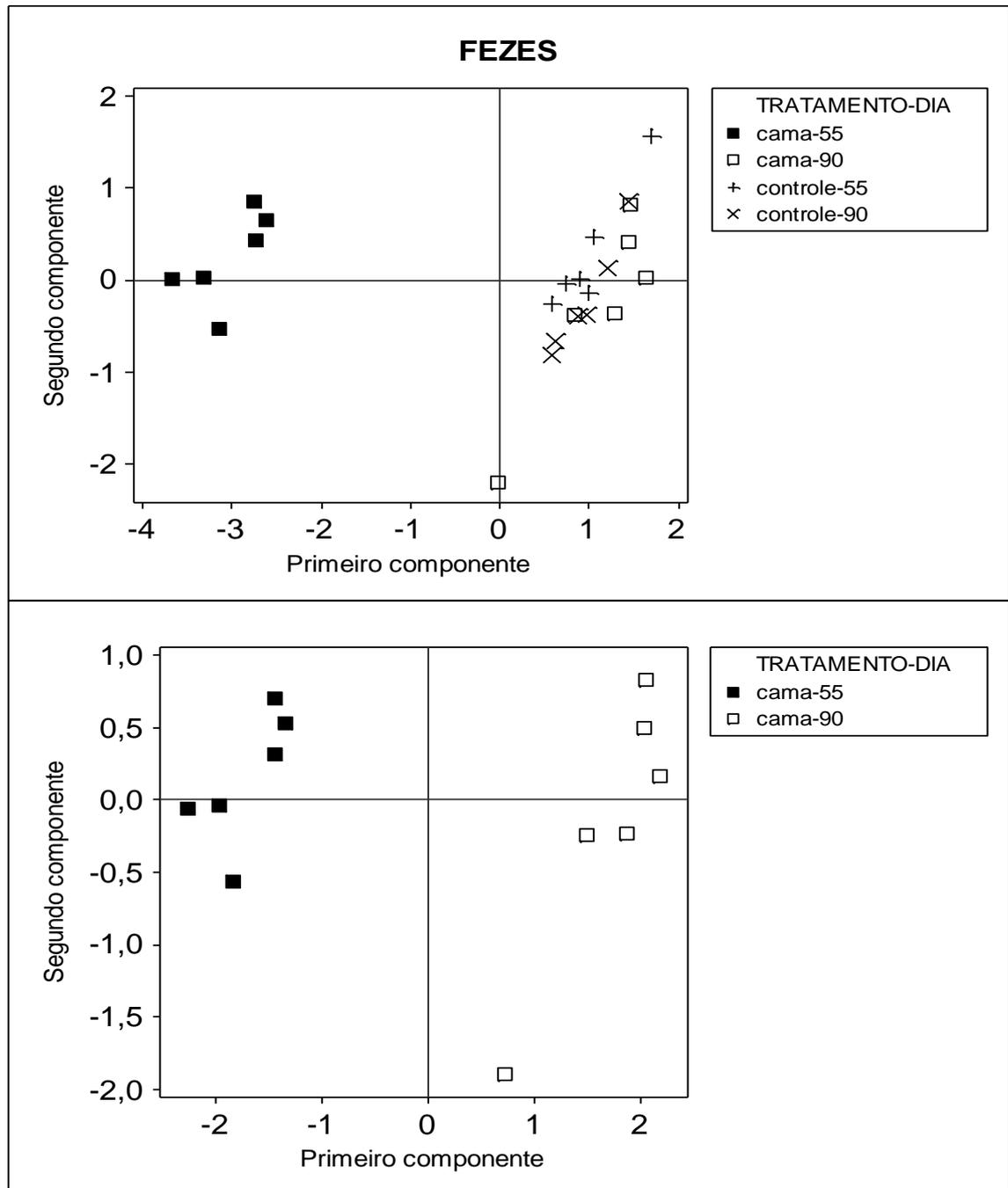
23 **Fig. 4.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$),
 24 oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do soro sanguíneo coletado nos dias 55 e 90, de vacas
 25 dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama
 26 de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo
 27 substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).



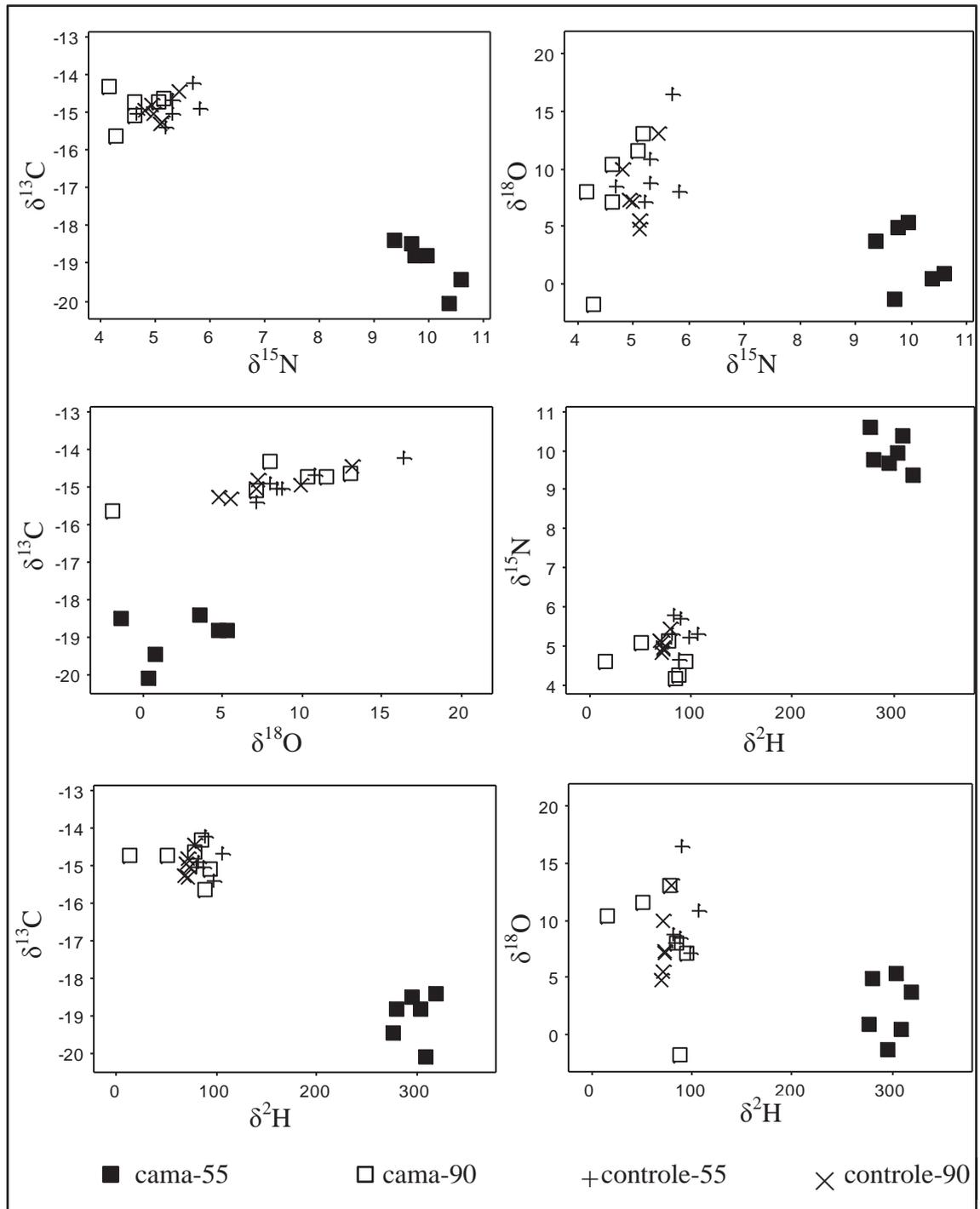
1 **Fig. 5.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$),
 2 nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do plasma sanguíneo coletado nos
 3 dias 1, 55 e 90, de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante
 4 todo experimento) e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário
 5 durante 55 dias, sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).



1 **Fig. 6.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$),
 2 oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), do plasma sanguíneo coletado nos dias 1, 55 e 90, de
 3 vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e
 4 cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias,
 5 sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).



1 **Fig. 7.** Análise de componentes principais das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$),
 2 nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), das fezes coletadas nos dias 55 e 90,
 3 de vacas dos tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento)
 4 e cama de aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias,
 5 sendo substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).



1 **Fig. 8.** Gráficos de dispersão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$),
 2 oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e deutério ($\delta^2\text{H}$), das fezes coletadas nos dias 55 e 90, de vacas dos
 3 tratamentos controle (dieta estritamente vegetal durante todo experimento) e cama de
 4 aviário (alimentadas com dieta contendo cama de aviário durante 55 dias, sendo
 5 substituída pela dieta estritamente vegetal do dia 55 ao dia 90).

1 **5. Referências**

2

3 Bánáti, D. Consumer response to food scandals and scares. (2011). *Trends in Food*
4 *Science & Technology*, 22, 56-60.

5

6 Comissão Europeia. (2001). Regulamento (CE) n° 999/2001 de 22 de Maio de 2001 do
7 Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras para a prevenção, o controlo e
8 a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis. *Jornal*
9 *Oficial das Comunidades Europeias*, 147, 1-40.

10

11 Jones, R. J., Ludlow, M. M., Troughton, J. H., & Blunt, C.G. (1979). Estimation of the
12 proportion of C₃ and C₄ plant species in the diet of animals from the ratio of natural ¹²C
13 and ¹³C isotopes in the faeces. *Journal of agricultural Science*, 92, 91-100.

14

15 NRC. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle (7th ed.). Washington, DC, USA:
16 National Academy Press.

17

18 Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review*
19 *of Ecology And Systematics*, 18, 293-320.

20

21 União Europeia. (2005). Regulamento (CE) n° 1292/2005 de 5 de agosto de 2005 que
22 altera o anexo IV do regulamento (CE) n° 999/2001 do Parlamento Europeu e do
23 Conselho no que se refere à alimentação animal. *Jornal Oficial da União Europeia*,
24 205, 3-11.

25

26 União Europeia. (2010). Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho
27 de 22 de Setembro de 2010 relativa à protecção dos animais utilizados para fins
28 científicos. *Jornal Oficial da União Europeia*, 276, 33-79.

29

30 União Europeia. (2013). Regulamento (UE) n° 51/2013 da comissão de 16 de janeiro de
31 2013 que altera o regulamento (CE) n° 152/2009 no que respeita aos métodos de análise

- 1 para a determinação dos constituintes de origem animal no quadro do controlo oficial
- 2 dos alimentos para animais. *Jornal Oficial da União Europeia*, 20, 33-43.

CAPÍTULO 4
IMPLICAÇÕES

1. Implicações

O uso de produtos proibidos na alimentação de ruminantes podem carrear riscos sanitários aos animais e à população. Dentre esses produtos, a cama de aviário, ou cama de frango, geralmente contem proteínas de origem animal em sua composição, podendo carrear o mal da vaca louca. A ocorrência de um caso clássico de vaca louca poderia causar prejuízos econômicos ao Brasil, como ocorrido nos países acometidos por essa doença.

As fraudes e adulterações ocorridas no leite, e o uso de proteínas de origem animal na alimentação de ruminantes, aumentam a demanda por ferramentas como os isótopos estáveis, que se destacam nas pesquisas de rastreabilidade e certificação de alimentos, auxiliando na garantia da qualidade.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a eficácia dos isótopos estáveis na rastreabilidade da inclusão da cama de aviário na dieta de vacas de leite, indicando que podem ser utilizados como traçador de proteínas de origem animal na alimentação de ruminantes.

A análise de componentes principais dos isótopos estáveis das fezes, seguida pela análise do leite permitiram a melhor distinção da inclusão de cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, em comparação com as outras amostras estudadas, devido ao menor período para a incorporação do valor isotópico da nova dieta nesses componentes.

Como constatado em testes de análise do leite, a utilização de amostras líquidas de leite apresentam maior variabilidade nos resultados isotópicos em comparação com amostras liofilizadas. Portanto, para análises futuras do leite e suas frações, recomenda-se a liofilização de todas as amostras, principalmente do leite, soro do leite e proteína, que podem deteriorar mesmo quando armazenados a baixas temperaturas.

Por isso, os melhores resultados encontrados nas análises isotópicas do leite e fezes também estão ligados à secagem das amostras, pois as amostras de soro do leite, proteína, gordura, sangue, plasma e soro sanguíneo foram utilizadas na forma líquida.

Pelas análises de componentes principais dos isótopos estáveis, de modo geral os isótopos de carbono e nitrogênio foram os mais representativos na identificação do grupo alimentado com dieta contendo cama de aviário.

Para as análises de sangue e suas frações é recomendado um maior período de adaptação dos animais, e de fornecimento das dietas experimentais, pois o tempo para incorporação do valor isotópico da nova dieta em seus componentes é maior que no leite e fezes.

Também podem ser realizados novos experimentos com diferentes níveis de inclusão da cama de aviário na dieta de ruminantes, para verificar qual o limite de detecção pela análise dos isótopos estáveis.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
 Secretaria de Defesa Agropecuária
 Departamento de Saúde Animal
 Coordenação Geral de Combate a Doenças
 Coordenação da Raiva e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

p.30
 P.

 INFORMAÇÃO CRHE Nº 79/ 2013

Assunto: **Projeto de pesquisa com isótopos estáveis para detecção de resíduos de uso de cama de frango em leite bovino.**

Data: **14 de outubro de 2013**

Referência: **Processo 21052.009187/2013-02**

O processo em questão trata de pedido da UNESP ao Mapa, relacionado à autorização para pesquisa com isótopos estáveis para detecção de resíduos de cama de frango em leite de vacas alimentadas com esse subproduto.

2. Sobre o assunto, ressalta-se que a Instrução Normativa 08/2004 inclui a cama de frango dentre os alimentos proibidos para ruminantes (*feed ban*), como medida de prevenção da encefalopatia espongiforme bovina (EEB). No sentido de observar obediência a IN 08/2004, o serviço veterinário oficial (SVO) vem realizando rotineiras fiscalizações em regiões de potencial risco para o uso indevido da cama de frango como alimento para ruminantes, assim como investigações de eventuais denúncias sobre esse uso indevido.

3. Entendemos que, conforme os resultados dessa pesquisa inédita, será possível agregar novos elementos para fortalecer e, até mesmo, reduzir custos das atuais fiscalizações do SVO.

4. Após consulta ao Comitê Científico Consultivo de Encefalopatias do Mapa (CEET), somos favoráveis ao pleito em questão, desde que seguidos os procedimentos abaixo listados, que visam garantir que os animais objetos dessa pesquisa não imputem à situação sanitária do país quanto à EEB:

- a) aplicação de elemento de identificação permanente nas vacas que se alimentarão com cama de frango, sendo que tal procedimento deve ser realizado pelo interessado e sob a supervisão do Serviço de Saúde Animal – SSA/SFA/SP;
- b) assinatura de termo de restrição de movimentação desses animais alimentados com o produto proibido, junto ao SSA/SFA/SP, onde o interessado se compromete a não movimentar o animal e a comunicar ao SSA qualquer evento com o mesmo, semelhante ao termo de depositário de bovino importado de país de risco para EEB;
- c) destinação das vacas que se alimentarão com cama de frango: conforme previsto na IN 41/2009, ou seja, destruição na propriedade ou abate com remoção de material de risco EEB, procedimento esse sob acompanhamento do SSA/SFA/SP. Ressaltamos que não cabe restrição ao aproveitamento do leite desses animais, quanto ao risco de EEB, pois no projeto é informado que o mesmo será descartado;

5. Considerando o exposto, é importante que o SSA/SFA/SP elabore os documentos necessários e discuta com o interessado sobre os procedimentos a serem aplicados, visando atender aos itens do parágrafo anterior.


 Elaine Fátima de Sena
 Coordenadora CRHE

ANEXO 2



ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Rastreabilidade da cama de aviário no leite através dos isótopos estáveis**", Protocolo nº 152/2013-CEUA, de **Marco Antônio Gonzales de Carvalho**, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 11 de outubro de 2013.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu