

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Câmpus de Botucatu

RASTREABILIDADE DE SISTEMAS PRODUTIVOS DE BOVINOS  
PELA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

ALEXANDRE PERDIGÃO

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

BOTUCATU - SP

Julho – 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Câmpus de Botucatu

RASTREABILIDADE DE SISTEMAS PRODUTIVOS DE BOVINOS  
PELA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

ALEXANDRE PERDIGÃO  
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni

Coorientador: Profa. Dra. Cyntia Ludovico Martins

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

BOTUCATU - SP

Julho – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P433r Perdigão, Alexandre, 1987-  
Rastreabilidade de sistemas produtivos de bovinos pela análise de isótopos estáveis / Alexandre Perdigão. - Botucatu : [s.n.], 2017  
59 f. : grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu - 2017

Orientador: Mário De Beni Arrigoni  
Coorientador: Cyntia Ludovico Martins  
Inclui bibliografia

1. Bovino de corte - Confinamento. 2. Produção animal. 3. Pastagens. 4. Carbono - Isótopos. 5. Nitrogênio - Isótopos. 6. Oxigênio - Isótopos. 7. Hidrogênio - Isótopos. I. Arrigoni, Mário De Beni. II. Martins, Cyntia Ludovico. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte".

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Osmar Perdigão e Clarice Rodrigues Perdigão e o meu irmão, Marcos Vinicius Perdigão, pelo apoio, incentivo e confiança durante mais uma etapa de minha vida.

Sem vocês faltaria inspiração.

À professora Cyntia Ludovico Martins pela confiança e oportunidade de ampliar meus conhecimentos em uma área com grande potencial de crescimento.

Ao professor Mário De Beni Arrigoni por depositar sua confiança e permitir que mais um sonho seja realizado.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder uma vida maravilhosa e excelente estrutura familiar que sempre me proporcionou educação, limites e oportunidades para chegar, estar e passar por essa importante fase de minha vida.

Aos Professores Mário De Beni Arrigoni e Cyntia Ludovico Martins, pela oportunidade de desempenhar mais um excelente trabalho em conjunto.

Ao Professor Carlos Ducatti "*in memoriam*", incentivador desta análise em experimentos zootécnicos e por inspirar pesquisadores com o seus conhecimentos deixados.

À Professora Márcia Maria Pereira Sartori, pela ajuda e ensinamentos da análise de multivariada.

Ao mestrando Ramon Rizzieri, pela ajuda e companheirismo na coleta das amostras.

Aos amigos de equipe de pós-graduandos, Daniela, Lucas, Gabriel, Carolina, Maria os quais ajudaram e me auxiliaram durante a realização do trabalho.

Ao amigo Henrique Borgatto, pela amizade e companheirismo durante parte desta trajetória.

Aos funcionários do Centro de Isótopos Estáveis Carlos Ducatti em especial prof. Vladimir, Evandro, Cibele, Nádia e Mariana pela ajuda e serviços prestados.

Aos funcionários do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal em especial Carlão, Renato e Claudemir pela atenção, ajuda e serviços prestados.

Aos funcionários da Pós Graduação Seila, Carlos e Ellen pela atenção e serviços prestados.

Aos Coordenadores do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da UNESP Botucatu pela oportunidade de obtenção do título de doutor.

À Associação de criadores de Nelore do Brasil (ACNB), pelo apoio, comprometimento e sua parceria para conosco.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar o meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	10
1. SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE BOVINOS .....	11
2. INOCUIDADE ALIMENTAR .....	12
3. CONCEITUAÇÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS .....	13
4. ISOTOPOS DE CARBONO .....	15
5. ISOTOPOS DE NITROGÊNIO .....	17
6. ISOTOPOS DE HIDROGÊNIO E OXIGÊNIO .....	18
7. ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA EXPERIMENTAÇÃO EM RUMINANTES .....	19
8. ANÁLISE DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS E DISCRIMINAÇÃO DE DIETAS ...	22
9. ISÓTOPOS ESTÁVEIS E DISCRIMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA..	23
10. ANÁLISE DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS E RASTREABILIDADE .....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

### CAPÍTULO 2

#### DIFERENCIAÇÃO DOS SISTEMAS PRODUTIVOS DE BOVINOS NELORE CRIADOS EM MESMA PROPRIEDADE PELAS RAZÕES ISOTÓPICAS DA CARNE

RESUMO .....	36
ABSTRACT .....	37
1 INTRODUÇÃO .....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3 RESULTADOS .....	42

4 DISCUSSÃO .....	44
5 CONCLUSÃO .....	48
6 REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO 3	
IMPLICAÇÕES .....	58



**LISTA DE TABELAS**

## CAPÍTULO 1

TABELA 1. A ABUNDÂNCIA NATURAL DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DOS ELEMENTOS H, C, N, O E S E SUAS MOLÉCULAS GASOSAS COMUMENTE UTILIZADAS NA ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....14

TABELA 2. ANÁLISES ISOTÓPICAS DE MULTIELEMENTOS EM ESTUDOS COM ORIGEM GEOGRÁFICA DA CARNE BOVINA.....26

## CAPÍTULO 2

TABELA 1. MÉDIAS DO ENRIQUECIMENTO ISOTÓPICO DOS ELEMENTOS EM AMOSTRAS DE CARNE COM OU SEM EXTRAÇÃO DE GORDURA DENTRE OS DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO.....53

TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE CARNE EM DIFERENTES SISTEMAS DE ALIMENTAÇÃO E PORCENTAGEM DE OBSERVAÇÕES CLASSIFICADAS CORRETAMENTE.....54

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

FIGURA 1. <i>TURNOVER</i> ISOTÓPICO, MEIA VIDA (T) E PATAMAR DE EQUILÍBRIO ISOTÓPICO .....	21
--	----

## CAPÍTULO 2

FIGURA 1. GRÁFICO DE DISPERSÃO DAS RAZÕES DE CARBONO-13 E NITROGÊNIO-15 DE BOVINOS NELORE CRIADOS EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO. (A) SEM EXTRAÇÃO DE GORDURA E (B) COM EXTRAÇÃO DE GORDURA: CONFINAMENTO CONVENCIONAL (●); SEMI-CONFINAMENTO (◆); E PASTO (■) .....	55
FIGURA 2. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE MÚSCULOS DE BOVINOS CRIADOS EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO SEM (A) E COM (B) EXTRAÇÃO DE GORDURA, E DOS ELEMENTOS SIGNIFICATIVOS PELA ANOVA (C): CONFINAMENTO CONVENCIONAL (●); SEMI-CONFINAMENTO (◆); E PASTO (■). .....	56

## **CAPÍTULO 1**

### **Considerações iniciais**

As exigências de exportação de carne bovina para o mercado mundial estão voltadas a aspectos de controle higiênico, sanitários e rastreabilidade animal (ANUALPEC, 2016), sendo a rastreabilidade incumbida por garantir integridade dos alimentos e forma como foram produzidos. Entende-se por origem de um produto sua procedência, desde sua idealização até a concretização e venda, abrangendo aspectos que vão além da transformação do leite em derivados e/ou animal em carne.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil, por meio do Sistema de Identificação e Certificação de Origem (SISBOV), registra e identifica o rebanho bovino e bubalino no território nacional, possibilitando o rastreamento do animal desde o nascimento até o abate, além disso, disponibiliza relatórios de apoio à tomada de decisão quanto à qualidade do rebanho nacional e importado (Sarto, 2002).

A produção de bovinos de corte conta com diferentes sistemas produtivos que possibilitam desfrutar e manter a carne competitiva no mercado. Em destaque, a produção intensiva de bovinos em pasto que caracteriza pelos menores custos de produção, gerando um produto de grande apelo mercadológico, o “boi verde”, consolidando o crescimento das exportações de carne bovina no país. A possibilidade de determinar como o animal foi produzido e seu local de criação é um avanço para o sistema de rastreabilidade, suprimindo uma das exigências dos mercados consumidores em caracterizar o produto pela forma que foi conduzido antes do abate.

A análise dos Isótopos Estáveis (AIE) é uma ferramenta com potencial de autenticidade dos alimentos que possibilita a investigação de fontes alimentares isotopicamente distintas (DeNiro e Epstein, 1978).

Alguns autores identificaram a origem da carne de diferentes localizações geográficas através da composição dietética pela combinação de isótopos estáveis e análise multielementares (Guo et al., 2010; Zhao et al., 2013). No Brasil, Vieira Júnior (2013), observou que os sistemas de produção de bovinos de corte podem ser diferenciados pelos bioelementos da carne, com o uso da análise dos isótopos estáveis de C e N. Entretanto, estudos avaliando o potencial da AIE são incipientes e necessários para discernir o fracionamento isotópico da dieta pelo animal, além disso, devem ser considerados os efeitos fisiológicos, bioquímicos e fatores ecológicos que influenciam muito nos valores isotópicos entre os tipos de tecido e indivíduos (Gannes et al., 1997).

### **1. Sistema de produção de bovinos de corte**

A pecuária de corte brasileira apresenta diferentes sistemas de produção, os quais abrangem desde uma pecuária extensiva, com pastagens nativas e cultivadas de baixa produtividade e pouco uso de insumos, até uma pecuária intensiva, com pastagens de alta produtividade, suplementação alimentar em pasto e confinamento. Entretanto, qualquer que seja o sistema de produção, a atividade caracteriza-se pela predominância de uso de pastagens (Cezar et al., 2005).

A criação em pasto caracteriza-se por ser fonte de energia mais barata para os bovinos. Paulino et al. (2002), afirmaram que a necessidade de suplementação no período seco do ano deve ser considerada ou as consequências da subnutrição aceitas. O confinamento caracterizado pelo sistema de criação de bovinos em que lotes de animais são encerrados em piquetes ou currais com área restrita, onde os alimentos e água necessários são fornecidos em cochos (Cardoso 2000). E por fim o semi-

confinamento consiste no fornecimento de alimentos no cocho em áreas disponíveis para pastejo.

## **2. Inocuidade alimentar**

A produção pecuária brasileira vem obtendo destaque frente ao mercado internacional, o qual se mostra cada vez mais exigente em relação à segurança higiênico sanitária dos alimentos de origem animal. Desde a crise de Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), na Inglaterra em 1996, os consumidores passaram a exigir garantias que assegurem a inocuidade dos alimentos. O sistema de rastreabilidade surgiu como um meio de transmitir transparência em toda a cadeia produtiva e contribuir para a segurança alimentar (Furquim, 2012).

Rastreabilidade animal consiste no acompanhamento de todos os eventos ocorridos durante a vida de um animal, ou seja, é o registro de todas as ocorrências, manejos e movimentações ocorridas desde seu nascimento ou identificação até o abate, momento esse que se estende até o consumo de suas partes (Caixeta et al., 2014).

A partir disso, questões como a origem do produto, a forma de produção, produção orgânica, seu impacto ambiental e condições de higiene passaram a ser cada vez mais relevantes nas negociações de mercado interno e externo na decisão de compra pelo consumidor (Murakami; Saraiva, 2005).

De acordo com estudos realizados por Ferreira (2002), a rastreabilidade tem importante papel na melhoria da coordenação da cadeia de carne bovina. O setor público (MAPA) e o setor privado também têm papel importante a desempenhar, para incentivar o desenvolvimento dos procedimentos de rastreabilidade, por meio de medidas que garantam padrão mais homogêneo de atuação entre os diferentes agentes.

Apesar de toda essa fiscalização, não existe uma análise do produto final que garanta como o animal foi produzido, no entanto, a AIE na carne destaca-se como ferramenta promissora na identificação da origem e qualidade de produtos de origem animal e vegetal, podendo ser utilizada em estudos de rastreabilidade (Martins et al., 2012), a fim de auxiliar nos processos de fiscalizações já existentes.

### 3. Conceituação dos isótopos estáveis

O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, com o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, conseqüentemente apresentando diferentes massas atômicas. Por possuírem distribuição eletrônica igual, ou seja, com o mesmo número de elétrons, pode-se dizer que os isótopos são elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas (eletrosfera) e diferentes propriedades físicas (núcleo). A expressão *estável* (não emite radiação) significa que ocorrem de maneira comum na natureza, podendo então, ser utilizada sem riscos à saúde e ao ambiente (Thorpe e Thorpe, 2011).

A nomenclatura isotópica se expressa por  ${}^A_Z X$ , na qual  $X$  representa o símbolo do elemento químico,  $A$  o número de massa em unidades de massa atômica e  $Z$  o número atômico, de modo que  $A=Z+N$ , onde  $N$  representa o número de nêutrons (Ducatti, 2007).

O elemento químico Carbono, por exemplo, apresenta somente dois isótopos estáveis:  ${}^{12}\text{C}$  e  ${}^{13}\text{C}$ , sendo que o  ${}^{12}\text{C}$  com menor massa atômica e o mais abundante. As moléculas  ${}^{12}\text{CO}_2$  e  ${}^{13}\text{CO}_2$  não são diferenciadas pelas membranas biológicas de origem

vegetal ou animal, ou seja, a pequena sutileza escondida no núcleo (nêutron a mais) não é detectada, tornando o isótopo estável do  $^{13}\text{C}$  excelente traçador em nível de variação natural ou compostos enriquecidos, o que é extensivo para os demais bioelementos (Thorpe e Thorpe, 2011). Os principais isótopos estáveis mais abundantes em organismo vivos são chamados de bioelementos (C, H, O, N e S) e suas abundâncias explícitos na Tabela 1.

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

Isótopos Estáveis	Abundância átomos %	Gás	Isótopos Estáveis	Abundância átomos %	Gás
$^1\text{H}$	99,9844	$\text{H}_2$	$^{16}\text{O}$	99,7628	$\text{CO}$
$^2\text{H}$	0,0156		$^{17}\text{O}$	0,0372	
$^{12}\text{C}$	98,8890	$\text{CO}_2$	$^{18}\text{O}$	0,2000	
$^{13}\text{C}$	1,1110		$^{32}\text{S}$	95,0180	
$^{14}\text{N}$	99,6340	$\text{N}_2$	$^{33}\text{S}$	0,7500	$\text{SO}_2$
$^{15}\text{N}$	0,3660		$^{34}\text{S}$	4,2150	
			$^{36}\text{S}$	0,0170	

Fonte: Preston, 1992.

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



$$\delta_i(x, \text{padrão}) = [R_i(x) - R_i(\text{padrão}) / R_i(\text{padrão})] * 1000$$

$R_i$  = razão isotópica. Por exemplo,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ;  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , etc.

x = amostra; padrão = standart, padrão internacional

$\delta_i\text{‰}(x, \text{std})$  = enriquecimento da amostra relativo ao padrão, ou popularmente, delta per mil. Adimensional.

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

#### 4. Isótopos de carbono

Os valores isotópicos do  $^{13}\text{C}$  são expressos em termos do padrão internacional, Peedee Belemnite (PDB). Segundo Ducatti (2007), o padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do Carbono. Trata-se do carbonato sólido de Belemnitela da era cretáceo, *Belemnitela americana*, da formação Peedee da Carolina do Sul, empregado inicialmente como padrão por Craig (1961).

A fonte primária do Carbono para as plantas terrestres é o  $\text{CO}_2$  atmosférico, o qual tem valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente  $-7,7\text{‰}$  (Kennedy e Krouse, 1990). Esse carbono sofre discriminação isotópica ou fracionamento isotópico ao longo do processo de fotossíntese. O termo discriminação isotópica indica enriquecimento ou empobrecimento isotópico relativo do produto em relação à fonte precursora.

De acordo com o ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos principais:  $\text{C}_3$  (arroz, leguminosas, trigo, cevada, hortaliças,

beterraba, mandioca, algodão, alfafa, soja, feijão, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, entre outros) e C<sub>4</sub> (cana de açúcar, milho, gramíneas tropicais, entre outras).

Existem outras espécies, como as CAM, as quais são distribuídas em 30 famílias, sendo estas as mais representativas: “Crassulaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae, Cactaceae”. Elas são geralmente suculentas, com os valores do  $\delta^{13}\text{C}$  variando de -10 a -28‰. Algumas espécies CAM são facultativas, pois dependem das variações ambientais, porém para algumas espécies CAM obrigatórias, os valores isotópicos são comparáveis aos das plantas C<sub>4</sub> (Bouton, 1996).

Em plantas C<sub>3</sub> o valor de  $\delta^{13}\text{C}$  varia de -22 a -34‰, e nas C<sub>4</sub> este valor encontra-se na faixa de -9 a -16‰ (Vogel, 1993; Bouton, 1996). A diferença entre estes valores ocorre devido às distintas rotas bioquímicas na produção de carboidratos, pois, plantas C<sub>3</sub> desde o estágio inicial (estômatos) até a formação dos compostos de carbono incorporam mais <sup>12</sup>C do que <sup>13</sup>C. Esta preferência ou discriminação isotópica pelas moléculas <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, isótopo estável leve, é muito maior nas plantas C<sub>3</sub> do que nas plantas C<sub>4</sub>. Logo, plantas C<sub>3</sub> são em média - 14,4‰ mais leves do que plantas C<sub>4</sub>.

O contraste existente na relação isotópica de <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C das plantas de ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> é que tem possibilitado estudos na área de nutrição e metabolismo animal, utilizando como marcador o <sup>13</sup>C e sua concentração natural nos alimentos (Ducatti, 2007). Devido ao fato das plantas serem fonte de alimento aos animais, a “impressão digital isotópica” destas fontes é refletida nos tecidos específicos dos animais, após certo tempo de metabolismo (DeNiro e Epstein, 1978; Gannes et al., 1998), possibilitando evidenciar as dietas a partir da análise isotópica nos tecidos (Ducatti, 2007).

O principal elemento considerado na análise do diagnóstico alimentar é o Carbono. Entretanto, a complexidade na interpretação dos valores isotópicos sobre as possíveis fontes alimentares sugere a necessidade de complementação com outros isótopos, como o nitrogênio (Fry e Sherr, 1984).

## 5. Isótopos de nitrogênio

Para razão isotópica de nitrogênio, o padrão internacional é o nitrogênio do ar atmosférico, o qual é considerado mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Os valores isotópicos de Nitrogênio-15 ( $^{15}\text{N}$ ) também são expressos, na notação delta per mil da razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  do produto em relação ao padrão internacional (Ducatti et al., 2011).

Diferentemente do carbono, a razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  nas plantas não depende do ciclo fotossintético realizado e sim, conforme o modo de fixação. Entretanto, mesmo a atmosfera sendo abundante em  $\text{N}_2$ , somente plantas leguminosas, em sua maioria que possuem bactéria fixadora de nitrogênio, conseguem fixá-lo do ar. As demais plantas fixam-no através da incorporação de compostos nitrogenados do solo. Na maioria das leguminosas, por realizar simbiose com micorrizas, o valor de  $^{15}\text{N}$  varia próximo ao valor padrão ( $^{15}\text{N} = 0,0 \pm 1,0\%$ ) (Handley e Raven, 1992; Werner e Schmidt, 2002).

O  $^{15}\text{N}$  das plantas que não conseguem fixar o nitrogênio atmosférico é dependente, em grande parte, da abundância isotópica do solo e da variação causada pela adubação (Choi et al., 2002). Se absorvido da matéria orgânica decomposta, o valor do  $\delta^{15}\text{N}$  é maior, ao redor de 10‰ (Shibuya et al., 2006). Contrariamente, valores menores são observados em solos com baixa porcentagem de matéria orgânica, em particular solos secos e arenosos, ou que são fertilizados com adubos industriais.

Conforme Yoneyama (1996), adubos nitrogenados utilizados na agricultura possuem valores de  $\delta^{15}\text{N}$  próximo a 0‰, isto porque a fonte de nitrogênio utilizada pelas indústrias para a fabricação de adubo é o nitrogênio atmosférico.

## 6. Isótopos de oxigênio e hidrogênio

No ciclo da água o principal fator de fracionamento isotópico ocorre durante os processos de evaporação e condensação na atmosfera. As razões isotópicas de hidrogênio e oxigênio das águas terrestres dependem da região onde ocorre a precipitação. Moléculas mais leves da água ( $\text{H}_2^{16}\text{O}$ ) evaporam mais rapidamente ao nível do mar ou próximo à linha do equador. Quando esta água condensa-se parcialmente para formar as chuvas, em altas latitudes e altitudes, efeitos ligados à temperatura removem preferencialmente essas moléculas leves, causando uma diminuição nas moléculas mais pesadas ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , HDO). Um mapeamento da precipitação permitiria identificar a origem regional das amostras de água. Medidas da razão isotópica do oxigênio são amplamente aplicáveis na caracterização da origem geográfica do arroz devido à influência da latitude no fracionamento desses isótopos na água do solo (Kelly et al., 2002). Avanços na discriminação entre diferentes origens geográficas, utilizando análise de diferentes elementos minerais e composição isotópica, foram propostas por diversos autores, como por exemplo, Day et al. (1995) e Martin et al. (1999).

Durante o processo de absorção de água do solo, as plantas não causam nenhum fracionamento significativo nos isótopos de hidrogênio, nem nos de oxigênio da água. Porém, ao atingir o nível das folhas e outras partes expostas, como os frutos, o intenso processo de evaporação causa um enriquecimento no conteúdo de  $^2\text{H}$  e  $^{18}\text{O}$  da água

residual das células, onde vai ocorrer a formação dos compostos orgânicos da planta. Como, no caso da uva, a glicose e frutose serão os precursores do álcool (etanol) do vinho, também a água do processo de fermentação preservará o enriquecimento isotópico da água da folha/fruto. Desta forma, a água do vinho refletirá o conteúdo isotópico da água das plantas que o originou que por sua vez será distinta da água do ambiente. Assim, a análise de oxigênio pode ser utilizada para identificação da adição de água exógena em vinhos e sucos de frutas (Bréas et al., 1994).

## **7. Isótopos estáveis na experimentação em ruminantes**

A utilização dos isótopos estáveis ambientais na zootecnia e a rastreabilidade nos animais começa com a sua principal fonte de alimentação, as plantas e os subprodutos do ciclo fotossintético  $C_3$  (arroz, trigo, cevada, alfafa, outros), com valor médio do enriquecimento isotópico relativo de  $\delta^{13}C = -28\text{‰}$  e as plantas e seus subprodutos do ciclo fotossintético  $C_4$  (cana-de-açúcar, milho, gramíneas tropicais, etc) com valor médio de  $\delta^{13}C = -12\text{‰}$ . Desta forma, percebe-se a existência da diferença isotópica entre elas [ $\Delta(C_4, C_3) = \delta C_4 - \delta C_3$ ] da ordem de 16‰ (Ducatti et al., 2011).

Esta ponderação abre perspectiva na alimentação e/ou rações utilizadas pelos animais, uma vez que o erro cometido na determinação da variabilidade natural do carbono pelo espectrômetro de massas é da ordem de 0,2‰, permitindo, com segurança, a rastreabilidade destes ingredientes, a qual é extensiva aos isótopos estáveis dos bioelementos (Ducatti et al., 2011).

Jones et al., (1979), em experimento de alternância de plantas  $C_4$  (pangola) e plantas  $C_3$  (cowpea hay) contra o tempo, foi fundamental nos experimentos de alimentação em animais de grande porte (ruminantes) analisando as excretas. Neste

experimento, os autores obtiveram a figura de uma onda quadrática ( $\delta^{13}\text{C}$  versus tempo), na qual, verificou-se patamar de equilíbrio isotópico para a oferta de plantas  $\text{C}_4$  e outro para a alimentação  $\text{C}_3$ , durante 120 dias.

Assim procedendo, se utilizar os valores médios do patamar de equilíbrio isotópico  $\text{C}_3$  e o patamar  $\text{C}_4$ , obtém-se um gabarito entre as fontes de alimentação (A e B). Ofertando os dois alimentos de interesse no pasto ou em confinamento, obtém-se o valor isotópico no produto (P) gerado, o qual permite obter quantitativamente os alimentos digeridos e assimilados pela equação de balanço de massa e isotópico:  $(a)\delta a+(b)\delta b=\delta P$ ;  $a+b=1$ , na qual (a) e (b) indicam o índice participativo de cada alimento (no cálculo, basta inserir  $b=1-a$  na expressão). A continuidade dos valores isotópicos nos subprodutos, entre os patamares isotópicos gerados pela Fonte A e posteriormente pela Fonte B é função exponencial do tempo (segunda classe de experimento) (Ducatti, 2011).

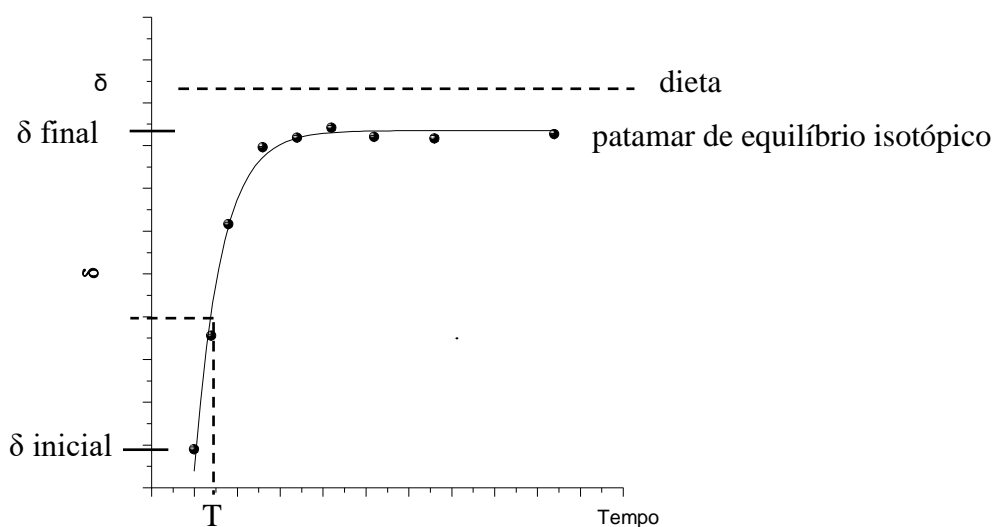
Ducatti et al (2002), visando o estudo da síntese e degradação de metabólitos sob regime de dieta a base de plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , ou misturas isotópicas, com valores de  $\delta$  distintos entre si, propôs uma função exponencial expressa pela equação:

$$\delta t=\delta f+[\delta i-\delta f]e^{-kt}$$

na qual o principal parâmetro de análise é a constante k (constante de alimentação, constante de troca ou constante de *turnover*) em unidade de tempo<sup>-1</sup>, a qual permite a mensuração da meia vida  $T=\ln 2/k$ , em unidade de tempo. Os valores de  $\delta i$  e  $\delta f$  correspondem aos valores isotópicos dos tecidos em questão na condição inicial e final, respectivamente. O valor de  $\delta t$  reflete o enriquecimento isotópico relativo em qualquer tempo (t) no experimento em condução. O comportamento da equação geral do

*turnover* e a interpretação dos conceitos empregados podem ser visualizados na Figura 1.

Neste sentido, o conceito de meia-vida ( $T=\ln 2/k$ ), a qual é o tempo necessário para que ocorra 50% da troca da Fonte dietética, torna-se um parâmetro de ordem prática a ser mensurado. A expressão para a meia-vida sugere que tecidos (fígado, músculo, etc) com meia-vida curta apresentam uma “alta velocidade” de metabolização ou incorporação dos isótopos estáveis no tecido em questão, e o inverso, como o caso do colágeno do osso, apresenta “baixa velocidade” de incorporação no tecido (Ducatti et al. 2002).



**Figura 1.** *Turnover* isotópico, meia vida (T) e patamar de equilíbrio isotópico.

Fonte: Ducatti et al (2002).

Esta mesma observação pode ser interpretada da seguinte forma, como sugerem Tieszen et al., (1983): os tecidos mais ativos metabolicamente devem apresentar uma taxa de *turnover* mais rápida que os tecidos menos ativos. A constante ( $k$ ) é importante

também na estimativa do tempo ( $t$ ), para que ocorra a troca ( $f$ ) de 99% dos átomos iniciais ( $\delta_i$ ) pelos átomos finais ( $\delta_f$ ) através de  $t = (-1/k)\ln(1-f)$ .

Da Silva (2003) obteve função exponencial do tipo sigmoidal de Boltzmann (desenho aproximado da letra S estendida, em gráfico de  $\delta^{13}\text{C}$  versus tempo) no estudo da determinação da fase lactente para ruminante em cordeiros, ofertando ração  $\text{C}_3$  em creep-feeding e alimentando-se também do leite  $\text{C}_4$ . A autora constatou atividade ruminal plena aos 30–35 dias de vida, através do conceito de meia-vida (Silva, 2003).

A equação de diluição isotópica expressa a contribuição de duas fontes distintas de alimentos na formação de um produto, sendo:  $(a)\delta_a + (b)\delta_b = \delta^{13}\text{C}$ ;  $(a)\delta'a + (b)\delta'b = \delta^{15}\text{N}$ ; e/ou um terceiro isótopo se assim for necessário. O símbolo linha (') expressa a indicação do enriquecimento isotópico relativo do nitrogênio-15 nas duas fontes de alimentações. Isolando ( $b$ ) entre elas e igualando-as entre si, obtém-se o índice participativo ( $a$ ) da fonte vegetal no produto final (Ducatti, 2007).

No sentido de evitar o fator de fracionamento entre a fonte e o produto ou mesmo as diferentes concentrações de carbono e nitrogênio entre as diversas fontes e o produto, a experiência tem recomendado utilizar o mesmo tecido utilizado nas fontes (músculo) e produto (músculo) ou fontes (sangue) e produto (sangue), ou qualquer outro tecido de interesse nos dois tipos de experimentos (patamar de equilíbrio isotópico ou função exponencial) (Ducatti, 2007).

## **8. Análise dos isótopos estáveis e discriminação de dietas**

Os isótopos estáveis já vêm sendo utilizados há várias décadas em estudos com animais ruminantes. Isto se deve ao fato dos valores isotópicos determinados terem como base os alimentos assimilados e não apenas os alimentos ingeridos. Portanto,



permite a obtenção de informações de dietas consumidas recentemente ou até mesmo aquelas que foram fornecidas no período inicial da vida dos animais (Hobson e Clark, 1992).

Ludlow et al. (1976) propuseram uma técnica para determinação das proporções de espécies de plantas  $C_3$  e  $C_4$  na dieta dos animais. A técnica baseou-se no fato de que no processo fotossintético, o  $^{13}C$  do  $CO_2$  atmosférico sofre discriminação isotópica em relação ao total de carbono, quando integrado aos tecidos das plantas. No caso de plantas que possuem a via fotossintética do ácido carboxílico ( $C_4$ ) a abundância isotópica do  $^{13}C$  chega aproximadamente -12 a -14 ‰, enquanto que em plantas do ciclo de Calvin ( $C_3$ ), os valores se situam próximos de -26 a -28 ‰. Posteriormente, Lourenço et al., 1984 estudaram o grau de seletividade da dieta em vacas leiteiras, mantidas em pastos de gramínea e leguminosa, através do  $\delta^{13}C$  determinado nas fezes, leite e sangue. Piasentier et al., (2003), analisaram além do isótopo  $^{13}C$ , o  $^{15}N$ , e reportaram que os valores para o  $^{15}N$  podem ter sofrido interferência em função do tipo de solo, possível presença de plantas leguminosas na dieta e ainda ser oriunda dos próprios fatores metabólicos do animal.

## **9. Análise dos isótopos estáveis e rastreabilidade**

Bahar et al. (2008), com o intuito de testar a AIE no sistema de rastreabilidade para autenticação de produtos de origem animal, estudaram as alterações na razão isotópica de Carbono e Nitrogênio no músculo de bovinos. Concluíram que a composição desses isótopos no músculo alterou consideravelmente, devido à substituição da silagem de capim ( $C_3$ ) pela silagem de milho ( $C_4$ ) na dieta de bovinos de corte. No entanto, o tecido muscular (*M. longíssimus thoracis et lumborum*) mostrou

não ser adequado para mudanças curtas e recentes de dietas, pois os autores verificaram que após 167 dias de experimento, o *turnover* do tecido não tinha sido completo, refletindo o  $\delta^{13}\text{C}$  da antiga dieta.

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

A AIE também pode ser utilizada em processos de autenticação e certificação do leite, como complemento para os processos de certificação já existentes. Molquentin (2009) estudou a associação do isótopo de carbono e do ácido  $\alpha$ -linolênico presentes na gordura do leite, para verificar sua aplicabilidade como indicadores na autenticação do leite orgânico na Alemanha. A princípio, os valores para a identificação do leite orgânico alemão foram estabelecidos, para assim, delimitar quase todas as amostras de leite convencional. Pelos resultados obtidos, o autor conseguiu diferenciar o leite orgânico alemão do convencional, haja vista que o leite orgânico produzido na Alemanha seja proveniente de animais cuja dieta é baseada em forrageiras do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$ . Assim, o fornecimento de milho ( $\text{C}_4$ ), principalmente no inverno, foi o que possibilitou diferenciar o leite orgânico do convencional.

Porém, se esta mesma pesquisa fosse executada nas condições brasileiras, provavelmente não haveria diferença para o valor de  $\delta^{13}\text{C}$  entre leite orgânico e convencional, pois, a grande maioria das forrageiras cultivadas no Brasil, realiza a via

C<sub>4</sub> em seu ciclo fotossintético.

Aono (2014) observou que a análise de isótopos estáveis e o teor de polifenóis total distinguiram leites obtidos de sistemas de produção convencional e orgânico no Brasil, sobretudo quando avaliados pela análise multivariada de componentes principais, revelou maior importância da razão isotópica de nitrogênio para a distinção.

Desta forma, a AIE de apenas um elemento pode não ser suficiente para fornecer informação inequívoca sobre atribuições ou características de determinado produto. Entretanto, análises combinadas, ou seja, utilizando mais de um elemento, podem incrementar ou até mesmo promover link entre informações, a fim de promover melhor entendimento sobre o objeto em estudo (Zhao et al. 2014).

## **10. Isótopos estáveis e identificação da origem geográfica**

Se por um lado, a AIE de Carbono e Nitrogênio tem permitido determinar a dieta dos animais, por outro, os elementos Oxigênio e Hidrogênio nos tecidos pode prover indicação da origem geográfica dos animais. Para estes dois últimos elementos, dados de estudos com bovinos evidenciaram que a variação na composição dos tecidos ocorreu de forma similar à encontrada na água consumida pelos animais. No entanto, o uso da AIE para inferir origem geográfica ainda necessita de estudos além de estar sujeita a fatores de confundimentos. Alguns pontos devem ser considerados, por exemplo, tempos de *turnover* metabólico dentre os tecidos (Schwagele, 2005).

Contudo, há uma série de publicações (Tabela 2) específicas relativas à identificação de origem geográfica e regime de produção de carnes, utilizando a análise de isótopos de múltiplos elementos (Kelly et al., 2005). Ainda, a AIE foi utilizada por Schmidt et al. (2005), em pesquisa que possibilitou distinguir bovinos criados em

países da Europa e América, produtos lácteos produzidos em diferentes regiões da Austrália (Critenden et al., 2007) e a origem geográfica da carne distribuída no Japão (Nakashita et al., 2008). Erasmus et al. (2016) investigaram a origem geográfica de cordeiros em produção extensiva na África do Sul e verificaram que as razões isotópicas de carbono e nitrogênio demonstraram ser úteis na autenticação de origem pela análise de discriminante linear. A análise isotópica estável é aplicada com sucesso na origem geográfica e autenticidade do rastreamento de agro-produtos na China, que oferecem suporte técnico robusto para vigilância de mercado e controle de qualidade do produto (Chen et al 2017).

**Tabela 2.** Análises isótopos estáveis em estudos de identificação de origem geográfica da carne bovina

Isótopos avaliados	Referências
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	Hegerding et al. (2002)
$^2\text{H}/^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	Boner e Forstel, (2004)
$^2\text{H}/^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	Renou, et al. (2004)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	Bahar et al. (2008)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	Nakashita et al. (2008)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ , $^2\text{H}/^1\text{H}$	Heaton et al. (2008)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^2\text{H}/^1\text{H}$	Horacek e Min, (2010)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	Guo et al. (2010)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^2\text{H}/^1\text{H}$ , $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	Osorio et al. (2010)

**Fonte:** Adaptado de Kelly et al. (2005) e Zhao et al. (2014).

Para rastrear e identificar corretamente a origem geográfica e proveniência de produtos, como a carne, é extremamente importante coletar amostras e informações do local que possam contribuir com assinatura isotópica. Se houver uma demanda para estabelecer um banco de dados em determinada região, é importante a repetibilidade e a reprodutibilidade de tais medidas. O método de análise estatístico, como a análise de componentes principais, análise de agrupamento hierárquico, análise discriminante linear, tem sido utilizados para rastrear e classificar a origem geográfica e autenticidade de produtos (Zhao et al. 2014). A possibilidade de escolha de um produto, tendo como base sua identificação geográfica, animais de raças com características apreciadas ou sistemas de produção com tipo de alimentação peculiar, pode servir para agregar valor ao produto comercializado.

O presente estudo teve como objetivo: avaliar a análise dos isótopos estáveis ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$  e  $^{15}\text{N}$ ) da carne na caracterização dos sistemas de terminação de bovinos Nelore criados na mesma propriedade.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANUALPEC. **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2016.
- AONO, N. M. **Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes**. 39 f. Dissertação (MESTRADO)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. Estatísticas: mercado mundial. São Paulo, 2014.

- BAHAR, B. et al. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1937-1942, 2008.
- BONER, M.; FÖRSTEL, H. Stable isotope variation as tool to trace the authenticity of beef. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 2, p. 301-310, 2004.
- BOUTTON, T. W. Stable Carbon Isotope Ratios of Soil Organic Matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass Spectrometry of Soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 47-82.
- BRÉAS, O.; RENIERP, F.; SERRINI, G. Isotope Ratio Mass Spectrometry: analysis of wines from different european countries. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 8, p. 967-970, 1994.
- CARDOSO, E. G. Confinamento de bovinos. In: CURSO SUPLEMENTAÇÃO EM PASTO E CONFINAMENTO DE BOVINOS, 2000, Campo Grande. Palestras apresentadas. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p.59-72, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/naoseriadas/cursosuplementacao/confinamento/>>. Acesso em: 22 mar. 2017.
- CAIXETA, L. G. T.; LOPES, M. A.; BRUHN, F. R. P. Não conformidades encontradas nas auditorias oficiais do SISBOV realizadas em Minas Gerais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 4, p. 372-376, 2014.
- CEZAR, I. M. et al. Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate. Campo Grande, MS, Embrapa Gado de Corte, ((=Documentos / Embrapa Gado de Corte, 151), 40 p. 2005.

- CHEN, T. et al. Recent developments in the application of nuclear technology in agro-food quality and safety control in China. **Food Control**, v. 72, p. 306-312, 2017.
- CHOI, W. J. et al. Natural  $^{15}\text{N}$  abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, v. 245, p. 223-232, 2002.
- CRAIG, H. Isotopic variations in meteoric water. **Science**, v. 133, p. 1702-1703, 1961.
- DAY, M. P.; ZHANG, B.; MARTIN, G. J. Determination of the Geographical Origin of Wine Using Joint Analysis of Elemental and Isotopic Composition. II – Differentiation of the Principal Production Zones in France for the 1990 Vintage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, p. 113-123, 1995.
- DA SILVA, J. J. **Determinação da fase lactente – ruminante em cordeiros pelas técnicas do  $\delta^{13}\text{C}$  e micro-histologia fecal**. 2003. 43 p. Dissertação (MESTRADO)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2003.
- DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 42, p. 495-506, 1978.
- DUCATTI, C. **Isótopos Estáveis Ambientais**. Botucatu: Unesp, 2007. 204 p. Apostila.
- DUCATTI, C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.
- ERASMUS, S. W. et al. Stable isotope ratio analysis: A potential analytical tool for the authentication of South African lamb meat. **Food Chemistry**, v. 192, p. 997-1005, 2016.

- FERREIRA, L.C.L.; MEIRELLES, M.B. **Avaliação da eficiência de quatro métodos para identificação de bovinos.** Monografia (ESPECIALIZAÇÃO) Departamento de Economia e Administração/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2001.
- FRY, B.; SHERR, E. B.  $\delta^{13}\text{C}$  measurements as indicators of carbon flow in marine and fresh water ecosystems. **Contribution in Marine Science**, v. 27, p. 13-47, 1984.
- FURQUIM, N. R. **Safe food:** analysis of the institutional environment for beef offer in Brazil. 2012. 157 f. Tese (DOUTORADO)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- GANNES, L. Z.; DEL-RIO, C. M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 119, p. 725-737, 1998.
- GUO, B. L. et al. Stable C and N isotope ratio analysis for regional geographical traceability of cattle in China. **Food Chemistry**, v. 118, p. 915–920, 2010.
- HANDLEY, L. L.; RAVEN, J. A. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v. 15, p. 965-985, 1992.
- HEATON, K. et al. Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. **Food Chemistry**, v. 107, p. 506–515, 2008.
- HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. **The Condor**, v. 94, p. 181-188, 1992.



- JONES, R.; LUDLOW, M.; TROUGHTON, J. Estimation of the proportion of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species in diet of animals from the ratio of natural <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v. 92, p. 91-100, 1979.
- KELLY, S. et al. The application of isotopic and elemental analysis to determine the geographical origin of premium long rice. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 72-78, 2002.
- KELLY, S. D.; HEATON, K.; HOOGEWERFF, J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 555–567, 2005.
- KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 960-972, 1990.
- KNOBBE, N. et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. **Analytical Bioanal Chemistry**, v. 386, p. 104-108, 2006.
- LATTIN, J.; CARROL, J. D.; GREEN, P. E. **Análise de dados multivariados**. São Paulo: Cengage Learning, 2011.
- LOURENÇO, A. J.; MATSUI, E.; ARCARO JÚNIOR, I. Variações de valores de  $\delta^{13}\text{C}$  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, p.183-192, 1984.
- LUDLOW, M. M.; TROUGHTON, J. H.; JONES, R. J. A technique for determining the proportion of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species in plant samples using stable natural isotopes of carbon. **Journal Agricultural Science**, v. 87, p. 625-632, 1976.

- MARTIN, G. J. et al. Characterization of the Geographic Origin of Bordeaux Wines by a Combined Use of Isotopic and Trace Element Measurements. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 409-417, 1999.
- MINITAB. **Minitab statistical software user`s guide 2**: data analysis and quality tools. Minitab Release 16. State College: Minitab Inc., 2010.
- MOLKENTIN, J. Authentication of Organic Milk Using  $\delta^{13}\text{C}$  and the  $\alpha$ -Linolenic Acid Content of Milk Fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 785-790, 2009.
- MURAKAMI, E.; SARAIVA, A. M. Rastreabilidade da informação nas cadeias produtivas: padrões de troca de dados. **Revista Brasileira de Agroinformática**, v. 7, n. 1, p.58-66, 2005.
- NAKASHITA, R. et al. Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 148–152, 2008.
- PAULINO, M. F. et al. Soja grão e caroço de algodão em suplementos múltiplos para terminação de bovinos mestiços em pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, p. 484-491, dez. 2002.
- PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variation. In: **Plant Cell and Environment**, v. 15, p. 1091-1097, 1992.
- PIASSENTIER, E. et al. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, p. 239-247, 2003.
- SARTO, F. M. **Análise dos Impactos Econômicos e Sociais da Implementação da Rastreabilidade na Pecuária Bovina Nacional**. Trabalho de Conclusão de

- Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SCHWAGELE, F. Traceability from a European perspective. **Meat Science**, v. 71, p. 164-173, 2005.
- SCHMIDT, O. et al. Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. **Food Chemistry**, v. 91, p. 545–549, 2005.
- SHIBUYA, E. K. et al. Souring Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v. 160, p. 35-43, 2006.
- TIESZEN, L. L. et al. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. **Oecologia**, v. 57, p. 32-37, 1983.
- VIEIRA JÚNIOR, L. C. **Potencial da técnica dos Isótopos Estáveis para caracterização de diferentes sistemas de produção de bovinos de corte em condições Tropicais**. 2013. 54 f. Tese (DOUTORADO)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.
- VOGEL, J. C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. (Ed.). **Stable isotopes and plant carbon: water relations**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 29-46.
- WERNER, R. A.; SCHMIDT, H. L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v. 61, p. 465-784, 2002.
- YONEYAMA, T. Characterization of natural  $^{15}\text{N}$  abundances of soils. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S.I. (Ed.). **Mass Spectrometry of Soils**. Marcel-Dekker, New York, 1996. p. 205-223.

ZHAO, Y. et al. Tracing the Geographic Origin of Beef in China on the Basis of the Combination of Stable Isotopes and Multielement Analysis. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 61 p. 7055-7060, 2013.

ZHAO, Y. et al. RECENT DEVELOPMENTS IN APPLICATION OF STABLE ISOTOPE analysis on agro-product authenticity and traceability. **Food Chemistry**, v. 145, p. 300–305, 2014.

## **CAPÍTULO 2**

O capítulo 2 intitulado “**Diferenciação dos sistemas produtivos de bovinos Nelore criados em mesma propriedade pelas razões isotópicas da carne**” foi escrito de acordo com as normas do Periódico "Animal".

## **Diferenciação dos sistemas produtivos de bovinos Nelore criados em mesma propriedade pelas razões isotópicas da carne**

**RESUMO:** Objetivo do estudo foi avaliar a análise dos isótopos estáveis ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$  e  $^{15}\text{N}$ ) da carne na caracterização dos sistemas de terminação de bovinos Nelore criados na mesma propriedade. Três sistemas de terminação de bovinos de corte foram escolhidos, sendo estes: confinamento, semi-confinamento e pasto. Vinte amostras de do *M. Semitendinosus* de cada sistema foram coletadas para análise. Os dados isotópicos dos músculos com e sem extração de gordura foram submetidos à análise de univariada (ANOVA) e multivariada (MANOVA). O Carbono-13 foi diferente ( $P \leq 0,001$ ) entre os sistemas de terminação. O Nitrogênio-15 foi maior ( $P \leq 0,001$ ) para as amostras de confinamento, em comparação às amostras de semi-confinamento e pasto. Os elementos  $^2\text{H}$  e  $^{16}\text{O}$  não foram diferentes ( $P > 0,05$ ). O método de extração de gordura das amostras de carne aumentou a variabilidade dos resultados, diminuindo a distinção dos sistemas produtivos. A combinação dos elementos significativos obteve um total percentual de variação de 87,4% nos dois primeiros componentes diferenciando os três sistemas e pela análise de discriminante linear determinou uma taxa global correta de classificação de 98,3% e uma taxa de validação cruzada de 95,0%. A razão isotópica dos elementos Carbono e Nitrogênio com e sem extração de gordura, permitem diferenciar e certificar as amostras de carne entre os sistemas de confinamento, semi-confinamento e pasto com alta precisão em mesma propriedade.

**Palavras-chave:** confinamento; pasto, rastreabilidade; semi-confinamento

*Differentiation of productive systems of Nellore cattle reared on the same farm by the isotopic ratios of the meat*

**ABSTRACT:** The objective of the study was to evaluate the analysis of the stable isotope ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$  e  $^{15}\text{N}$ ) of the meat in the characterization of Nellore cattle finishing systems reared in the same farm. Three finishing systems of beef cattle were chosen for the study, being these: feedlot, semi-feedlot and pasture. Twenty samples of *M. Semitendinosus* from each system were collected for analysis. The isotopic data of the muscles with or without fat extraction were submitted to univariate (ANOVA) and multivariate analysis (MANOVA). Carbon-13 was different ( $P \leq 0.001$ ) between finishing systems. Nitrogen-15 was higher ( $P \leq 0.001$ ) for the feedlot samples compared to the semi-feedlot and pasture samples. The elements  $^2\text{H}$  and  $^{16}\text{O}$  were not different ( $P > 0.05$ ). The fat extraction method of the meat samples increased the variability of the results, reducing the distinction of the productive systems. The combination of the significantly different elements obtained a total percentage of variation of 87.4% in the first two components differentiating the systems and by linear discriminant analysis, we determined a correct global classification rate of 98.3% and a cross-validation rate of 95.0%. The isotopic ratio of the Carbon and Nitrogen elements with and without fat extraction allows to differentiate and certify the meat samples between the feedlot, semi-feedlot and pasture systems with high precision in the same farm.

**Keywords:** feedlot; pasture; traceability; semi-feedlot

## 1. INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais interessados na procedência dos alimentos que consomem. Para certos produtos, como os vinhos, a indicação da origem geográfica tem sido prática estabelecida por muitos anos na Europa, mas para outros alimentos e bebidas este tipo de comercialização é mais recente (Camim et al. 2017). Em alguns países europeus, os rótulos de determinados produtos com indicação geográfica ou marca tem longa tradição (por exemplo, queijo francês e italiano). Atualmente, na Europa, alguns produtos com origem geográfica específica utilizam o método de produção oficialmente protegido (Denominação de Origem Protegida = DOP; Indicações Geográficas Protegidas = IGP) e este número está aumentando anualmente, atingindo total de 1328 produtos registrados no início de março de 2016 (Camim et al., 2017). As leis europeias CE nº 510/2006 e 1151/2012 exigem proteção contra a rotulagem errada dos alimentos DOP e IGP. A este respeito, entre outros, são necessárias estratégias analíticas adequadas para evitar que os consumidores sejam enganados e proteger os produtores honestos (Camim et al. 2017).

A possibilidade de determinar como o animal foi produzido e seu local de origem é um avanço para o sistema de rastreabilidade, suprimindo uma das exigências dos mercados consumidores em caracterizar o produto pela forma que foi produzido antes do abate. Das muitas técnicas disponíveis para auxiliar em testes de rastreabilidade de alimentos, o método mais amplamente utilizado é a espectrometria de massa de razão isotópica (Rossmann, 2001; Camim et al., 2017), sendo esta análise uma ferramenta com potencial de autenticidade dos alimentos que possibilita a investigação de fontes alimentares isotopicamente distintas (DeNiro e Epstein, 1978).

Vários produtos foram aferidos com sucesso utilizando a AIE para



autenticidade, qualidade e origem geográfica de produtos, como caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos ibéricos (González Martin et al., 1999), tipos de alimentação de ovinos (Piasentier et al., 2003) e bovinos (Guo et al., 2010).

Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a análise dos isótopos estáveis ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$  e  $^{15}\text{N}$ ) da carne na caracterização dos sistemas de terminação de bovinos Nelore criados na mesma propriedade. A hipótese do presente estudo é que os valores de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  e  $\text{H}^2/\text{H}^1$  na carne de bovinos apresentem “assinatura isotópica” para cada sistema adotado através das diferenças no padrão isotópico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais, dados dos sistemas de produção*

O estudo foi aprovado conforme normas de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 143/2014-CEUA. Uma propriedade localizada no município de Bataguassu – MS (21° S, 52° W, 329 m) foi escolhida pela Associação de Criadores de Nelore do Brasil (ACNB), baseado no Programa de Qualidade de Nelore Natural, os animais devem ser mantidos a maior parte de sua vida alimentando-se de forrageiras, com ou sem suplementação, sendo que no período de terminação para o abate, podem receber dietas totais ou parciais em cochos, respeitando-se a legislação vigente. Diante disso, a produção de bovinos dentro da propriedade escolhida era realizada de três formas: Confinamento, Semi-confinamento e Pasto, de acordo com cada sistema de terminação, vinte animais foram escolhidos aleatoriamente e colhidas informações da alimentação antes do abate.

Os bovinos do presente estudo eram oriundos de recria em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (C<sub>4</sub>) e com suplementação mineral proteica

energética (contendo ingredientes C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>), sendo fornecidos aproximadamente três gramas por quilo de peso vivo por animal. Na terminação em pasto, os animais continuaram a receber a mesma suplementação durante a fase de engorda, sendo abatidos com aproximadamente 24 meses de idade.

No sistema de semi-confinamento, receberam dieta de terminação no cocho nos últimos 56 dias em área com boa disponibilidade de pastejo. A dieta de terminação era composta por silagem de sorgo 50% (C<sub>4</sub>), silagem de grão de milho úmido 30% (C<sub>4</sub>), casca de soja 17,5% (C<sub>3</sub>) farelo de soja 2% (C<sub>3</sub>), núcleo mineral 1% e ureia 0,5%. Os animais foram abatidos com aproximadamente 24 meses.

Os animais do sistema de confinamento receberam a mesma dieta de terminação que os animais de semi-confinamento nos últimos 56 dias em área sem disponibilidade de pastagem, sendo os animais abatidos com aproximadamente 18 meses de idade.

#### *Colheita, preparação e pesagem das amostras*

Um total de 60 amostras de carne, 20 de cada sistema de produção, do *M. Semitendinosus* (Lagarto) com aproximadamente 50 gramas, foram coletadas no mesmo dia (maio/ 2016) em frigorífico comercial licenciado. Após as coletas das amostras, estas foram empacotadas a vácuo e refrigeradas a -20°C até a realização das mensurações isotópicas no Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

Para as análises isótopos estáveis de C, N, O e H, as amostras foram cortadas e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi – Ma 035), à temperatura de 50°C, por um período de 48h. Partes das amostras após a secagem foram desengorduradas com éter etílico em aparelho de Soxhlet, à temperatura de 65°C, durante 4 horas.

Posteriormente, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 50°C durante meia hora, para que ocorresse evaporação do éter.

### *Análise isotópica*

Todas as amostras de carne foram moídas em moinho criogênico Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010, à -196°C. Essas foram pesadas (carbono, 50-70µg; nitrogênio, 500-600µg; hidrogênio, 200-250µg; e oxigênio, 250-300µg) em cápsula de prata para H e O e de estanho para C e N (5mm x 3mm) e permaneceram em dessecador com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, pelo período de 24 h antes da análise. Após a pesagem, para determinação da composição isotópica das amostras, as cápsulas foram introduzidas por meio de um amostrador automático no analisador elementar, *Flash HT 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*. Os gases resultantes (H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e CO) formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massa de razões isotópicas (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific, Alemanha*) no Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. Os resultados foram expressos em notação δ, em relação ao padrão internacional Vienna-Pee Dee Belemnite (PDB) para δ<sup>13</sup>C, Ar atmosférico para δ<sup>15</sup>N e Vienna – Standar Mean Ocean Water (SMOW) para δ<sup>18</sup>O e δ<sup>2</sup>H, calculado pela equação:

$$\delta_{(\text{amostra; padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \cdot 10^3$$

δ = enriquecimento relativo da amostra em relação ao padrão. Adimensional.

R = razão isotópica da amostra e do padrão. Adimensional.

### *Análise estatística*

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Ryan-Joiner), sendo feito o ajuste nas variáveis de Carbono com ou sem extração de gordura e Nitrogênio com extração de gordura pela transformação de Johson. Os elementos foram analisados utilizando análise de univariada (ANOVA) para avaliar diferenças significativas nos  $\delta^nX$  médios dos elementos entre os sistemas de produção. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Foi utilizado o Diagrama de Dispersão nos valores de  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  da carne para comparar o efeito dos sistemas e extração de gordura. Para reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados e descrever toda variabilidade do sistema usando menor número de variáveis, utilizou-se a análise de componentes principais (CPA). O primeiro componente principal (CP1) descreve a variação máxima possível, e o segundo CP representa o segundo mais.

Na análise de discriminante, as variáveis foram utilizadas para fazer o perfil da carne de cada sistema. Assim as amostras foram distinguidas e classificadas para que se alcance a separação ou discriminação mais clara possível entre os tratamentos através dos parâmetros analíticos, além disso, foi feito o teste de validação cruzada para avaliar a capacidade de predição de cada parâmetro. A capacidade de predição foi expressa em porcentagem de amostras classificadas corretamente em relação a todo o conjunto de dados. Para análise dos resultados foi utilizado o programa estatístico Minitab, versão 16.0 (MINITAB®).

### **3. RESULTADOS**

O isótopo estável que mais contribuiu para separação dos sistemas de produção foi o  $^{13}C$  (com e sem extração de gordura), sendo significativamente diferentes ( $P <$

0,001) entre todos os sistemas estudados. O  $\delta^{15}\text{N}$  foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) para as amostras de confinamento, em comparação às amostras de semi-confinamento e pasto. Os  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  (com e sem extração de gordura) não foram significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ), sendo os valores semelhantes entre os sistemas (Tabela 1).

O método de extração de gordura das amostras de carne aumentou a variabilidade dos resultados, observado pelo gráfico de dispersão dos  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  na figura 1, sendo melhor distinção dos sistemas produtivos sem extração de gordura.

Na análise de componentes principais, as amostras com extração de gordura e sem extração de gordura, apresentaram uma variabilidade de 43,1 e 45,4%, explicadas no primeiro componente principal (CP1), sendo a maior contribuição para o agrupamento pelos valores dos elementos Carbono e Nitrogênio, os quais permitiram a separação dos sistemas de confinamento e pasto (Figura 2). Os totais percentuais explicados nos dois primeiros componentes foram de 68,2 e 70,2% de variação. A combinação dos elementos (C e N) significativos com e sem extração de gordura, explicaram 75,2% da variabilidade do CP1, totalizando 87,4% da variação nos dois primeiros componentes, que permitiram a distinção dos três sistemas produtivos (Figura 2).

Para análise de discriminante linear os elementos (C e N) diferentes das amostras de músculos com e sem gordura foram utilizados para estabelecer o modelo de classificação, que foi então avaliado por procedimento de validação cruzada. A classificação foi obtida com taxa global correta de classificação de 98,3% e taxa de validação cruzada de 95,0% (Tabela 2). Este modelo de classificação pode discriminar claramente as amostras entre os sistemas de confinamento e pasto. Todavia, o sistema

de semi-confinamento teve três amostras confrontadas com as amostras de confinamento, resultando em taxa de 95,0% de proporção correta pela validação cruzada.

#### **4. DISCUSSÃO**

No presente estudo, os animais em pasto foram alimentados com capim  $C_4$  e com suplemento proteico energético, podendo este ter parte de sua composição de fonte vegetal  $C_3$ . Os valores de  $\delta^{13}C$  nestes animais apresentaram-se mais enriquecidos, devido à principal fonte alimentar dos animais ser o capim  $C_4$ . Em contrapartida, os bovinos confinados foram alimentados com ração de terminação no cocho, contendo ingredientes  $C_3$  e  $C_4$ , que gerou valor menos enriquecido nas carnes, devido à presença de soja ( $C_3$ ) em sua composição. O semi-confinamento, por sua vez, apresentou valor isotópico intermediário entre os sistemas. A composição dietética dos três sistemas de produção permitiu a diferenciação através dos valores de  $\delta^{13}C$ , no qual as proporções dos ingredientes  $C_3$  e  $C_4$  destinados à alimentação dos bovinos foram determinantes para os valores refletidos nas carnes.

Alguns autores constataram que diferentes proporções de ingredientes  $C_3$  e  $C_4$  podem caracterizar o local de origem (Bong et al., 2010; Guo et al. 2010; Zhao et al. 2013). No Brasil, Vieira Júnior (2013) verificou que há diferença nos valores de  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  entre os sistemas de confinamento convencional, confinamento superprecoce e pasto.

Para explicar os valores intermediários das amostras de carnes produzidas em semi-confinamento foi aplicado a equação de diluição isotópica de Ducatti (2007), pois o produtor não conseguiu informar a quantidade oferecida de ração no cocho. A partir

disso, empregou-se a equação nos resultados do estudo e estimou-se que 53% da alimentação dos bovinos foram por ração e 47% de capim. Para aplicação da equação de diluição isotópica com duas fontes, utilizaram-se as médias dos valores conhecidos das amostras de carne de  $\delta^{13}\text{C}$  sem extração de gordura. Outros autores estudaram a técnica de isótopos nas determinações de proporções de plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , confirmando a confiabilidade deste método (Norman et al. 2009; Jones et al., 1979), no entanto enfatizaram a importância de considerar a digestibilidade dos alimentos.

O tempo de permanência dentro dos sistemas de confinamento e semi-confinamento é outro fator que deve ser considerado, pois a troca dos elementos presentes na dieta é dependente do tempo para promover a incorporação desses nos tecidos dos animais (Schwagele, 2005). Além disso, a assimilação dos elementos contidos na dieta pelos diferentes tecidos do animal sofre muita influência de fatores fisiológicos, bioquímicos e ecológicos (Gannes et al., 1997).

Bahar et al. (2008) testaram a AIE no sistema de rastreabilidade para autenticação de produtos de origem animal e verificaram que houve alterações consideráveis na composição dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no músculo de bovinos devido à substituição da silagem de capim ( $\text{C}_3$ ) pela silagem de milho ( $\text{C}_4$ ). No entanto, o tecido do *M. longissimus thoracis et lumborum* não foi adequado para mudanças curtas e recentes de dietas, pois após 167 dias de experimento, o *turnover* do tecido não tinha sido completo. No presente estudo, caso o tempo de permanência dentro dos sistemas fossem superiores poderiam gerar valores menos enriquecidos de  $\delta^{13}\text{C}$ .

O elemento nitrogênio foi caracterizado principalmente pela dieta consumida, isto porque os valores nos músculos dos animais produzidos em confinamento teve

maior enriquecimento de  $\delta^{15}\text{N}$ . Alguns autores verificaram que os valores do nitrogênio fixado na matéria vegetal têm influência dos compostos nitrogenados presentes no solo e da capacidade absorptiva das plantas fixarem o nitrogênio do ar atmosférico (Choi et al. 2002; Handley e Raven, 1992; Werner e Schmidt, 2002; Zhang et al. 2012). No presente estudo, o local onde foram implantados os sistemas possuía as mesmas condições de solo.

Em estudo com vacas leiteiras criadas sob um regime de alimentação controlada, Knobbe et al. (2006) verificaram que a eliminação de  $^{15}\text{N}$  pela urina são menores e maiores no leite em relação à dieta, devido ao fracionamento isotópico durante o ciclo da ureia. DeNiro e Epstein (1981) observaram valores mais enriquecidos que a dieta, que pode ser devido ao potencial de contribuição da digestão ruminal e preferência do isótopo mais pesado no metabolismo de síntese (Gannes et al., 1998).

Também o enriquecimento de  $\delta^{15}\text{N}$  no tecido animal é dependente da eficiência dos animais em assimilar o nitrogênio dietético. Quanto mais próximos estão os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do tecido animal à dieta, maior a eficiência de assimilação (Cantalapiedra-Hijar et al. 2015; Gaye-Siessegger et al., 2004; Poupin et al., 2014; Wheadon et al., 2014), observada na diferença das amostras de animais mais jovens do sistema de confinamento. Outra possível explicação para os valores semelhantes de amostras de pasto e semi-confinamento é o melhor aproveitamento de nitrogênio via salivagem pela reciclagem de ureia, devido ao processo de ruminação ser maior em dieta com alta fibra pela síntese proteica das bactérias celulolíticas, favorecidas pelo pH mais alto (Van Soest 1994). No entanto, os fatores que influenciam essa assimilação ainda não são bem elucidados na literatura.



Oxigênio e hidrogênio apresentaram valores semelhantes entre os sistemas de produção, devido à fonte de água consumida ser a mesma para todos os animais, logo, as dietas não contribuíram para distinção dos sistemas. Nakashita et al. (2008), constataram que a água consumida tem maior contribuição na composição do tecido muscular, visto que a composição isotópica de oxigênio na carne bovina japonesa mostrou correlação positiva com a composição isotópica da água potável ingerida pelos animais, cuja diferença foi claramente dependente da latitude, podendo ser bom indicador em propriedades diferentes.

O método de extração de gordura nas amostras de carne aumentou a variabilidade dos resultados, porém permitiu a diferenciação dos sistemas, podendo estar relacionado à escolha do M. *Semitendinosus* ser menos afetado com o método (Viera Junior, 2013). Contudo, a gordura intramuscular, em bovinos Nelore é depositada mais tardiamente na carcaça e está diretamente ligada à quantidade de energia da dieta (Silva et al., 2009), podendo ser determinante na diferenciação dos sistemas produtivos por meio da assimilação dos elementos assimilados pelos tecidos nesta fase. Tieszen et al. (1983) relataram que os tecidos que contêm uma alta proporção de lipídios têm valores de  $\delta^{13}\text{C}$  mais negativos do que aqueles com menor teor de lipídios.

Para melhor identificação e discriminação das carnes de diferentes sistemas de produção de bovinos, a combinação dos resultados com e sem extração de gordura foram necessários para garantir a qualidade e autenticidade da análise. O emprego da análise de CP com análise de discriminante foi fundamental para evidenciar a caracterização dos sistemas de produção através das amostras de carne, corroborando com alguns autores (Eramus et al., 2016; Zhao et al., 2014; Zhao et al., 2013; Viera

Junior 2013; Heaton et al., 2008). Logo, a análise de isótopos estável oferece suporte técnico robusto para vigilância de mercado e controle de qualidade do produto (Chen et al., 2017).

## **5. CONCLUSÃO**

A razão isotópica dos elementos Carbono e Nitrogênio com e sem extração de gordura permitem diferenciar e certificar as amostras de carne entre os Sistemas de Confinamento, Semi-confinamento e Pasto com alta precisão na mesma propriedade.

## **6. REFERÊNCIAS**

- Bahar B, Monahan FJ, Moloney AP, O'Kiely P, Scrimgeour CM e Schmidt O 2008. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Communications Mass Spectrometry* 19, 937-1942.
- Bong Y, Shin W, Lee A, Kim Y, Kim K, Lee K 2010. Tracing the geographical origin of beefs being circulated in Korean markets based on stable isotopes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 155-159.
- Camin F, Boner M, Bontempo L, Fauhl-Hassek C, Kelly SD, Riedl J, Rossmann A 2017. Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. *Trends in Food Science & Technology* 61, 176–187.
- Cantalapiedra-Hijar G, Fouillet H, Huneau JF, Fanchone A, Doreau M, Nozière P, Ortigues-Marty I 2015. Relationship between efficiency of nitrogen utilization and isotopic nitrogen fractionation in dairy cows: contribution of digestion v. metabolism? *Animal* 10, 221-229.

Chen T, Chen, G, Yang S, Zhao Y, Ha Y and Ye Z 2017. Recent developments in the application of nuclear technology in agro-food quality and safety control in China. *Food Control* 72, 306-312.

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

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

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

Ducatti C 2007. Aplicação de isótopos estáveis em aquicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36, 1-10.

Erasmus SW, Muller M, Rijst MVD and Hoffman LC 2016. Stable isotope ratio analysis: A potential analytical tool for the authentication of South African lamb meat. *Food Chemistry* 192, 997–1005.

Gannes LZ, Martinez del Rio C and Koch P 1998. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119, 725–737.

Gannes LZ, O'Brien DM and Martinez de Rio C 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78, 1271–1276.

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

- Guo BL, Wei YM, Pan JR, Li Y 2010. Stable C and N isotope ratio analysis for regional geographical traceability of cattle in China. *Food Chemistry* 118, 915–920.
- Handley LL and Raven JA 1992. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant Cell and Environment* 15, 965-985.
- Heaton K, Kelly SD, Hoogewerff J, Woolfe M 2008. Verifying the geographical origin of beef: the application of multi-element isotope and trace element analysis. *Food Chemistry* 107, 506–515.
- Hobson KA and Clark RG 1992. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. *The Condor* 94, 181-188.
- Jones R, Ludlow M, Troughton J 1979. Estimation of the proportion of  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plant species in diet of animals from the ratio of natural  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  isotopes in the faeces. *Journal of Agricultural Science* 92, 91-100.
- Knobbe N, Vogl J, Pritzkow W, Panne U, Fry H, Lochotzke HM, Preiss-Weigert A 2006. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. *Analytical Bioanal Chemistry*, 386, 104-108.
- Nakashita R, Suzuki Y, Akamatsu F, Iizumi Y, Korenaga T, Chikaraishi Y 2008. Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. *Analytica Chimica Acta* 617,148-52.
- Norman HC, Wilmot MG, Thomas DT, Masters DG, Revell DK 2009. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of  $\text{C}_3$  annual pastures and saltbush or  $\text{C}_4$  perennial grasses. *Livestock Science* 121, 162-172.
- Piasentier E, Valusso R, Camin F, Versini G 2003. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science* 64, 239-247.

Poupin N, Mariotti F, Huneau JF, Hermier D and Fouillet H 2014. Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: a compartmental model analysis. *PLOS Computational Biology* 10, e1003865.

Rossmann A 2001. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Reviews International* 17, 347–381.

Schwagele F 2005. Traceability from a European perspective. *Meat Science* 71, 164–173.

Silva SL, Leme PR and Putrino SM 2009. Fatty acid composition of intramuscular fat from Nelore steers fed dry or high moisture corn and calcium salts of fatty acids. *Livestock Science* 122, 290-295.

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

Van Soest PJ 1994. Nutrition ecology of ruminants. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.

Vieira Júnior LC 2013. Potencial da técnica dos Isótopos Estáveis para caracterização de diferentes sistemas de produção de bovinos de corte em condições Tropicais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

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

Wheadon NM, McGee M, Edwards GR and Dewhurst RJ 2014. Plasma nitrogen isotopic fractionation and feed efficiency in growing beef heifers. *British Journal of Nutrition* 111, 1705–1711.

Zhang L, Pan J, Zhu C 2012. Determination of the geographical origin of Chinese teas based on stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Journal Zhejiang University Science B* 13, 824–830.

Zhao Y, Zhang B, Chen G, Chen A, Yang S, and Ye Z 2013. Tracing the Geographic Origin of Beef in China on the Basis of the Combination of Stable Isotopes and Multielement Analysis. *Journal Agricultural Food Chemistry* 61, 7055–7060.

Zhao Y, Zhang B, Chen G, Chen A, Yang S, Ye Z 2014. Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability. *Food Chemistry* 145, 300–305.

**Tabela 1.** Médias e erros médios padrões do enriquecimento isotópico dos elementos em amostras de carne com ou sem extração de gordura dentre os diferentes sistemas de produção

$\delta$ , ‰*	Confinamento	Semi-confinamento	Pasto	EMP	P-valor
$^{13}\text{C}$	-13,26 <sup>c</sup>	-12,50 <sup>b</sup>	-11,65 <sup>a</sup>	0,34	<0,01
$^2\text{H}$	-69,99	-68,48	-68,60	5,04	0,58
$^{18}\text{O}$	-32,57	-32,26	-30,79	2,42	0,06
$^{15}\text{N}$	5,27 <sup>a</sup>	4,40 <sup>b</sup>	4,25 <sup>b</sup>	0,37	<0,01
$^{13}\text{C}_{\text{desengordurado}}$	-12,82 <sup>c</sup>	-12,36 <sup>b</sup>	-11,60 <sup>a</sup>	0,20	<0,01
$^2\text{H}_{\text{desengordurado}}$	-69,56	-67,21	-66,37	4,87	0,11
$^{18}\text{O}_{\text{desengordurado}}$	-33,25	-32,90	32,56	2,99	0,76
$^{15}\text{N}_{\text{desengordurado}}$	5,52 <sup>a</sup>	4,52 <sup>b</sup>	4,48 <sup>b</sup>	0,39	<0,01

\*Médias com letras iguais na mesma linha não são significativamente diferentes de acordo com teste Tukey;  $P < 0,05$ .

**Tabela 2.** Classificação de amostras de carne em diferentes sistemas de alimentação e porcentagem de observações classificadas corretamente

	Associação do grupo prevista <sup>a</sup>			Total
	Confinamento	Semi-confinamento	Pasto	
<b>Original</b>				
Confinamento	20			20
Semi-Confinamento	1	19		20
Pasto			20	20
Contagem, %	100	95	100	98 <sup>b</sup>
<b>Cruzada</b>				
Confinamento	20			20
Semi-confinamento	3	17		20
Pasto			20	20
Contagem,%	100	85	100	95 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Número de observações classificadas corretamente tabulados na diagonal. <sup>b</sup> 98% das observações empíricas agrupadas são classificadas corretamente. <sup>c</sup> 95% da validação cruzada agrupadas são classificadas corretamente.



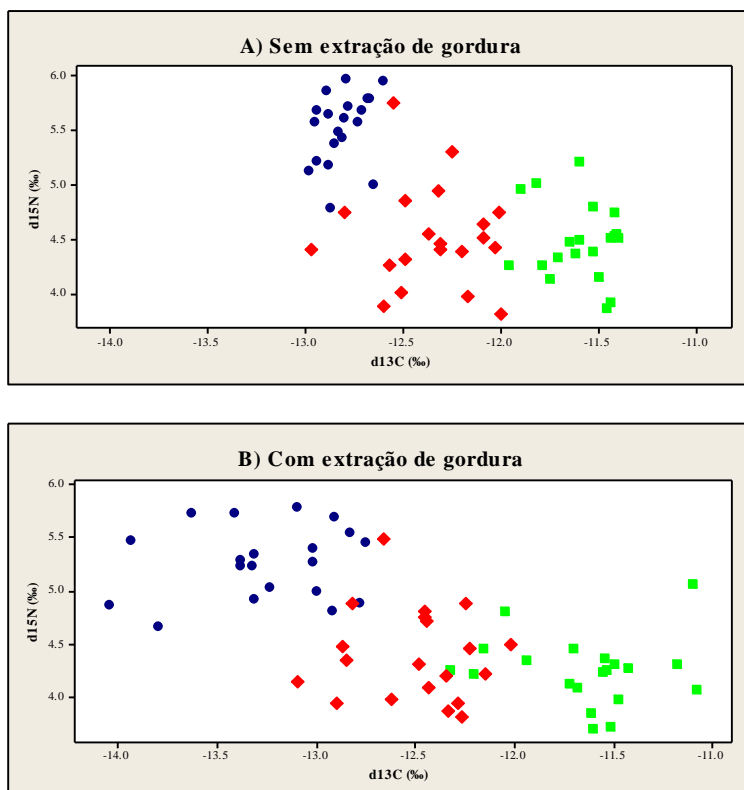


Figura 1. Gráfico de dispersão das razões de Carbono-13 e Nitrogênio-15 de bovinos Nelore criados em diferentes sistemas de produção. (A) sem extração de gordura e (B) com extração de gordura: Confinamento convencional (●); Semi-confinamento (◆); e Pasto (■).

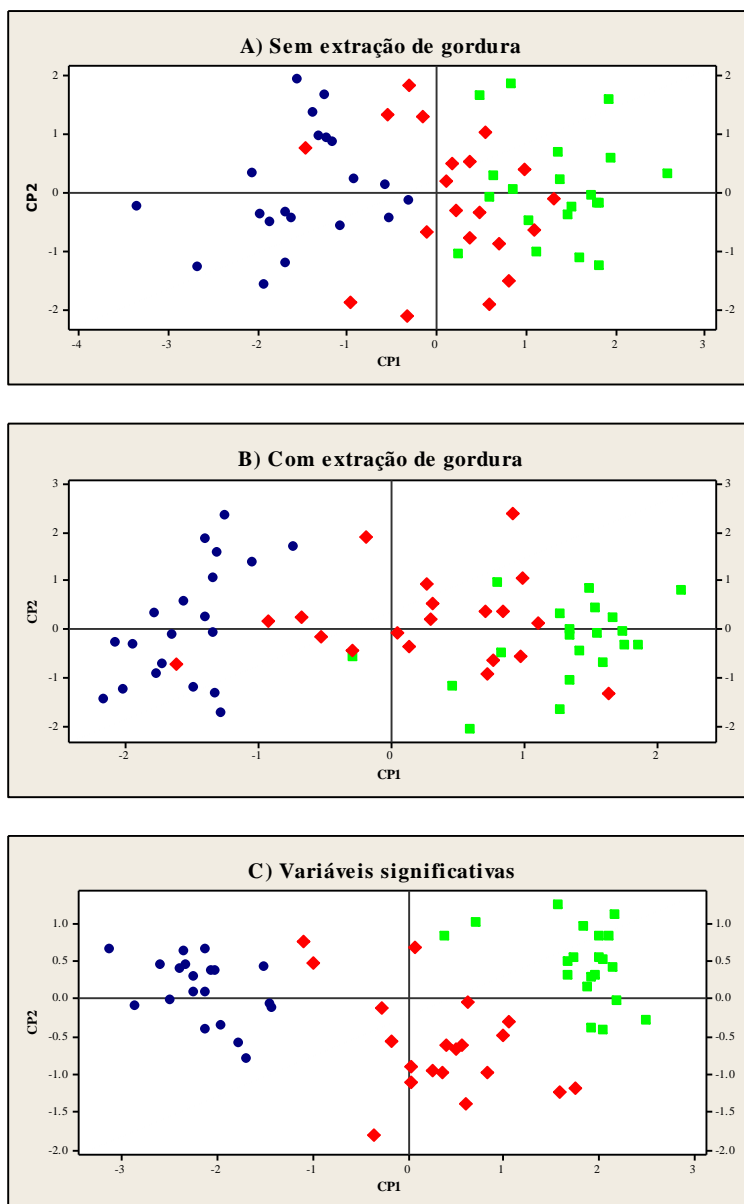


Figura 2. Análise de Componentes principais de músculos de bovinos criados em diferentes sistemas de produção sem (A) e com (B) extração de gordura, e dos elementos significativos pela ANOVA (C): Confinamento convencional (●); Semi-confinamento (◆); e Pasto (■).

## **CAPÍTULO 3**

## IMPLICAÇÕES

Diferenças no histórico alimentar de bovinos de corte são detectadas a partir da análise de isótopos estáveis (AIE). Entretanto, é necessário determinar o período a ser analisado para obter resultado mais adequado para distinção.

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

Entretanto, a aplicabilidade desta técnica na rastreabilidade da carne bovina no Brasil ainda precisa de ajustes. A utilização dos isótopos estáveis como ferramenta aplicada, precisa da composição dietética e preferencialmente a realização da análise isotópica de cada componente da dieta. A diferença na abundância natural dos elementos entre animal e a dieta ofertada é um bom indicador para prever a eficiência da utilização dos elementos, pois o enriquecimento do isótopo mais pesado pode sofrer influência no processo metabólico do animal.

Nossos resultados com sistemas de terminação demonstraram que a dieta de confinamento oferecida não aumentou ou enriqueceu o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  dos animais do sistema de semi-confinamento, sendo semelhante aos valores de animais em pasto, que pode ser explicado pela maior reciclagem de Nitrogênio em dietas com alta fibra ou preferência dos microorganismos no processo de digestão.

Nestas condições, talvez o metabolismo dos animais possa ser o mais importante, causando diferenças de assimilação dos elementos devido às variações nos

níveis metabólicos e o fracionamento dos elementos, sendo necessários mais estudos para elucidação dessa hipótese.

O método de extração de gordura aumenta a variabilidade dos dados, por removerem o conteúdo lipídico das amostras neste procedimento, podendo descaracterizar a assinatura das fontes alimentares na assimilação isotópica dos tecidos durante a fase de terminação.