

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

ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE CAMA DE AVIÁRIO NA ALIMENTAÇÃO DE
BOVINOS

VÂNIA LUZIA FOURNOU DE LIMA

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

BOTUCATU - SP

Julho/2018

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

ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE CAMA DE AVIÁRIO NA ALIMENTAÇÃO DE
BOVINOS

VÂNIA LUZIA FOURNOU DE LIMA
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni

Coorientador: Profa. Dra. Cyntia Ludovico Martins

Prof. Dr. Paulo Roberto de Lima Meirelles

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

BOTUCATU - SP

Julho/2018

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

L732i Lima, Vânia Luzia Fournou de, 1986-
Isótopos estáveis de carbono e nitrogênio para identificação de cama de aviário na alimentação de bovinos / Vânia Luzia Fournou de Lima. - Botucatu : [s.n.], 2018
72 f.: grafs., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018
Orientador: Mário de Beni Arrigoni
Coorientador: Cyntia Ludovico Martins
Coorientador: Paulo Roberto de Lima Meirelles
Inclui bibliografia

1. Bovino - Alimentação e rações. 2. Isótopos estáveis. 3. Carbono. 4. Nitrogênio. 5. Cama de frango. 6. Confinamento (Animais). I. Arrigoni, Mário de Beni. II. Martins, Cyntia Ludovico. III. Meirelles, Paulo Roberto de Lima. IV. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. V. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

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

Pensamentos...

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.
(George Bernard Shaw)

Aos meus pais, Luiz e Dirce, as minhas irmãs, Vanessa e Vivian e ao meu amigo irmão Lucas. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto. Obrigada por estarem ao meu lado sempre! Porque vocês sempre me apoiaram para que eu não desistisse de caminhar nunca, ainda que em passos lentos, é preciso caminhar para chegar a algum lugar.

Dedico!

Dedico, em especial, ao meu eterno orientador Prof. Dr. Carlos Ducatti.
... Com o senhor, para o senhor e pelo senhor “Tatão” ...
(1949-2016)

“...quero estar com você
Na alegria e no prazer
Se vier à escuridão
Nós então nos daremos as mãos
E parceiros na estrada da vida
Seremos a luz...”
(Juro - Almir Sater e Renato Teixeira)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Nossa Senhora Aparecida pela conquista, por me manter de pé e me ajudar a vencer todos os desafios lançados nessa caminhada.

A São Francisco de Assis por proteger os meus animais durante o período experimental. E não menos importante aos meus 8 animais (Savinho, Verruguinha, Cara Preta, Macha, Manchinha, Cabeçada, Preguiça e Curioso) que compartilharam as dificuldades comigo e muitas vezes eram os ouvintes das minhas queixas e súplicas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário de Beni Arrigoni que me acolheu sem questionar em nenhum momento. Minha gratidão por me ajudar a realizar esse sonho.

A minha coorientadora Profa. Dra. Cyntia Ludovico Martins, pela ajuda, atenção, incentivo e pela amizade.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Roberto de Lima Meirelles pela imensa ajuda, paciência, pela orientação dada, atenção, auxílio, amizade, sempre me acolhendo com muito carinho desde a graduação.

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa, por nos amparar no momento mais difícil que pudemos passar. Amizade, auxílio, dedicação ao Centro de Isótopos Estáveis, toda sua dedicação a todos os alunos.

A Prof. Maria Márcia Sartori pela atenção dada nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Confinamento: Wilson Pimentel Biazon (Boca), Carlos Eduardo Bueno (Dú) e José Sidney do Império por toda ajuda durante o período experimental. Ajuda não só nas coletas, mas com palavras de apoio. O serviço passou, mas a amizade permaneceu.

As funcionárias do Centro de Isótopos Estáveis: Cibele Regina de Souza Kruliski, Mariana Sasso Andreasi e Nádia dos Reis Cavalho, pelo acolhimento, momentos de descontração e auxílio na execução deste trabalho.

República Acasalar e Alcione histórias inenarráveis no almoço, nas festas e pelo acolhimento nos momentos mais difíceis, por todos esses anos que vocês se tornaram os MEUS meninos, mas em especial ao Sávio Franco que além de ser da família, me ajudou pessoalmente e profissionalmente.

Aos meus amigos que de alguma maneira me ajudaram a chegar até aqui: Ana Paula San Jorge e família (por todos esses anos de amizade e pelas orações a distância),

Danielle Fachiolli pela ajuda nas coletas. Marco Aurélio Factori e Marina Gabriela Berchiol da Silva por me introduzirem ao meio acadêmico.

Leonardo Rosolen Müller não só com a ajuda no início do experimento e com os meus dados, mas nos momentos em que eu estava mais preocupada com tudo!

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade de aprendizado e esclarecimentos na área.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo consentimento da bolsa o que me proporcionou continuar.

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.

A Dra. Juliana do Amaral Moreira C. Vaz, Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pela atenção dada ao projeto e por acreditar na pesquisa.

Costumo dizer que quem tem amigos, nunca está só. Felizmente, estou longe de ser uma pessoa sozinha. Não caberia nesse espaço, caso fosse citar um a um os nomes de todos os que me ajudaram nesse percurso.

Portanto meus amigos sintam-se agradecidos.

*“...É fácil você ter fé
Se não há nada de errado
É fácil você ter fé
Com os amigos do seu lado
É difícil a gente ter fé
Quando a casa cai
É difícil a gente ter fé
Quando o amor se vai
É difícil a gente ter fé
Quando tá tudo esquisito...
... A gente tem que ter fé
Sempre ...
(Fé – Fábio Junior e Aldo Gouveia)*

Sumário

CAPÍTULO 1	14
Considerações iniciais	15
1. Panorama da bovinocultura de corte	16
2. Utilização da cama de aviário na alimentação de ruminantes	16
3. Rastreabilidade Bovina	17
4. Isótopos Estáveis Ambientais	18
4.1 Carbono	20
4.2 Nitrogênio	22
5. Isótopos Estáveis na experimentação animal	22
5.1 Avanços metodológicos na pesquisa de Isótopos Estáveis em ruminantes no Brasil	24
6. Justificativa e objetivo	25
Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO 2	33
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Período pré experimental	37
3. Instalações e Animais	37
4. Manejo, arraçamento e cuidado com os animais	38
5. Escolha da categoria animal e componentes avaliados	39
6. Colheita, preparação e pesagem das amostras	40
7. Análise isotópica	41
8. Análise estatística	42
9. Resultados e Discussão	42
9.1 Nitrogênio nas Fezes	42
9.1.1 Carbono nas fezes	47
9.2 Nitrogênio no Sangue	49
9.2.1 Carbono no sangue	52
9.3 Nitrogênio no Plasma	55
9.3.1 Carbono no plasma	58
10. Comportamento isotópico do ¹³C e ¹⁵N nos componentes	61
10.1 Comportamento isotópico nas fezes	62
10.2 Comportamento isotópico no sangue	63
10.3 Comportamento isotópico no plasma	64
Conclusões	65
Referências Bibliográficas	66
CAPÍTULO 3	69
Implicações	70
ANEXO I	71
ANEXO II	72

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1.....	15
Tabela 1. A abundância natural dos isótopos estáveis dos elementos H, C, N, O e S e seus gases utilizados para análise por espectrometria de massa de razão isotópica.....	20
 CAPÍTULO 2.....	 33
Tabela 2. Composição percentual, análise química e valor isotópico das dietas experimentais.....	39
 Tabela 3: Peso médio dos animais dos respectivos tratamentos durante o período experimental.....	 42
 Tabela 4. Média estimada para % de Nitrogênio e $\delta^{15}\text{N}$ nas fezes para os tratamentos.....	 43
 Tabela 5. Média estimada para % de Carbono e $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes para os tratamentos	 47
 Tabela 6. Média estimada para % de Nitrogênio e $\delta^{15}\text{N}$ no sangue para os tratamentos.....	 50
 Tabela 7. Média estimada para % de Carbono e $\delta^{13}\text{C}$ no sangue para os tratamentos...	 53
 Tabela 8. Média estimada para % de Nitrogênio e $\delta^{15}\text{N}$ no plasma para os tratamentos.....	 56
 Tabela 9. Média estimada para % de Carbono e $\delta^{13}\text{C}$ no plasma para os tratamentos.....	 59

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1.....	15
CAPÍTULO 2.....	33
Figura 2: Consumo de matéria seca durante o período experimental.....	44
Figura 3: Dados climáticos (precipitação pluvial, temperaturas mínima, média e máxima) referentes ao período experimental, estação meteorológica FCA- Unesp, Campus Botucatu/SP (2016/17)	44
Figura 4. Comportamento dos valores médios $\delta^{15}\text{N}$ dos tratamentos nas fezes em função das coletas.....	45
Figura 5. Comportamento dos valores médios de porcentagem de nitrogênio dos tratamentos nas fezes em função das coletas.....	46
Figura 6. Comportamento dos valores médios de porcentagem de ^{13}C dos tratamentos nas fezes em função das coletas.....	48
Figura 7. Comportamento dos valores médios de porcentagem de carbono dos tratamentos nas fezes em função das coletas.....	49
Figura 8. Comportamento dos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ dos tratamentos no sangue em função das coletas.....	51
Figura 9. Comportamento dos valores médios de %N dos tratamentos no sangue em função das coletas.....	52
Figura 10. Comportamento dos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ dos tratamentos no sangue em função das coletas.....	54

Figura 11. Comportamento dos valores médios de %C dos tratamentos no sangue em função das coletas.....	55
Figura 12. Comportamento dos valores médios de ^{15}N dos tratamentos no plasma em função das coletas.....	57
Figura 13. Comportamento dos valores médios de %N dos tratamentos no plasma em função das coletas.....	58
Figura 14. Comportamento dos valores médios do ^{13}C dos tratamentos no plasma em função das coletas.....	60
Figura 15. Comportamento dos valores médios de %N dos tratamentos no plasma em função das coletas.....	60
Figura 16. Comportamento dos valores médios de ^{13}C e ^{15}N dos tratamentos nas fezes plasma em função dos períodos apresentados.....	62
Figura 17. Comportamento dos valores médios de ^{13}C e ^{15}N dos tratamentos no sangue dos períodos apresentados.....	63
Figura 18. Comportamento dos valores médios de ^{13}C e ^{15}N dos tratamentos no plasma dos períodos apresentados.....	64

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO I.....	71
ANEXO II.....	72

CAPÍTULO 1

Considerações iniciais

O Brasil figura atualmente como um dos principais na produção e comércio de carne bovina no mundo, reflexo de um estruturado processo de desenvolvimento que elevou não só a produtividade como também a qualidade do produto brasileiro e, conseqüentemente sua competitividade e abrangência de mercado. Em 2016, o efetivo brasileiro de bovinos foi de 218,23 milhões de cabeças, representando um aumento de 1,4% em comparação com o ano anterior. (IBGE, 2016).

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). O sistema de rastreabilidade SISBOV surgiu como um meio de transmitir transparência em toda a cadeia produtiva e contribuir para a inocuidade do alimento (FURQUIM, 2012).

Ressalta-se que o Brasil é o maior produtor comercial e exportador de carne bovina no mundo e, portanto, quanto mais segura e atestada for nossa carne, mais confiabilidade e abertura de mercados teremos de forma competitiva e certificada. Pesquisas direcionadas a Nutrição e Produção de Ruminantes assumem extrema relevância, a fim de melhor compreender e proporcionar suporte de cunho científico ao SISBOV já implantando no país. Isto, com a visão de certificar e autenticar os sistemas de produção de bovinos. Os trabalhos nacionais avaliando a aplicação da metodologia dos Isótopos Estáveis com foco na Nutrição de Ruminantes são poucos e recentes.

Além disto, avaliar a real contribuição da metodologia dos Isótopos Estáveis nas condições tropicais, a qual se insere o Brasil de maneira segura e com padrão estabelecido para a criação de um selo de certificação isotópico. Neste contexto, a técnica dos Isótopos Estáveis pode ser visualizada como uma ferramenta visando à autenticidade dos alimentos, particularmente, onde metodologias analíticas convencionais não podem prever resultados totalmente seguros (BAHAR et al., 2008).

1. Panorama da bovinocultura de corte

As atividades relativas à pecuária bovina de corte possuem destaques, dado que o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, sendo o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne bovina (IBGE, 2016).

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. Essa inocuidade do alimento se deu pelo fato da União Europeia pressionar o Brasil, já que alguns eventos ligados à segurança do alimento contribuíram para isso, entre eles a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), mais conhecida como doença da vaca louca (LIMA, 2013), fazendo com que agentes públicos e privados tomassem atitudes para erradicar o risco da doença e impedir sua disseminação.

2. Utilização da cama de aviário na alimentação de ruminantes

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 no máximo de 4 criadas até ser substituída (CARVALHO, 2015).

Em 2016 o total de abates de aves foi de 5,86 bilhões, o que representou aumento de 1,1% em relação ao ano anterior (IBGE, 2016). Considerando a geração de 4,98 kg de cama de aviário por frango alojado (USDA, 2009), o país teve uma produção anual de cama aviária de em torno de 30 milhões de toneladas.

Com a evolução da avicultura de corte comercial ocorreu também aumento na oferta de resíduo animal, como a cama de aviário e a necessidade de poder reutilizá-los ou eliminá-los. 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) nº 999/2001 (PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO, 2001), e no Brasil pela Instrução Normativa nº 08 (BRASIL, 2004).

Como a proibição do uso da cama aviária na alimentação de ruminantes, sua utilização como adubo orgânico é a saída encontrada por avicultores e produtores de leite e corte, tornando-o segura e rentável o destino desse resíduo da criação bem como viabilizar o custo de produção em substituição ao adubo inorgânico. O veto à cama aviária como alternativa de alimentação para bovinos decorre da constatação de que a presença da proteína animal, na ração, tem sido o principal vetor da disseminação pelo mundo da Encefalopatia Espongiforme Bovina, popularmente conhecida como “o mal da vaca louca”. A ingestão de cama aviária pode consistir também em surtos de botulismo, que geram perdas aos produtores e causam riscos à saúde humana (NEVES, 2005).

A “Vaca Louca” pode ser transmitida por meio de uma proteína chamada príon, presente na farinha de carne e ossos de animais infectados com a doença. Trata-se de uma moléstia crônica degenerativa, que afeta o sistema nervoso dos bovinos e provoca o descontrole motor (GONÇALVES, 2012).

3. Rastreabilidade Bovina

A segurança sanitária dos alimentos desempenha um papel estratégico no comércio mundial e representa preocupação global (NESBAKEN, 2009). De acordo com Sofos (2008), os desafios relacionados com a segurança de produtos de origem animal e as dificuldades no controle dos processos geram a necessidade de se criarem mecanismos que reduzam o risco potencial de doenças transmitidas por alimentos. Destaca-se a rastreabilidade como meio de integração de toda a cadeia produtiva em um sistema de monitoramento e certificação, melhorando a percepção de segurança para os consumidores, graças à geração de maior quantidade de informações sobre o produto (VERBEKE et al., 2010).

A exigência da rastreabilidade dos rebanhos imposta pelo mercado internacional e, posteriormente, regulamentada pelo governo brasileiro (JORGE; FERRAZ, 2010), ampliou o nível de complexidade da atividade pecuária a um patamar que tornou difícil gerenciar todos os processos produtivos de forma tradicional. Segundo Nääs (2003), a rastreabilidade é um processo crescente e irreversível, decorrente dos avanços tecnológicos e da demanda do mercado importador, que cada vez mais exige ética e transparência nos processos de produção e distribuição. Nesse processo de

monitoramento é essencial uma eficiente identificação dos animais que fazem parte da cadeia de produção.

Investigação sobre a rastreabilidade dos alimentos para dietas de carne e leite de ruminantes é realizado dentro de um contexto geral de aumento da demanda dos consumidores por informações e garantias sobre o modo de produção de animais, rações e alimentação animal, especialmente. Neste contexto, há uma necessidade de ferramentas de autenticação, para garantir objetivamente a especificação de que os compromissos tenham sido integralmente cumpridos.

Ser capaz de rastrear a alimentação fornecida aos animais é, portanto, um grande desafio para os cientistas e entidades comerciais e os agricultores. Recentemente esforços tem sido feito para desenvolver ferramentas analíticas para quantificar compostos específicos no produto ou nos tecidos dos animais que podem atuar como marcadores da dieta do animal.

4. Isótopos Estáveis Ambientais

A análise dos isótopos estáveis têm sido importante ferramenta para a compreensão de cadeias alimentares e fluxos de nutrientes nos sistemas de produção animal, uma vez que reflete todo o valor isotópico do carbono e nitrogênio proveniente da dieta a qual foi submetido, sendo avaliado, portanto sob diferentes parâmetros no animal, sendo mais comuns as fezes, sangue e plasma. Neste contexto, a análise dos Isótopos Estáveis pode ser uma ferramenta visando à autenticidade dos alimentos, particularmente, onde metodologias analíticas convencionais não podem prever resultados totalmente seguros (BAHAR et al., 2008).

A grande importância do método dos marcadores isotópicos é que eles podem ser identificados numa mistura os isótopos deste elemento, conforme o mesmo é encontrado na natureza, possibilitando o acompanhamento do isótopo nos diferentes compartimentos do sistema em estudo (quantitativa) (DUCATTI, 2007).

Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, com o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, conseqüentemente apresentando diferentes massas. Por possuírem sua estrutura eletrônica semelhante, 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 nomenclatura isotópica se expressa por ${}^A_Z X$, na qual, X representa o elemento

químico A reflete o número de massa em unidades de massa atômica e Z o número de prótons, de modo que $A = Z+N$, onde N representa o número de nêutrons (DUCATTI, 2012).

A mensuração da relação entre os isótopos estáveis é determinada pela técnica da espectrometria de massas, sob a forma de análise relativa, onde o enriquecimento relativo é expresso em delta, δ . O resultado da razão isotópica do produto (R) é comparado a um padrão internacional, sendo que, para os isótopos de nitrogênio o padrão adotado é o ar atmosférico o qual é considerado mistura isotópica homogênea na superfície terrestre (DUCATTI, 2012).

Os principais isótopos estáveis mais abundantes em organismo vivos são chamados de bioelementos (C, H, O, N e S) e suas abundâncias encontram-se explícitos na Tabela 1.

Tabela 1. A abundância natural dos isótopos estáveis dos elementos H, C, N, O e S e seus gases utilizados para análise por espectrometria de massa de razão isotópica

Isótopos Estáveis	Abundância átomos %	Gás	Isótopos Estáveis	Abundância átomos %	Gás
^1H	99,9844	H_2	^{16}O	99,7628	CO
^2H	0,0156		^{17}O	0,0372	
^{12}C	98,8890	CO_2	^{18}O	0,2000	
^{13}C	1,1110		^{32}S	95,0180	SO_2
^{14}N	99,6340	N_2	^{33}S	0,7500	
^{15}N	0,3660		^{34}S	4,2150	
			^{36}S	0,0170	

Fonte: Preston, 1992.

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).

A análise dos isótopos estáveis tem possibilitado pesquisas relacionadas à nutrição animal, devido ao fato de que os valores isotópicos determinados terem como base alimentos assimilados e não apenas alimentos ingeridos (DUCATTI, 2011). As análises dos isótopos estáveis dos bioelementos - carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio têm sido aplicadas de forma crescente e contínua em pesquisas agropecuárias. Os primeiros produtos investigados foram frutas, sucos, mel, vinho e álcool e, para todos eles, métodos oficiais por meio da análise isotópica para detectar a adição de água ou açúcar existem desde 1978 nos Estados Unidos e 1995 na Europa (DUCATTI, 2009).

No Brasil, em 2007, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicou a Instrução Normativa Nº 39 de 8 de agosto, a qual oficializou o método analítico para determinação da razão isotópica dos açúcares de diferentes origens no suco, refresco, néctar e bebida de uva (BRASIL, 2007). Como estes bioelementos (C, H, O, N, S) fazem parte da estrutura dos carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e são responsáveis por mais de 90% de todos os tecidos vivos, torna-se possível a utilização desta análise em estudos de nutrição e metabolismo animal. Pesquisas realizadas demonstraram que as razões isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e dos gases inalados (KENNEDY e KROUSE, 1990).

4.1 Carbono

O carbono é um dos principais elementos da natureza, uma vez que a matéria orgânica viva é composta principalmente de carbono, os ciclos de outros elementos importantes como nitrogênio e oxigênio são influenciados pelo ciclo desse elemento e as alterações antrópicas em muitas fases do seu ciclo biogeoquímico já estão influenciando o equilíbrio de muitos ecossistemas e da atmosfera global (desmatamentos, queimadas, efluentes domésticos, uso de combustíveis fósseis, etc.).

O uso dos isótopos estáveis em estudos ambientais baseia-se no fato de que a composição isotópica (proporção entre o isótopo raro e isótopo mais abundante) varia de uma forma previsível conforme o elemento cicla na natureza. A composição isotópica é expressa pela razão entre o isótopo menos abundante e o isótopo mais abundante (DUCATTI, 2011).

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$$

As pequenas frações dos isótopos estáveis dos bioelementos são analisados 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 (δ , ‰).

Em função da grande diferença na abundância natural dos isótopos estáveis do carbono, a mensuração da relação entre eles na maioria das amostras gera valores muito pequenos. Para converter esta relação, os valores isotópicos do carbono ($\delta {}^{13}\text{C}$) são expressos na terminologia dos isótopos estáveis, em delta per mil da razão isotópica ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ do produto em relação ao padrão internacional definido, Peedee Belemnite (PDB). Segundo Friedman; O'Neill (1977), este padrão é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Trata-se de um carbonato sólido de *Belemnitela do cretaceo*, *Belemnitela americana*, da formação Peedee da Carolina do Norte, empregado inicialmente como padrão (CRAIG, 1957).

Quando se tem valor negativo no $\delta {}^{13}\text{C}$, indica que o material estudado apresenta menor concentração de carbono em relação ao padrão internacional PDB. (DUCATTI et al., 1979; DUCATTI, 2007; VOGEL, 1993). A medida da relação entre isótopos estáveis é realizada por espectrometria de massas, que detecta a concentração dos diferentes isótopos do elemento.

A fonte primária do carbono para as plantas terrestres é o gás carbônico atmosférico, o qual apresenta valor de $\delta {}^{13}\text{C}$ de aproximadamente -7,7‰ (KENNEDY; KROUSE, 1990). Este carbono sofre discriminação isotópica ao longo do processo de

fotossíntese. O termo discriminação isotópica indica enriquecimento ou empobrecimento isotópico relativo do produto em relação à fonte precursora.

4.2 Nitrogênio

O elemento químico Nitrogênio apresenta somente dois isótopos estáveis: ^{14}N (99,634 átomos %) e ^{15}N (0,3665 átomos %). O reservatório natural, N_2 , é o nitrogênio molecular, presente no ar atmosférico, constituindo cerca de 78% do total. O nitrogênio é transformado em diversas formas e estados de oxidação devido, sobretudo, a processos físicos e pela ação de microrganismos que metabolizam os compostos nitrogenados em N inorgânico (nitrato e amoníaco) e N orgânico (aminoácidos e proteínas). O padrão de referência isotópico é o nitrogênio molecular do ar, logo, praticamente todo o N acessível à superfície do planeta tem o valor de $\delta^{15}\text{N}=0\text{‰}$.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ 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).

O ^{15}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 mais significativo, ao redor de 10‰ (SHIBUYA et al., 2006). Contrariamente, valores negativos 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 enriquecimento relativo para ^{15}N próximo a 0‰, isto porque a fonte de nitrogênio utilizada pelas indústrias para a fabricação de adubo é o nitrogênio atmosférico.

5. Isótopos Estáveis na experimentação animal

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 C₃ (arroz, trigo, cevada, alfafa, outros), com valor médio do enriquecimento isotópico relativo do ¹³C de $\delta^{13}\text{C} = -28\%$, e as plantas e seus subprodutos do ciclo fotossintético C₄ (cana-de-açúcar, milho, gramíneas tropicais, etc.), com valor médio de $\delta^{13}\text{C} = -12\%$. Assim ocorrendo, percebe-se a existência da diferença isotópica entre elas [$\Delta (C_4, C_3) = \delta C_4 - \delta C_3$] da ordem de 16%. 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 de 0,2%, permitindo com segurança a rastreabilidade destes ingredientes, a qual é extensiva aos isótopos estáveis dos bioelementos.

Na técnica de rastreabilidade do produto de origem animal na alimentação dos animais, utiliza-se o sistema de equações com dois isótopos estáveis na formação do produto, expresso por:

$$\begin{aligned} (a)\delta a + (b)\delta b &= \delta^{13}\text{C} \\ (a)\delta' a + (b)\delta' b &= \delta^{15}\text{N}, \end{aligned}$$

ou três isótopos se assim for necessário. O símbolo linha (') expressa a indicação do enriquecimento isotópico relativo do ¹⁵N nas duas fontes de alimentações. Sabendo que $a+b=1$, isolando (b) entre elas e igualando-as entre si, obtém-se o índice participativo (a) da fonte vegetal no produto final.

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).

Bahar et al. (2005), com o intuito de testar a técnica dos isótopos no sistema de rastreabilidade para autenticação de produtos de origem animal, estudaram as alterações na composição dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no músculo de bovinos. Concluíram que a composição desses isótopos no músculo estudado alterou consideravelmente, devido à substituição da silagem de capim (C₃) pela silagem de milho (C₄) na dieta de bovinos de corte. No entanto, o tecido muscular estudado 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 na urina de vacas sob diferentes regimes alimentares, e encontraram valores estáveis do $\delta^{13}\text{C}$ do leite e da urina 10 dias após o início da mudança de dieta mista de C_4/C_3 para C_3 . Após mudança da alimentação de C_3 para C_4/C_3 , os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram alcançados em 6 dias. Estes estudos comprovam que a escolha do tecido ou órgão animal no estudo de rastreabilidade para autenticação de produtos influencia as conclusões sobre a dieta, pois tecidos com rápido metabolismo indicam dietas recentes, enquanto aqueles com taxa de substituição lenta indicam alimentos ingeridos anteriormente.

5.1 Avanços metodológicos na pesquisa de Isótopos Estáveis em ruminantes no Brasil

Da Silva (2003) verificou a eficácia da análise dos isótopos estáveis de carbono na determinação da fase de transição do consumo da dieta basicamente líquida (leite) para dieta líquida sólida (leite, ração). Foram coletadas diariamente amostras de fezes de cordeiros recebendo leite (mamando) proveniente de ovelhas alimentadas com dieta C_4 e tiveram acesso ao *creep-feeding* com ração C_3 desde o nascimento. O modelo de regressão sigmoideal de Boltzmann foi o que melhor explicou o comportamento da dinâmica de consumo do grupo durante 60 dias de vida.

Segundo Martins (2010) estudou o *turnover* do carbono nas fezes e sangue de ovinos alimentados com plantas C_3 (feno de alfafa) e C_4 (silagem de milho) e verificou que o sangue possui *turnover* mais lento, ou seja, uma troca mais lenta de carbono da nova dieta, e as fezes *turnover* mais rápido. Estas diferenças analisadas entre as fezes e o sangue demonstraram claramente que o tipo de tecido em estudo influencia o *turnover*. Por esses motivos, as fezes mostraram ser o melhor indicativo para determinação da preferência alimentar dos ovinos, sendo consideradas indicadoras de consumo.

Estudos com bovinos jovens da raça Aberdeen Angus x Nelore (F1) alimentados com plantas C_3 podem ser diferenciados de bovinos alimentados com plantas C_4 . Constatou Ribeiro (2013) nas diferenças analisadas entre as fezes, sangue e plasma demonstram claramente que o tipo de tecido em estudo influencia o *turnover*, ou seja, a troca mais rápida ou mais lenta do carbono. A escolha do tecido deve levar em

consideração o período que se quer avaliar, para diagnóstico de dietas mais recentes o plasma é o tecido mais indicado. Entretanto, se o objetivo for avaliar dietas incorporadas em períodos mais longos, o sangue poderá ser utilizado.

Rastreabilidade de origem geográfica foi estudada por, 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.

Factori (2014) verificou a possibilidade de rastrear o valor isotópico de carbono e nitrogênio nas fezes, sangue e plasma de bovinos Nelore criados em pasto com diferentes níveis de adubação nitrogenada e um possível estabelecimento de um padrão e conseqüentemente eliminar a hipótese de ocorrência de falso positivo em relação ao uso de farinhas de origem animal na alimentação animal. Os resultados foram positivos para a diferenciação de sistemas de bovinos.

Em bovinos leiteiros, Carvalho (2015) constatou que a alteração dos valores isotópicos no sangue, plasma, soro sanguíneo e fezes, ocasionados pela inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras foram mais indicadas no processo de rastreabilidade. Os resultados indicam que a técnica dos isótopos estáveis pode ser utilizada na detecção do uso da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, principalmente pela análise das fezes, podendo ser complementada pela análise isotópica do plasma, auxiliando assim na rastreabilidade desse resíduo.

Perdigão (2017) estudou a razão isotópica dos elementos carbono e nitrogênio com e sem extração de gordura e permitiu diferenciar e certificar as amostras de carne entre os sistemas de confinamento, semi confinamento e pasto com alta precisão na mesma propriedade.

Atualmente, alguns trabalhos estão em fase de execução no Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” da UNESP/Botucatu, onde é pesquisada a possível utilização da análise de isótopos estáveis de carbono, nitrogênio, oxigênio e deutério como método traçador da dieta de bovinos jovens, no sangue, plasma, fezes, fígado, tecido muscular e adiposo, pela avaliação da taxa de fracionamento e *turnover* isotópico dos elementos. Além disso, desenvolve-se estudo do potencial da análise de isótopos estáveis de multi-elementos (C, N, O, H) para rastrear a carne de bovinos criados em diferentes sistemas de produção (confinamento tradicional, super precoce e sistema de produção em pastagens) como ferramenta de autenticação e certificação de origem.

6. Justificativa e objetivo

Dentro desse contexto, visto que a produção de bovinos de corte é de grande importância para a economia brasileira, e devido aos riscos sanitários e econômicos citados, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações nos valores dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no sangue, plasma sanguíneo e fezes, ocasionadas pela inclusão da cama de aviário na dieta de bovinos Nelore e determinar a amostra mais indicada na rastreabilidade desse resíduo.

Os resultados obtidos neste estudo servirão de base para auxiliar em futuras fiscalizações e em experimentos de rastreabilidade em bovinos de corte pela análise das amostras e elementos estudados, além de fortalecer o uso dos isótopos estáveis como ferramenta nas pesquisas de autenticação da qualidade e origem da carne.

Referências Bibliográficas

ALVES-STANLEY, C. D.; WORTHY, G. A. J. Carbon and nitrogen stable isotope turnover rates and diet-tissue discrimination in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **The Journal Experimental Biology**, Cambridge, v. 212, p. 2349-2355, 2009.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produtos Vegetais. **Complementação de padrões de identidade e qualidade para suco, refresco e refrigerante de uva**. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 08, de 26 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27/04/2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao/sislegis>>. Acesso em: 25 out. 2017

CARVALHO, M. A. G. **Rastreabilidade da cama de aviário por isótopos estáveis em bovinos leiteiros**. 2015. 57 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

CHOI, W.J. et al. Natural ^{15}N abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, Holanda, v. 245, p. 223-232, 2002.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for massspectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Londres, v. 12, n. 1/2, p. 133-149, 1957.

DA SILVA, J.J. **Determinação da fase lactente – ruminante em cordeiros pelas técnicas do $\delta^{13}\text{C}$ e micro-histologia fecal**. 2003. 43 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2012. 105 p. Apostila

DUCATTI, C. et al. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 68-75, 2011. Suplemento especial.

DUCATTI, C. **Environmental stable isotopes in animal science**. 2009

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007. 204 p. Apostila.

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

DUCATTI, C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do ^{13}C em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análises da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em matéria orgânica e das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 51, p. 275-286, 1979.

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

FACTORI, M. A. **Potencial dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio como método de rastreabilidade de bovinos Nelore a pasto**. 2014. Projeto de Pós Doutorado vinculado ao Projeto Temático Isótopos Estáveis Ambientais em Zootecnia da FAPESP processo 08/57411-4.

FRIEDMAN I.; O'NEIL J.R. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. In: FLEISCHER M. (Ed.). **Data of Geochemistry**. 6. Ed. United States Government Printing Office, 1977. p. 1-12.

FURQUIM, N. R. **Safe food**: analysis of the institutional environment for beef offer in Brazil. 2012. 157 f. Tese (Doutorado em Interunidades em Nutrição Humana Aplicada)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GONÇALVES, A. N. D. **Resistência ou suscetibilidade à scrapie em ovinos pertencentes ao grupo genético “ovelhas pantaneiras”**. 2012. Número de páginas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2012.

JORGE, D. M.; FERRAZ, J. G D. C. Análise de softwares de gestão da pecuária de corte. In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Economia Rural, 2010. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/772>>. Acesso em: 15 out. 2017

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 44, 2016 p.15 Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>. Acesso: 15 out. 2017.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, Ottawa, 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 and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 386, p. 104-108, 2006.

LIMA, V. M. B.; BORNSTEIN, C. T.; CUKIERMAN, H. L. O programa brasileiro de rastreabilidade da produção de bovinos—revisão e análise crítica. **Estudos Sociedade e Agricultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n.1, p. 49-87, 2013.

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

MONGELLI, G. et al. 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.

NÄÄS, I. A. A importância da rastreabilidade nas cadeias produtivas de suínos e aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFORMÁTICA APLICADA À AGROPECUÁRIA E À AGROINDÚSTRIA, 4., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: Lavras, 2003. p.578.

NESBAKEN, T. Food Safety in a global market - Do we need to worry? **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 86, p. 63-66, 2009.

NEVES, F. F. **Análise prospectiva das áreas de risco à erosão na microbacia hidrográfica do Rio Bonito (Descalvado-SP), potencialmente poluidoras por dejetos de granjas**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental)-Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. Regulamento (CE) nº 999/2001 de 22 de maio de 2001. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 31 maio 2001. L147/1-147/40. Disponível em:

<<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:147:0001:0040:PT:PDF>>. Acesso em 27 out. 2017

PERDIGÃO, A. **Rastreabilidade de sistemas produtivos de bovinos pela análise de isótopos estáveis**. 2017. 64 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

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

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

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

QUIJANO, M. L. et al. Organic geochemistry, stable isotopes, and facies analysis of the Early Aptian OAE — New records from Spain (Western Tethys). **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, Amsterdam, 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**, Bogotá, v. 48, n. 1, p. 125-141, 2012.

RIBEIRO, F.A. **Técnica dos isótopos estáveis para determinar o turnover de carbono nas fezes, no sangue e plasma de bovinos jovens confinados: implicações para autenticação isotópica da carne**. 2013. 33 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

SALGAN, L. et al. 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**, Buenos Aires, v. 37, n. 1, p. 113-135, 2012.

SARTO, F. M. **Análise dos Impactos Econômicos e Sociais da Implementação da Rastreabilidade na Pecuária Bovina Nacional**. 2002. 56 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônoma) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SHIBUYA, E. K. et al. Souring Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 160, p. 35-43, 2006.

SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 3-13, 2008.

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**, Berlin, v. 57, p. 32-37, 1983.

VERBEKE, W. et al. European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee: insights from a qualitative study in four EU countries. **Appetite**, Londres, v. 54, p. 289-296, 2010.

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 em Zootecnia) - 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.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Manure use for fertilizer and for energy**. Washington, 2009. Disponível em:

<http://www.ers.usda.gov/media/377381/ap037a_1_.pdf>. Acesso em: 27 out. 2017

YONEYAMA, T. Characterization of natural ^{15}N abundances of soils. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. I. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1996. p. 205-224.

WALKER, J.; POTTER, C.; MACK, S. The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflect through stable isotopes. **Marine Mammals Science** Hanover, v. 15, p. 335-350, 1999.

CAPÍTULO 2

O capítulo 2 intitulado **“Isótopos estáveis de carbono e nitrogênio para identificação de cama de aviário na alimentação de bovinos”** foi escrito de acordo com as normas do Periódico “Animal”

Isótopos estáveis de carbono e nitrogênio para identificação de cama de aviário na alimentação de bovinos

Resumo: Entende-se por origem de um produto a sua procedência, a forma como foi produzido, desde sua idealização até a concretização e venda, abrangendo aspectos que vão além da transformação do leite em derivados e/ou criação em carne. A possibilidade de uma análise rastrear o sistema de produtos agroindustriais ainda está aquém das demandas, embora as exigências de qualidade e a segurança dos produtos agrícolas exigem rastreabilidade. O projeto teve por finalidade avaliar o valor isotópico em bovinos confinados, a fim de eliminar a possibilidade de um falso positivo caso o valor isotópico seja semelhante ao valor dos animais que receberam fontes de origem proteica, a qual é proibida em nosso país. O experimento foi realizado na UNESP - Campus de Botucatu, nas instalações do confinamento experimental de novilhos superprecoces do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, na Fazenda Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por um período de 120 dias, colhidas as amostras de fezes, sangue e plasma. Os 8 animais foram alojados em baia coletiva e receberam os tratamentos: silagem de milho + concentrado; silagem de milho + cama aviária; consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado e consórcio de silagem de milho e feijão guandu e cama aviária. Após o final de experimento os animais passaram por um período de quarenta em pasto. As análises dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio detectaram mudanças nos valores isotópicos dos tecidos analisados (fezes, sangue total e plasma) em tratamentos diferentes, de acordo com a taxa de incorporação do isótopo proveniente da dieta. O sangue total e plasma refletiram mais o valor isotópico do tratamento quando comparados as fezes.

Palavras-chave: cama de frango, rastreabilidade, inocuidade do alimento, Nelore

Stable carbon and nitrogen isotopes for identification of avian litter in cattle feed

Abstract: The origin of a product is its origin, the way it was produced, from its idealization to completion and sale, covering aspects that go beyond the transformation of milk into derivatives and / or breeding in meat. The possibility of a scrutiny of the agro-industrial product system is still short of the demands, although quality requirements and the safety of agricultural products require traceability. The objective of the project was to evaluate the isotopic value in confined cattle in order to eliminate the possibility of a false positive if the isotopic value is similar to the value of the animals that received sources of protein origin, which is prohibited in our country. The experiment was carried out at UNESP - Campus de Botucatu, at the experimental confinement of superlives of the Department of Improvement and Animal Nutrition, at Fazenda Lageado, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, for a period of 120 days, blood and plasma. The 8 animals were housed in a collective bay and received the treatments: corn silage + concentrate; corn silage + avian bed; consortium of corn silage and pigeon pea + concentrate and consortium of corn silage and pigeon pea and avian litter. After the end of the experiment the animals went through a period of forty in pasture. Stable carbon and nitrogen isotope analyzes detected changes in the isotopic values of the analyzed tissues (faeces, whole blood and plasma) in different treatments according to the rate of isotope incorporation from the diet. Whole blood and plasma further reflected the isotopic value of the treatment when compared to faeces.

Key words: chicken litter, traceability, food safety, Nellore

1. INTRODUÇÃO

As exigências do mercado mundial, principalmente da União Europeia, estão voltadas a aspectos de controle sanitários e rastreabilidade animal, em que avanços ainda são poucos, porém não se pode ignorar que o desenvolvimento destes tem ocorrido em velocidade crescente (ANUALPEC, 2016).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo Sistema de Identificação e Certificação de Origem (SISBOV), registra e identifica o rebanho bovino e bubalino do 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. Entende-se por origem de um produto a sua procedência, a forma como foi produzido, desde sua idealização até a concretização e venda, abrangendo aspectos que vão além da transformação do leite em derivados e/ou criação em carne.

Factori (2014) avaliando o uso da cama de aviário na adubação de pastagens, concluiu que houve distinção entre os sistemas avaliados utilizando-se o carbono e nitrogênio como ferramenta de rastreabilidade de animais da raça Nelore em pasto. Ainda, o tempo de exposição do animal no pasto e o tempo de implantação ao sistema utilizado (cama de aviário e integração) pode influenciar no valor isotópico do capim, e este ser adquirido pelo animal.

Neste contexto, considerando a possibilidade de um sistema que permite fiscalizar como o animal foi produzido e seu local de criação é um avanço para o sistema de rastreabilidade nacional, suprimindo uma das exigências dos mercados consumidores em caracterizar o produto pela forma que foi conduzido antes do abate. Sendo a análise dos Isótopos Estáveis uma ferramenta com potencial de autenticidade dos alimentos, possibilita-se a investigação de fontes alimentares isotopicamente distintas (DeNiro e EPSTEIN, 1978). A este respeito, entre outros, são necessárias estratégias analíticas adequadas para evitar que os consumidores sejam enganados e proteger os produtores honestos (CARMIM et al. 2017).

Contudo, são poucos os trabalhos nacionais avaliando o emprego da análise dos Isótopos Estáveis com foco na nutrição e produção de ruminantes, tornando-se a pesquisa de extrema relevância, a fim de melhor compreender e proporcionar suporte de cunho científico ao sistema de rastreabilidade (SISBOV) já implantado no país. Caso ocorra a identificação de origem da carne, será possível certificar e autenticar o produto

em nosso país, uma vez que a demanda do mercado internacional exige padrões de excelência de qualidade.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações nos valores dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no sangue, plasma sanguíneo e fezes, ocasionadas pela inclusão da cama de aviário na dieta de bovinos Nelore e determinar a amostra mais indicada na rastreabilidade desse resíduo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Período pré experimental

O estudo foi aprovado conforme normas de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 109/2015-CEUA (anexo 1). O projeto foi autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Coordenadoria da Raiva dos Herbívoros e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, pela Informação CRHE nº 1094/2015 (Anexo 2) por meio do processo nº 21052.013311/2015-98, devido à proibição do uso da cama de aviário na dieta de ruminantes (Instrução Normativa 08/2004). A pesquisa foi acompanhada por fiscais federais do MAPA, desde sua implantação até a conclusão. Os animais alimentados com cama aviária foram identificados com brincos auriculares individuais e eutanasiados após o término do experimento respeitando o período da quarentena.

3. Instalações e Animais

O experimento foi realizado na UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu, nas instalações do Confinamento Experimental do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, na Fazenda Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia durante período de 19 de dezembro de 2016 a 17 de abril de 2017. Após esse período, os animais foram para as instalações da Fazenda Edgárdia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia durante a quarentena (29 de maio de 2017).

Foram utilizados 8 animais Nelore puros de origem não castrados nascidos entre março e abril de 2015 (em torno de 20 meses) com peso vivo médio 259 kg oriundos da Fazenda Experimental São Manuel provindos de uma pastagem exclusiva de *Urochloa brizantha* cv marandu. Os animais foram alojados em baia coletiva descoberta com 30m² de área, onde todos os animais receberam a mesma dieta durante o período de

cada tratamento. Essa dieta era fornecida por 1 mês contínuo, sem protocolo de adaptação.

4. Manejo, arraçãoamento e cuidado com os animais

Os animais foram vacinados, desverminados e submetidos a adaptação às instalações e ao manejo. As rações foram formuladas e balanceadas, adaptando-as para o experimento proposto. Os ingredientes eram pesados e misturados todos os dias e ofertados aos animais que foram alimentados duas vezes ao dia (as 8:00 e as 16:00 horas) e receberam água constante no bebedouro automático. As sobras eram retiradas no dia posterior e pesadas. Os ajustes, de quantidade de ração, realizado após a pesagem dos animais que era realizado uma vez a cada trinta dias. O trato total foi dividido em 40% no período matinal e 60% para o período noturno.

O cronograma de alimentação foi dividido em quatro períodos: Tratamento 1: Silagem de milho + Concentrado; Tratamento 2: Silagem de milho + Cama aviária; Tratamento 3: Consórcio de silagem de milho e feijão guandu + Concentrado e Tratamento 4: Consorcio de silagem de milho e feijão guandu + Cama aviária, sendo que os animais permaneciam em cada tratamento por 1 mês contínuo. As porcentagens de inclusão dos ingredientes, assim como seus valores isotópicos, utilizados nas dietas experimentais podem ser observadas na Tabela 2.

Durante o período experimental todos os animais passaram por todos os tratamentos, que eram fornecidos por um mês, não havendo protocolo de adaptação na troca, apenas em porcentagem de matéria original. (Tabela 2).

Tabela 2: Composição percentual, análise química e valor isotópico das dietas experimentais.

	Tratamentos			
	SM+CONC	SM+CF	SMG+CONC	SMG+CF
<i>Ingredientes %</i>				
Silagem de milho	20,21	20	21,21	20
Cama aviária	-	80	-	80
Milho	55,55	-	55,55	-
Farelo de Amendoim	24,24	-	24,24	-
<i>Composição Nutricional</i>				
Matéria Seca, %	69,00	72,00	69,00	73,00
NDT, %	81,00	58,00	82,00	59,00
PB, %	19,30	22,80	19,40	22,90
FDN, %	22,50	44,90	24,00	46,40
FDNpe	16,00	18,00	16,00	19,00
NEg, Mcal/kg MS	1,32	0,68	1,34	0,70
Carboidratos não fibrosos, %	53,00	18,00	51,00	16,00
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) ^a	-15,32	-16,25	-16,83	-19,23
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	3,80	9,25	7,68	10,08

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. NDT: nutrientes digestíveis totais. PB: proteína bruta. FDN: fibra em detergente neutro. FDNpe: Fibra em detergente neutra fisicamente efetiva. NE: energia metabolizável.

^a δ : enriquecimento das razões isotópicas dos elementos carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), da dieta, em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil.

5. Escolha da categoria animal e componentes avaliados

A escolha da categoria animal se deve ao fato do conhecimento da curva de crescimento de bovinos de corte ser de extrema importância, pois fornece informações para o estabelecimento de estratégias de manejo, contribuindo para a tomada de decisão sobre a adoção de determinada tecnologia. Com uma velocidade de taxa de troca acelerada, foram escolhidos animais em crescimento para que pudesse constatar essa renovação tecidual em menor tempo para melhor resposta no processo de rastreabilidade.

No processo de rastreabilidade buscam-se tecidos que possam refletir a dieta antiga com a finalidade de poder detectar a inclusão de cama aviária, mesmo que fornecidas apenas nas fases iniciais da vida do bovino. Para isto, necessita-se identificar um tecido de metabolismo mais lento que conserve o valor isotópico por mais tempo

(sangue e plasma), além disso, busca-se um material (fezes) que substitua rapidamente os seus átomos de carbono e nitrogênio, de forma que possa indicar a mudança da alimentação na fase de crescimento do bovino.

6. Colheita, preparação e pesagem das amostras

As coletas de fezes foram realizadas 1 vez na semana durante todo o período experimental. Já para sangue e plasma, as coletas foram realizadas em um intervalo de 15 dias.

As amostras de sangue foram coletadas pela veia jugular dos animais (30mL) e colocadas em tubos contendo EDTA. Em seguida, para retirada do plasma, o sangue passou pelo processo de centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. As amostras de sangue e plasma foram acondicionadas em micro tubos de 1,5mL e congeladas a - 18°C até posterior mensuração isotópica. Posteriormente, as amostras de sangue e plasma foram liofilizadas em aparelho Micromodulyo-115 (Edwardsvacuun®) onde foram secas a vácuo a -55°C e pressão de em torno 30 µHg por 48 horas. Para a realização das análises isotópicas, as amostras de sangue e plasma liofilizadas foram colocadas em cápsulas de estanho 25 (5mm x 3mm) e pesadas (70 a 90 µg para Carbono e 500 a 600 para Nitrogênio) em balança micro analítica de alta sensibilidade, com precisão de seis casas decimais. (XPE METTLER TOLEDO®)

As colheitas de fezes foram feitas diretamente na ampola retal, acondicionadas em coletores de fezes universal devidamente identificados e congeladas a -18°C até posterior mensuração isotópica. As amostras de fezes foram secas em estufa de ventilação forçada (Marconi - modelo MA 035) a 56°C por período de 48 horas. Posteriormente, foram moídas em moinho criogênico (Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010), a base de nitrogênio líquido (- 196°C). Neste moinho, aproximadamente 2,0 g de amostra foram colocadas em frascos de policarbonato juntamente com uma esfera magnética, o qual, devidamente fechado, foi imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e a esfera magnética, submetida ao campo magnético oscilante (15 impactos/s), pulverizou-se a amostra. A moagem compreendeu-se de primeira etapa de pré congelamento de dois minutos e segunda etapa de congelamento e pulverização de 3 minutos. Este procedimento permitiu obter partículas com granulometria menor que 60 µm (Licatti, 1997). Após moagem, foram pesadas entre 100 a 120 µg para Carbono e 4000 a 4500 µg para nitrogênio e acondicionadas em cápsulas de estanho para análise isotópica.

7. Análise isotópica

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 (CO₂ e N₂) 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 $\delta^{13}\text{C}$, Ar atmosférico para $\delta^{15}\text{N}$, calculado pela equação 1:

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

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

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

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

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

em que:

$\delta X(t)$ = enriquecimento isotópico de um elemento X do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta X(f)$ = enriquecimento isotópico de um elemento X do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta X(i)$ = enriquecimento isotópico de um elemento X do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*) em dia⁻¹

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

8. Análise estatística

Os dados de carbono e nitrogênio das variáveis: sangue, plasma e fezes foram submetidos a análise de variância procedimento PROC MIXED do pacote estatístico SAS 9.4 (diferenças encontradas para valores de $p < 0,01$) (Statistical Analysis System, 2011). O programa estatístico Minitab, versão 16.0 (MINITAB®, 2010) foi utilizado para normalidade dos dados de ^{13}C no plasma (Transformação de Johnson). No comportamento isotópico e meias vidas o programa estatístico foi pelo Software Origin Pro 8.6, 2011.

9. Resultados e Discussão

Na Tabela 3 estão apresentados os pesos médios do período experimental. O peso vivo final (antes da quarentena) foi de 378 kg e após a quarentena foi de 399,3 kg.

Tabela 3: Peso médio dos animais dos respectivos tratamentos durante o período experimental

Tratamentos	Peso
INICIAL	277,8D
SM+CONC	317,0C
SM+CF	300,0DC
SMG+CONC	346,0B
SMG+CF	377,6A
QUARENTENA	399,3A

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Médias apresentando uma mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si.

Os resultados serão apresentados pelos componentes analisados e suas variáveis, assim como suas interações estatísticas.

9.1 Nitrogênio nas Fezes

Os valores de ^{15}N e porcentagem de nitrogênio durante o período experimental nas fezes estão apresentados na tabela 4, onde pode-se notar diferença entre os tratamentos Silagem de milho (com concentrado e com cama aviária) e o consórcio de silagem de milho e feijão guandu (com concentrado e cama aviária). Essa diferença na porcentagem de nitrogênio se deve ao fato do consórcio ter como princípio elevar a

quantidade de proteína bruta do material, porém sua participação neste consórcio foi quase insignificante. Quando a variável foi o traçador metabólico ^{15}N , pode-se verificar que o tratamento consórcio de silagem de milho e feijão guandu teve maior concentração em relação aos demais tratamentos e o tratamento de consórcio de silagem de milho e feijão guandu obteve o menor valor para esta variável.

Tabela 4: Média estimada para % de Nitrogênio e $\delta^{15}\text{N}$ nas fezes para os tratamentos

Tratamentos	Variáveis				
	% Nitrogênio				$\delta^{15}\text{N}$
SM + CONC	2,40a				8,25B
SM + CF	2,42a				8,43B
SMG + CONC	2,17b				6,46C
SMG + CF	2,23b				9,26A
	Coleta				
Variável ($\delta^{15}\text{N}$)	0	1	2	3	4
SM+CONC	4,78C	8,22B	8,90B	9,04B	10,34A
SM+CF	4,84C	8,87B	8,86B	9,07B	10,51A
SMG+CONC	10,51A	5,70CB	4,47B	5,27C	6,36B
SMG+CF	6,36B	10,36A	10,07A	9,76A	9,72A
	Coleta				
Variável (%N)	0	1	2	3	4
SM+CONC	1,98b	2,51a	2,59a	2,58a	2,33ab
SM+CF	2,10c	2,60a	2,54ab	2,60a	2,28bc
SMG+CONC	2,28	2,05	2,22	1,96	2,32
SMG+CF	2,32	2,44	2,10	2,10	2,16

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Médias apresentando uma mesma letra minúscula na linha não diferem entre si. Médias apresentando uma mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. ($P > 0,001$). *0,1,2,3,4, Períodos de coleta em função do tempo de tratamento

Ainda na tabela 4, pode-se verificar que os momentos de coleta para as mesmas variáveis citadas anteriormente se comportaram de modo que o ^{15}N pode ser usado como resposta a dieta em um curto período, sendo o momento 0 e o momento 4 como parâmetros para indicar a inclusão de cama aviária em dietas bovinas. Para a variável porcentagem de nitrogênio, verificou-se que houve relação de igualdade entre os momentos de coleta, o que pode ser explicado pelo manejo nutricional durante o período experimental que foi citado na tabela 2.

O baixo valor que é apresentado na tabela 4 para o tratamento silagem de milho + cama aviária no momento 0, se deu ao fato do baixo consumo pelos animais, como

demonstrado na figura 2, e uma breve regulação de aceitabilidade do material cama aviária, pois era o primeiro contato dos animais com esta dieta.

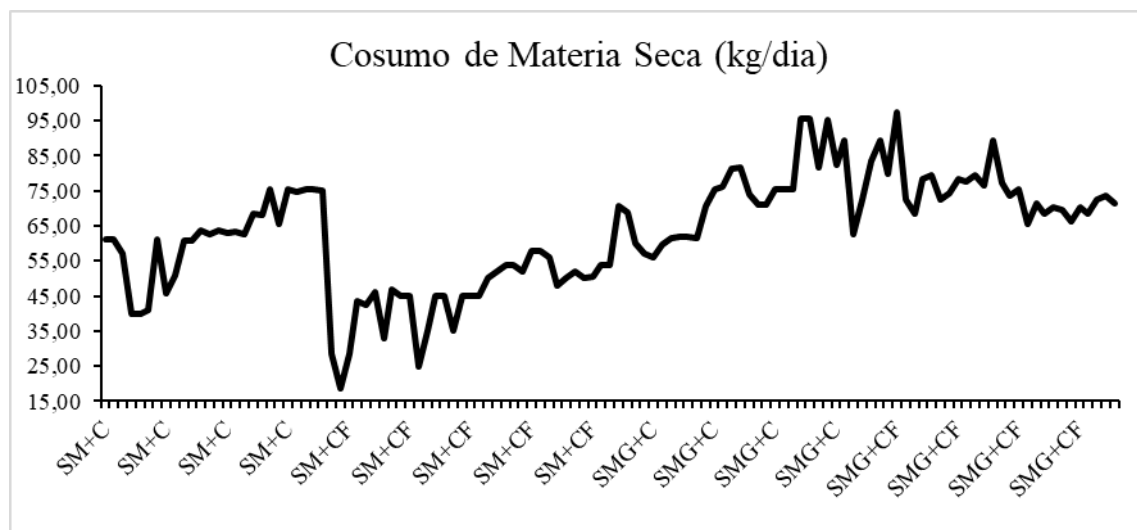


Figura 2: Consumo de matéria seca durante o período experimental

Porém como pode se observar na figura 3, esse baixo consumo também está relacionado aos dados climáticos que serão apresentados a seguir. Houve coincidência entre o início do tratamento silagem de milho e cama de frango com um índice elevado de precipitação para o mês de janeiro (início da dieta é datada de 16 de janeiro de 2017). Esses fatores corroboram com os resultados que foram obtidos dentro do experimento.

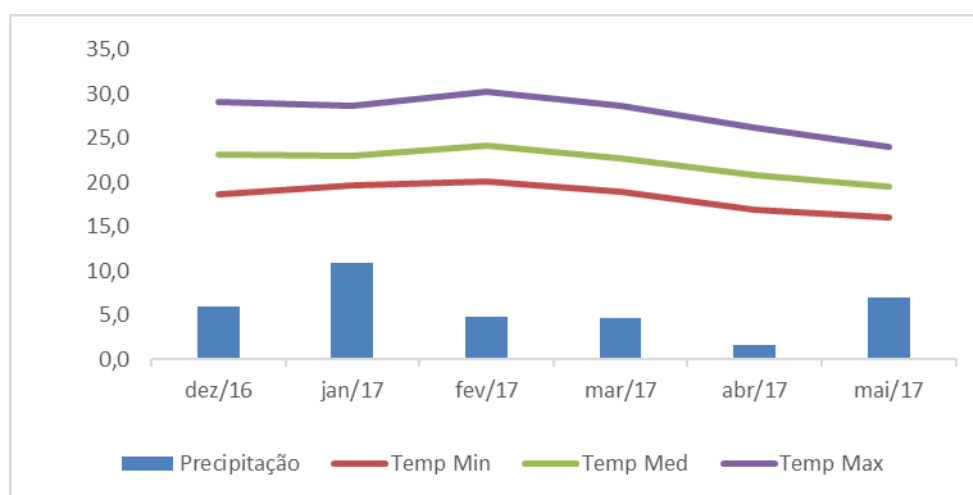


Figura 3: Dados climáticos (precipitação pluvial, temperaturas mínima, média e máxima) referentes ao período experimental, estação meteorológica FCA- Unesp, Campus Botucatu/SP (2016/17).

Para demonstrar as interações que houveram na variável ^{15}N nas fezes, a figura 4 mostra que houve uma queda, em valores médios, para o tratamento consórcio de silagem de milho e feijão guandu. Maiores valores foram encontrados no tratamento consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Com maior incorporação de ^{15}N no momento 4 para o tratamento 2.

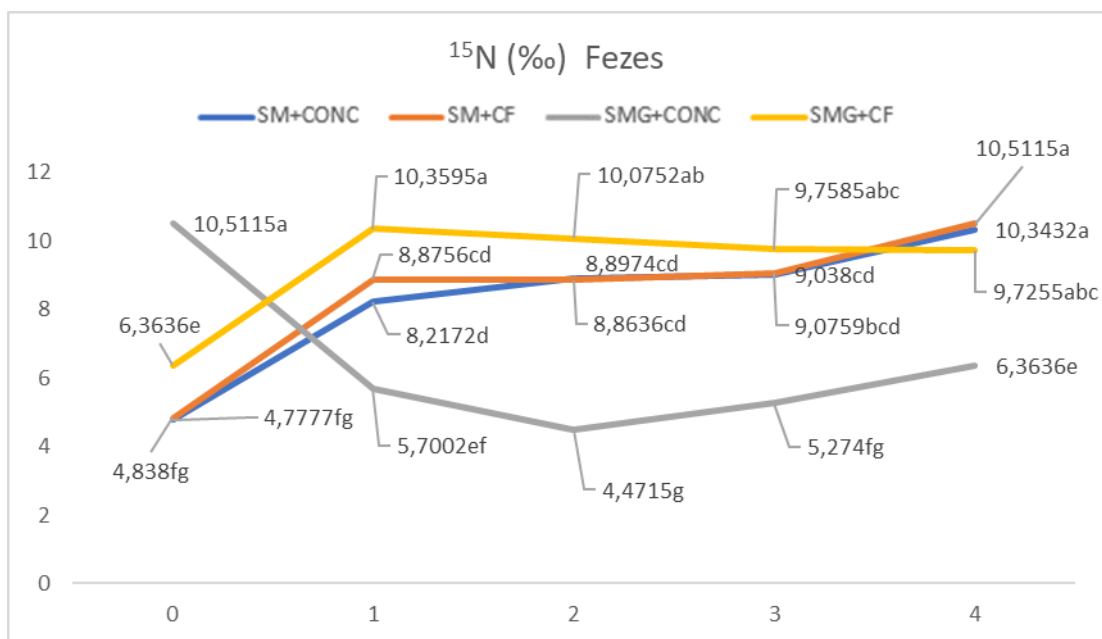


Figura 4: Comportamento dos valores médios $\delta^{15}\text{N}$ dos tratamentos nas fezes em função das coletas.

As médias das interações apresentadas na figura acima, demonstram que a última coleta do tratamento anterior é igualmente a média do início do próximo tratamento. Fato não encontrado para o tratamento silagem de milho e cama de frango, explicado anteriormente pela queda do consumo.

Para a variável %N, foi obtido estabilidade nos valores médios entre os tratamentos que estão apresentados na figura 5.

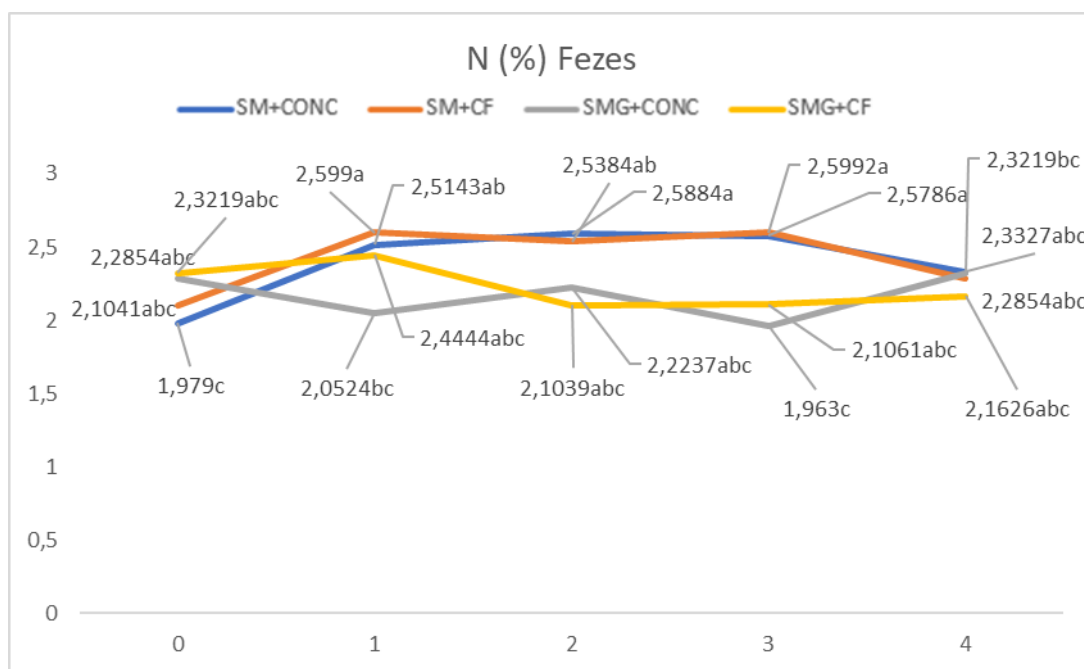


Figura 5: Comportamento dos valores médios de porcentagem de nitrogênio dos tratamentos nas fezes em função das coletas.

Valores do nitrogênio fixado na matéria vegetal têm influência dos compostos nitrogenados presentes no solo e da capacidade absorviva das plantas fixarem o nitrogênio do ar atmosférico segundo Choi et al. 2002; Handley e Raven, 1992; Werner e Schmidt, 2002; Zhang et al. 2012.

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).

Outra possível explicação para os valores semelhantes é o melhor aproveitamento de nitrogênio via salivação 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.

Além disso, estudos anteriores em ruminantes sugerem papel importante das bactérias do rúmen no enriquecimento natural de proteínas animais em relação à dieta ($\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-dieta}}$, Sutoh et al., 1987 e 1993, Wattiaux e Reed, 1995). Com tudo, até à data, a contribuição potencial da digestão ruminal para a bioacumulação natural de ^{15}N e, portanto, o fracionamento (isto é, $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-dieta}}$) foi discutido (Cabrita et al., 2014; Cantalapiedra-Hijar et al., 2015), mas não foi devidamente avaliado.

9.1.1 Carbono nas fezes

Ainda no componente fezes, mas a variável carbono, podemos verificar os valores médios para porcentagem de carbono e ^{13}C , conforme observado na tabela 5. Quando nos atentamos apenas para a variável de ^{13}C , há uma igualdade entre os tratamentos de silagem de milho (com concentrado e com cama aviária), porém o mesmo perfil não foi notado para ao tratamento do consórcio de silagem de milho e feijão guandu (com concentrado e com cama aviária), sendo maior quando adicionado concentrado. Esse fator pode ser explicado pelo concentrado que em sua composição contém amendoim.

Porém na coleta não houve diferença estatística para nenhuma das variáveis, sendo o momento 0 um diferencial de incorporação e a estabilidade no restante do período experimental.

Tabela 5: Média estimada para % de Carbono e $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes para os tratamentos

Tratamentos	Variáveis	
	% Carbono	$\delta^{13}\text{C}$
SM + CONC	38,68ab	-19,90C
SM + CF	38,45ab	-20,01C
SMG + CONC	39,19a	-18,11A
SMG + CF	37,69b	-19,07B

Variável ($\delta^{13}\text{C}$)	Coleta				
	0	1	2	3	4
SM+CONC	-17,50A	-20,02B	-20,65B	-20,55B	-20,82B
SM+CF	-17,68A	-20,33B	-20,80B	-20,89B	-20,38B
SMG+CONC	-20,38	-17,03	-19,20	-16,30	-17,64
SMG+CF	-17,64A	-19,36B	-18,99B	-20,22C	-19,13B

Variável (%C)	Coleta				
	0	1	2	3	4
SM+CONC	40,91	37,63	40,63	39,11	38,93
SM+CF	39,74	37,63	40,72	42,32	35,27
SMG+CONC	35,28c	39,32b	39,36b	39,94cb	44,06a
SMG+CF	44,06a	37,02b	34,42b	35,75b	37,20b

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Médias apresentando uma mesma letra minúscula na linha não diferem entre si. Médias apresentando uma mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. (P>0,001). *0,1,2,3,4, Períodos de coleta em função do tempo de tratamento.

As interações para o carbono (porcentagem e ^{13}C), podem ser verificadas na figura 6. Como ocorrido no nitrogênio, a inclusão de cama aviária, houve uma breve adaptação dos animais e essa aceitabilidade foi notada no momento 0, onde houve

menor valor encontrado para o traçador metabólico. Após essa adaptação dos animais é possível verificar que o momento 4 e o momento 0 de cada troca de adaptação são iguais estatisticamente.

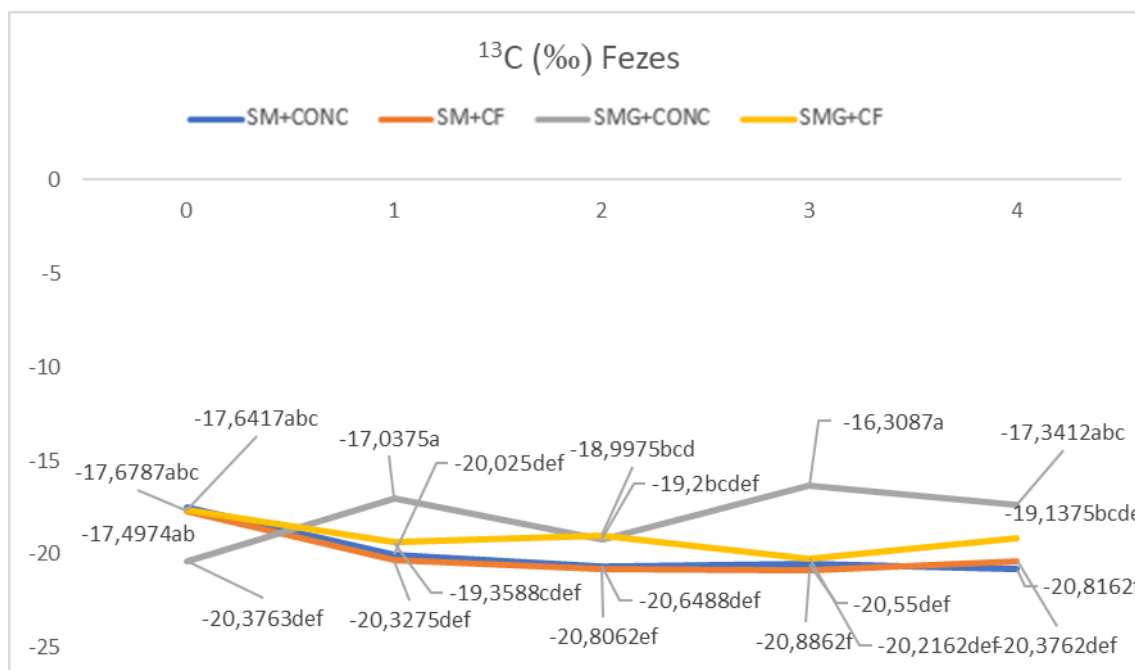


Figura 6: Comportamento dos valores médios de porcentagem de ^{13}C dos tratamentos nas fezes em função das coletas.

O fracionamento isotópico negativo nas fezes pode estar relacionado à contaminação destas por materiais endógenos do intestino (descamação da parede interna do trato gastrointestinal). Jones *et al.* (1979), trabalhando com bovinos de corte e ovinos, encontraram valores de $\delta^{13}\text{C}$ das fezes dos animais mais negativos em relação aos alimentos, correspondentes em 0,4 a 2,0 unidades. Tal fato foi explicado por possível descamação de células do intestino, com valores de $\delta^{13}\text{C}$ inferiores.

Os valores médios da interação estão na figura 7. De maneira geral a porcentagem de carbono nas fezes não teve muita alteração durante o período experimental.

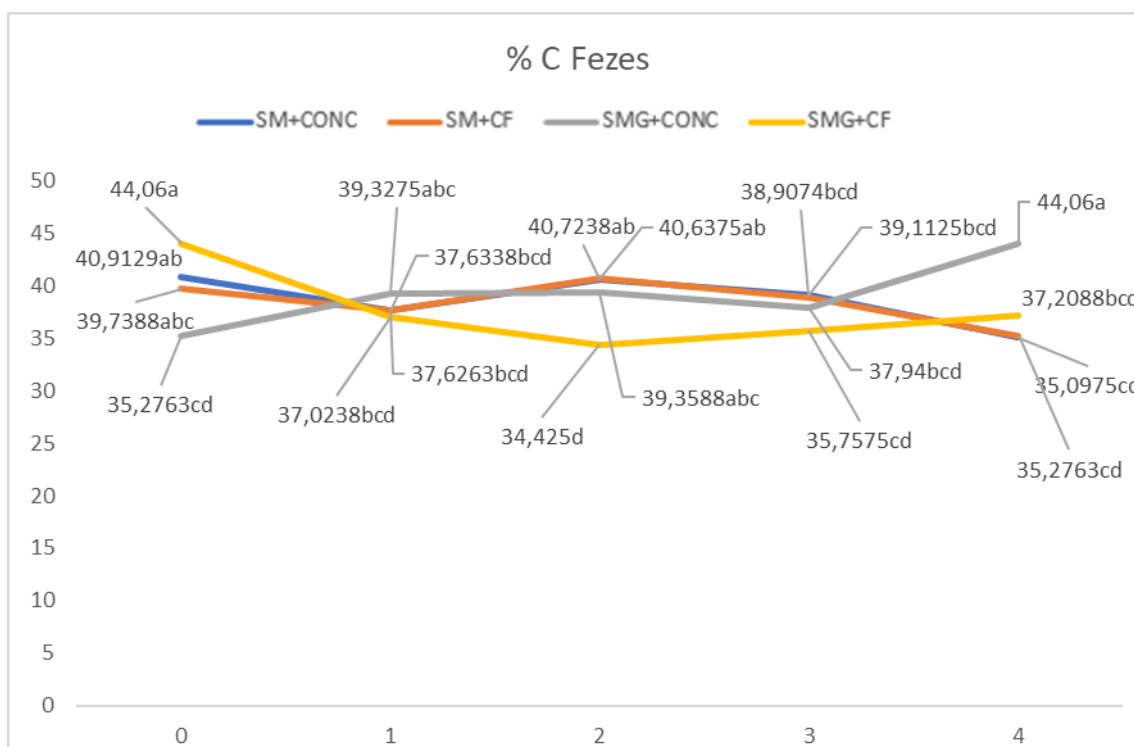


Figura 7: Comportamento dos valores médios de porcentagem de carbono dos tratamentos nas fezes em função das coletas.

Por isso, é de suma importância a caracterização do *turnover* do carbono de diferentes tecidos bovinos. A escolha do tecido ou órgão animal para o estudo de *turnover*, influencia nas conclusões sobre a dieta, pois tecidos com rápido metabolismo indicam dietas recentes, enquanto aqueles com taxa de substituição lenta indicam alimentos ingeridos anteriormente. A escolha do tipo de tecido para a análise isotópica depende, então, do objetivo da pesquisa (HOBSON e CLARK, 1992).

9.2 Nitrogênio no Sangue

O valor médio para a porcentagem de nitrogênio e $\delta^{15}\text{N}$ estão apresentados na tabela 6, onde pode-se observar que quando comparados separadamente os tratamentos silagem de milho e consórcio de silagem de milho e feijão guandu há distinção com a variável de porcentagem de nitrogênio, pois como discutido anteriormente o feijão guandu é uma planta leguminosa e sendo assim é fixadora de nitrogênio, elevando a porcentagem do mesmo quando adicionada no tratamento. Fato ocorre também quando adicionamos a cama aviária. Por isso essa igualdade entre os tratamentos silagem de milho e cama aviária e consórcio de silagem de milho e feijão guandu.

Para a variável ^{15}N , a sua maior concentração se encontra no último tratamento. Nota-se que houve diferença entre todos os tratamentos, podendo então sugerir que há a possibilidade de rastreamento pelo tecido sangue em bovinos Nelore.

Ainda na mesma variável, porém no efeito coleta, podemos observar que a porcentagem de nitrogênio se manteve a mesma e a mudança ocorreu para a variável ^{15}N . Sua maior incorporação foi na terceira coleta (última coleta antes de ocorrer as trocas das dietas)

Tabela 6: Média estimada para % de Nitrogênio e $\delta^{15}\text{N}$ no sangue para os tratamentos

Tratamentos	Variáveis		
	% Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	
SM + CONC	13,78a	3,51D	
SM + CF	13,52ab	4,30C	
SMG + CONC	12,98bc	5,40B	
SMG + CF	12,69c	6,14A	

Variável ($\delta^{15}\text{N}$)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	3,28C	3,51B	3,74A
SM+CF	3,74B	3,74B	5,41A
SMG+CONC	5,41AB	5,51A	5,29B
SMG+CF	5,29C	6,05B	7,10A

Variável (%N)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	13,34	14,38	13,62
SM+CF	13,63	13,62	13,32
SMG+CONC	13,30a	12,64c	13,00b
SMG+CF	12,64	12,82	12,62

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Médias apresentando uma mesma letra minúscula na linha não diferem entre si. Médias apresentando uma mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. (P>0,001). *0,15, 30 Períodos de coleta em função do tempo de tratamento.

Devido à complexidade das vias metabólicas que lhe deram origem, variações nos valores de $\Delta^{15}\text{N}$ não podem ser interpretados diretamente em termos dos rearranjos subjacentes dos fluxos de corpo N que eles possam indicar.

Isso permanece, no entanto, um conceito geral e os principais fatores responsáveis pelo $\Delta^{15}\text{N}$ e suas variações, bem como o funcionamento integrado do sistema $\Delta^{15}\text{N}$ do sangue, ainda são mal compreendidos. Isso ressalta questões importantes sobre quais processos metabólicos estão realmente fracionando, como as

diferenças $\Delta^{15}\text{N}$ entre os tecidos são estabelecidos e quais as relações existentes entre as variações nos fluxos metabólicos e os valores reais do $\Delta^{15}\text{N}$ (Martinez, 2005; 2009)

Na figura 8 são apresentados os valores médios do ^{15}N no sangue para o tratamento respectivo e suas interações.

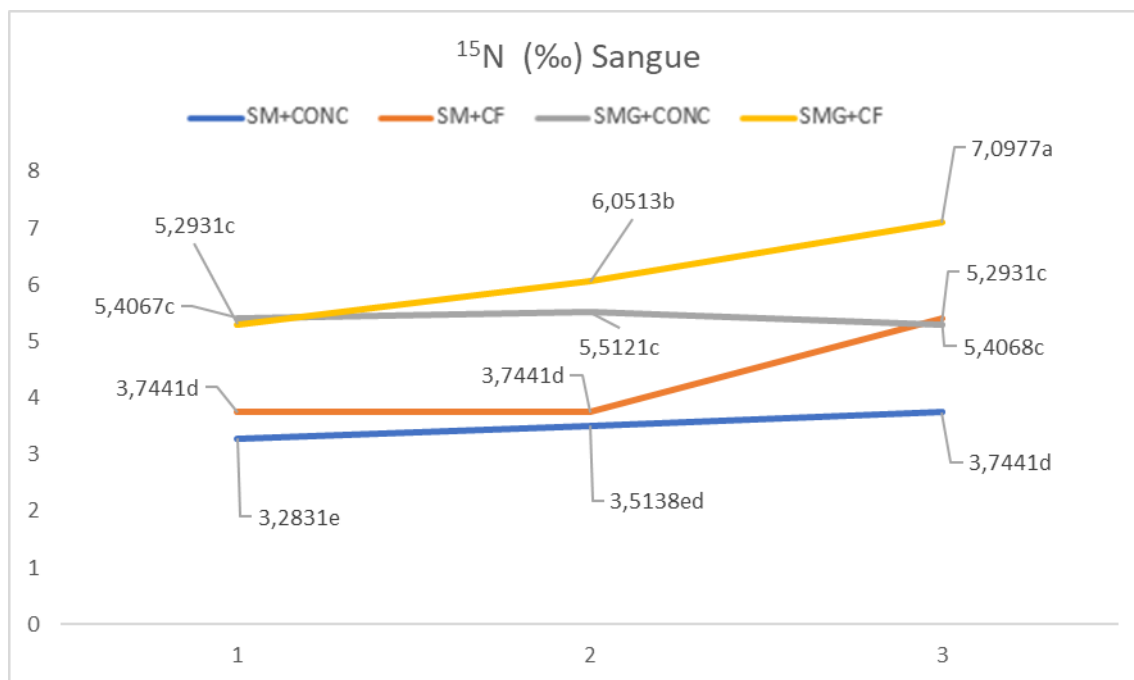


Figura 8: Comportamento dos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ dos tratamentos no sangue em função das coletas.

Como observado, os tratamentos que não continham o ingrediente cama aviária manteve em equilíbrio durante as coletas. Quando adicionado, os valores aumentaram entre as coletas 2 e 3, ou seja, após 15 dias de fornecimento do mesmo aos animais.

Para a porcentagem e nitrogênio, as interações se comportaram conforme observado na figura 9.

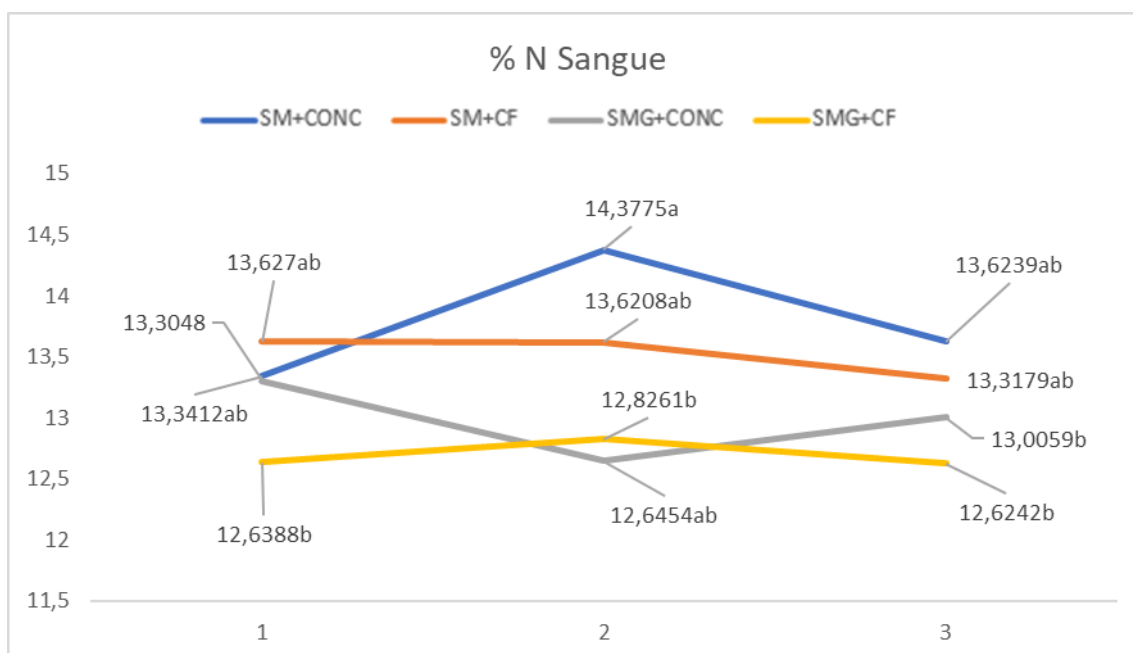


Figura 9: Comportamento dos valores médios de %N dos tratamentos no sangue em função das coletas

9.2.1 Carbono no sangue

Os valores médios para porcentagem de carbono e ^{13}C no sangue estão presentes na tabela 7 abaixo.

Para variável porcentagem de carbono houve uma igualdade entre os tratamentos que recebiam a silagem de milho (presença ou ausência de cama aviária) com o tratamento consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado.

Quando analisamos a coleta, a porcentagem de carbono se manteve entre os momentos e o carbono-13 teve aumento na última coleta.

Tabela 7: Média estimada para % de Carbono e $\delta^{13}\text{C}$ no sangue para os tratamentos

Tratamentos	Variáveis		
	% Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	
SM + CONC	46,07b	-14,24A	
SM + CF	45,01b	-15,17B	
SMG + CONC	46,39b	-15,58C	
SMG + CF	49,66a	-15,61C	

Variável ($\delta^{13}\text{C}$)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	-13,70A	-13,46A	-15,05B
SM+CF	-15,05A	15,05A	15,42B
SMG+CONC	-15,42A	15,50A	-15,81B
SMG+CF	-15,81B	-15,59AB	15,42A

Variável (%C)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	47,30	46,07	44,83
SM+CF	44,83	44,83	45,37
SMG+CONC	45,37	45,37	48,44
SMG+CF	48,44b	49,13b	51,40a

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Médias apresentando uma mesma letra minúscula na linha não diferem entre si. Médias apresentando uma mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. ($P>0,001$). *0,15,30 Períodos de coleta em função do tempo de tratamento.

As interações presentes no sangue estarão na figura 10. Esse comportamento mostra que houve uma estabilidade entre o final da coleta do tratamento no período e o início do novo tratamento.

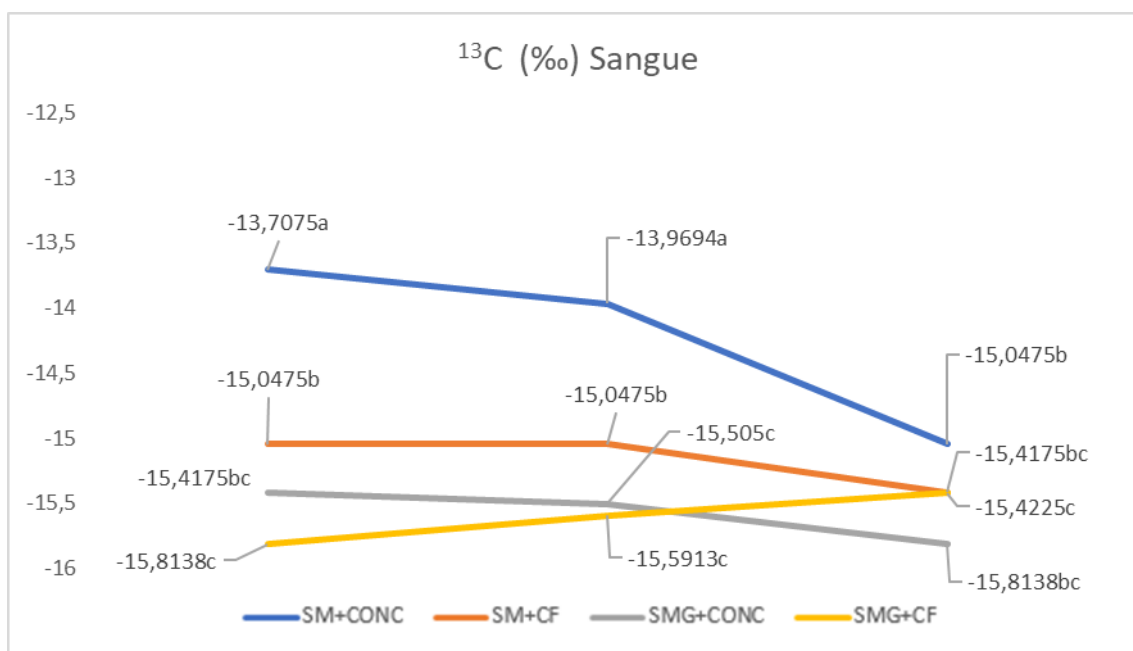


Figura 10: Comportamento dos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ dos tratamentos no sangue em função das coletas

Este é um tecido que consiste de células de diferentes tipos, constituído por glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, plaquetas e plasma. Dentre eles, os glóbulos vermelhos, também conhecidos por hemácias, são as unidades morfológicas da série vermelha do sangue relacionadas ao transporte de oxigênio pelo corpo. A vida útil das hemácias é de aproximadamente 120 dias (Dukes, 2006). A formação das células sanguíneas é dependente da manipulação da dieta. Inúmeros estudos demonstraram que diferenças na formação e função das células sanguíneas podem ser indicativos de manipulação da alimentação.

As interações para a porcentagem de carbono estão na figura 11. Podemos notar, no entanto, quando se considerou amostras de sangue total, a composição isotópica dependeu dos componentes alimentares que foram assimilados e não apenas ingeridos e, da diluição do pool de carbono existente no sangue pelo carbono dietético recém-assimilado. Portanto, quando comparados às fezes, sangue total demoraram mais tempo para refletirem a nova alimentação.

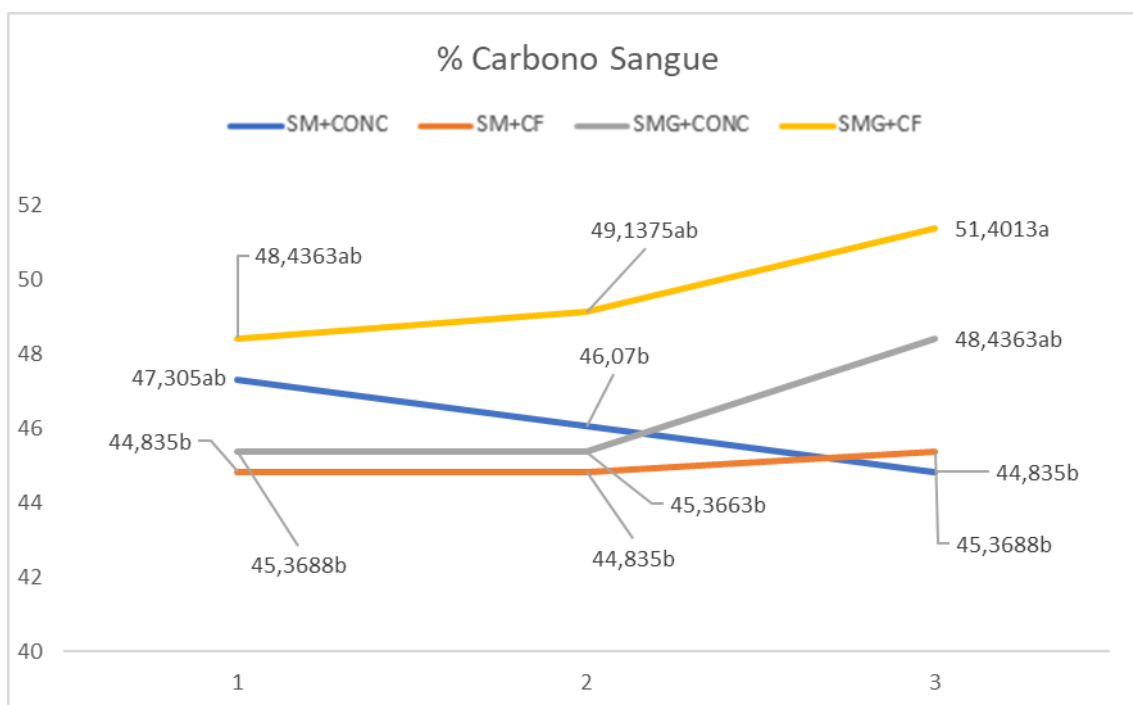


Figura 11: Comportamento dos valores médios de %C dos tratamentos no sangue em função das coletas

9.3 Nitrogênio no Plasma

Quando comparados os tratamentos com silagem de milho e o consórcio com feijão guandu (com ou sem cama aviária), houve diferença entre eles, sendo maior o tratamento silagem de milho. Como explicado anteriormente, a concentração de feijão guandu presente na silagem foi de tamanha relevância para que houvesse aumento significativo no percentual de nitrogênio. O tratamento de consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária, na variável ^{15}N , obteve maior representatividade. (Tabela 8).

Tabela 8: Média estimada para % de Nitrogênio e $\delta^{15}\text{N}$ no plasma para os tratamentos

Tratamentos	Variáveis		
	% Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	
SM + CONC	11,77a	4,13D	
SM + CF	11,58a	6,71C	
SMG + CONC	10,95b	7,51B	
SMG + CF	10,81b	8,48A	

Variável ($\delta^{15}\text{N}$)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	3,48C	4,13B	4,78A
SM+CF	4,78C	6,72B	8,64A
SMG+CONC	8,64A	7,30B	6,60C
SMG+CF	6,71C	8,80B	10,28A

Variável (%N)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	11,54	11,82	11,96
SM+CF	11,96a	11,74ab	11,05b
SMG+CONC	11,05a	10,58b	11,24a
SMG+CF	11,30a	10,85b	10,47c

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Médias apresentando uma mesma letra minúscula na linha não diferem entre si. Médias apresentando uma mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. ($P>0,001$). *0,15,30 Períodos de coleta em função do tempo de tratamento.

Ainda na tabela 8, a porcentagem de nitrogênio não variou no momento da coleta, ao contrário do ^{15}N que houve enriquecimento ao longo do período, dados similares aos outros tecidos analisados no presente estudo.

Ao notar as interações que obtivemos no plasma para o ^{15}N , presentes na figura 12, há uma crescente incorporação entre as últimas coletas. O mesmo não ocorre com o tratamento de consórcio de silagem de milho e feijão guandu, fato igualmente encontrado no tecido sanguíneo.

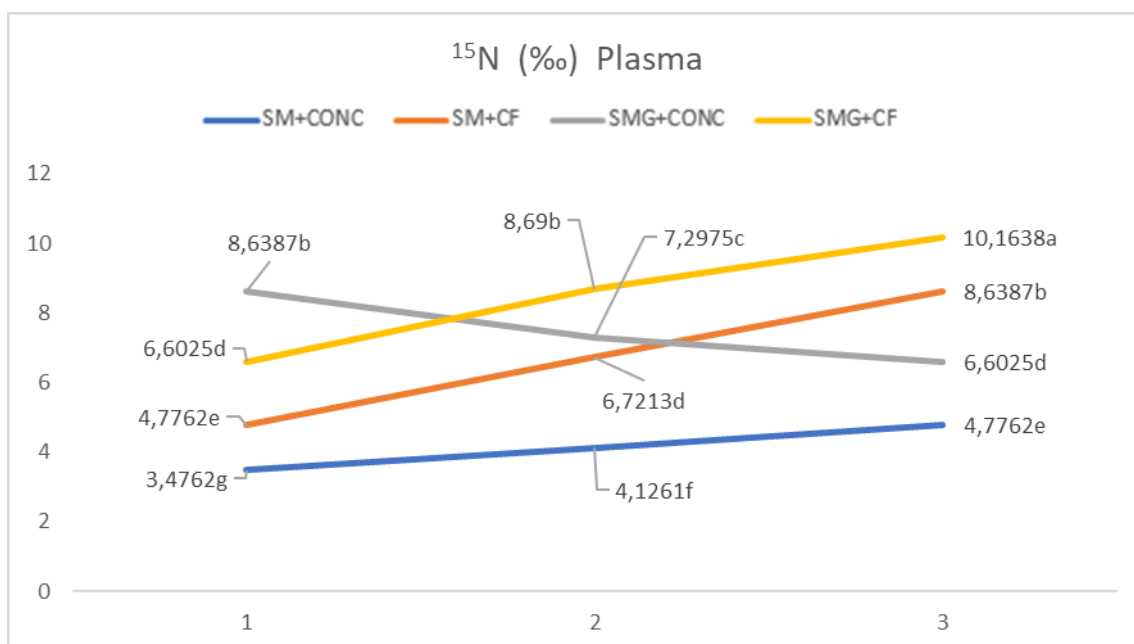


Figura 12: Comportamento dos valores médios de ^{15}N dos tratamentos no plasma em função das coletas

Em comparação, a porcentagem de nitrogênio no plasma teve um comportamento diferente. Essa queda na porcentagem de nitrogênio entre as coletas 2 e 3, pode ser explicada pelo fato que os constituintes do plasma têm relação direta com a composição química da dieta (Dukes, 2006). Desta forma, diferentes fontes alimentares apresentaram efeitos diferentes na composição do plasma.

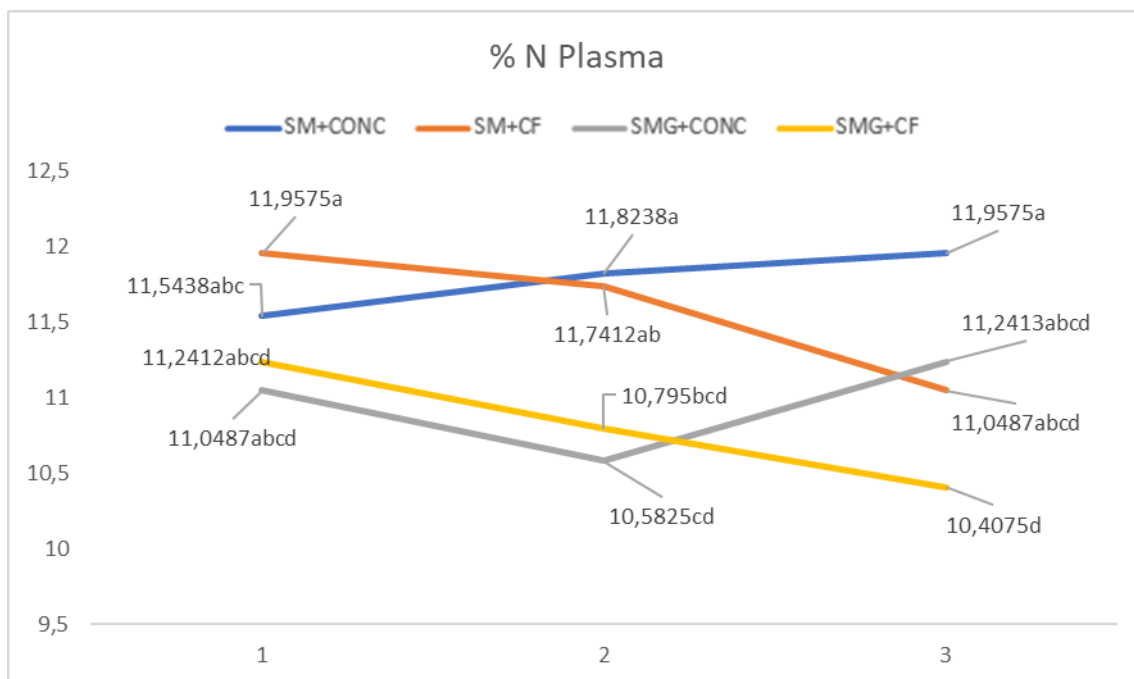


Figura 13: Comportamento dos valores médios de %N dos tratamentos no plasma em função das coletas

9.3.1 Carbono no plasma

A tabela 9 apresenta os valores médios para % de carbono e ^{13}C no plasma. Como visto anteriormente, o comportamento do carbono no plasma, foi similar entre os três últimos tratamentos. Não havendo diferença estatística entre os mesmos. Essa resposta, já seria esperada pois todos os tratamentos não tiveram grandes diferenças isotópicas quando comparada entre as mesmas. Apenas o carbono não seria bom indicador como traçador metabólico.

O momento, como variável mostrou o mesmo comportamento que os tecidos anteriores, que a última coleta é possível verificar uma maior incorporação no ^{13}C . Fator refletivo no tempo da taxa de troca.

Tabela 9: Média estimada para % de Carbono e $\delta^{13}\text{C}$ no plasma para os tratamentos

Tratamentos	Variáveis		
	% Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	
SM + CONC	43,12ab	-13,99A	
SM + CF	42,81ab	-15,17B	
SMG + CONC	41,22b	-15,36B	
SMG + CF	45,01a	-15,37B	

Variável ($\delta^{13}\text{C}$)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	-13,14A	-13,68B	-15,17C
SM+CF	-15,17	-15,07	-15,27
SMG+CONC	-15,27	-15,35	-15,47
SMG+CF	-15,53B	-15,29A	-15,51B

Variável (%C)	Coleta		
	0	15	30
SM+CONC	42,75	43,31	43,31
SM+CF	43,31	44,09	41,04
SMG+CONC	41,04b	38,70c	43,92a
SMG+CF	44,01b	45,23a	46,06a

SM+CONC: silagem de milho + concentrado; SM+CF: silagem de milho + cama aviária; SMG+CONC: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + concentrado; SMG+CF: consórcio de silagem de milho e feijão guandu + cama aviária. Médias apresentando uma mesma letra minúscula na linha não diferem entre si. Médias apresentando uma mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. ($P>0,001$). *0,15,30 Períodos de coleta em função do tempo de tratamento.

As interações para o ^{13}C , serão observadas na figura 14. Como esperado, houve uma igualdade das interações durante as coletas e os tratamentos. Fator já explicado anteriormente. Diferença encontrada apenas para os dois primeiros momentos do tratamento silagem de milho e concentrado, pois até ocorrer a mudança total da dieta, levou-se um tempo.

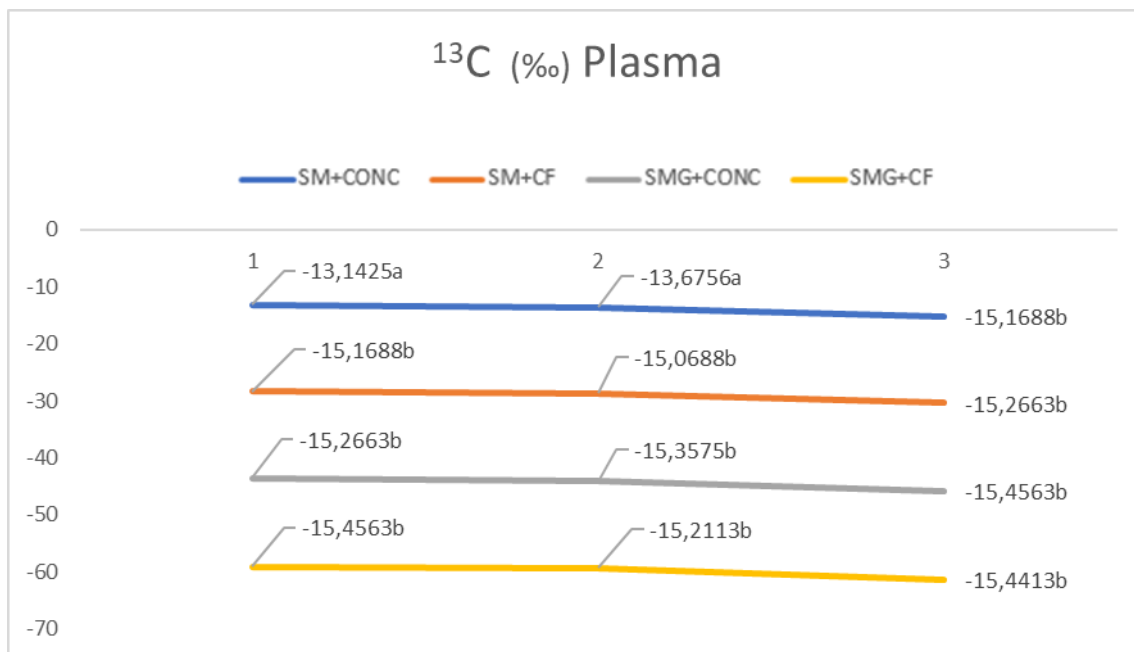


Figura 14: Comportamento dos valores médios do ^{13}C dos tratamentos no plasma em função das coletas

Interações que ocorreram no plasma para a variável de porcentagem de carbono, estão na figura 15.

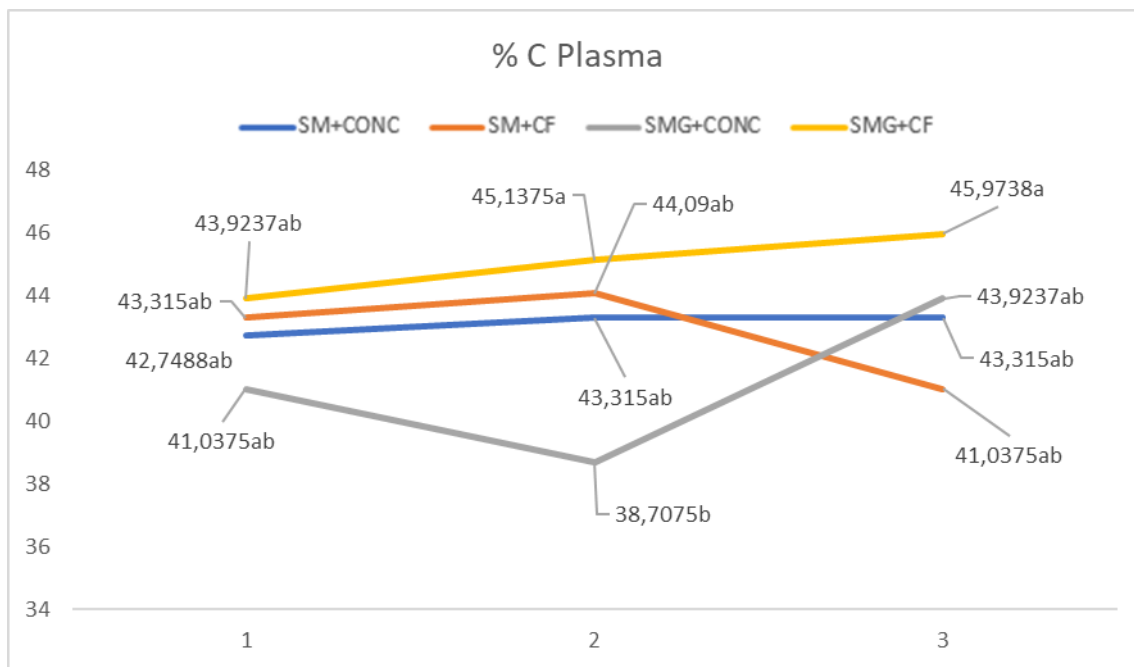


Figura 15: Comportamento dos valores médios de %C dos tratamentos no plasma em função das coletas

10. Comportamento isotópico do ^{13}C e ^{15}N nos componentes

Os comportamentos descritos mostram os valores médios em cada tecido. Os valores de meia-vida fornecem indicativos de quão rapidamente estes carbonos e nitrogênios foram incorporados nos tecidos ou trocados nas fezes. A expressão para a meia vida sugere que tecidos com meia vida curta (fígado, plasma por exemplo) 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, por exemplo.

Este estudo de *turnover* utilizou as variações naturais do $\delta^{13}\text{C}$ dos alimentos, com enfoque na velocidade de troca do carbono tecidual a partir da ingestão de alimentos com razões isotópicas bem próximas, pois o estudo tinha um enfoque no nitrogênio presente na cama aviária.

Figuras representativas com o comportamento das médias dos valores coletados. Como explanado nos itens anteriores, pode-se notar que nas fezes, o comportamento do carbono e do nitrogênio são reflexos da dieta.

Esse aumento de carbono, e o antagonismo para o nitrogênio no período do tratamento correspondente ao consórcio de silagem de milho e feijão guandu ocorreu devido ao aumento de porcentagem de nitrogênio e por ser prontamente metabolizada pelas bactérias ruminais enquanto a degradabilidade ruminal das proteínas pode ser amplamente variável. O fluxo do nitrogênio no rúmen é grandemente afetado pela composição da dieta e nível de consumo.

Um preditor alternativo da eficiência de alimentação (N) em ruminantes é baseado no fracionamento isotópico de N (Cheng et al., 2013; Cantalapiedra-Hijar et al., 2015). Foi demonstrado em uma variedade de condições que a abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$; relação $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ em relação à N_2 atmosférica) em proteínas animais é maior do que na dieta consumida (DeNiro e Epstein, 1981) e que as variações neste N isotópico fracionamento ($\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-dieta}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{animal}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{dieta}}$) estão estreitamente e negativamente correlacionados com a eficiência da utilização do nitrogênio em diferentes espécies (Gaye-Siessegger et al., 2004; Cheng et al., 2013; Cantalapiedra-Hijar et al., 2015). Portanto, $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-dieta}}$ pode ser usado para classificar os indivíduos que recebem a mesma dieta por sua eficiência em utilizar nitrogênio.

10.1 Comportamento isotópico nas fezes

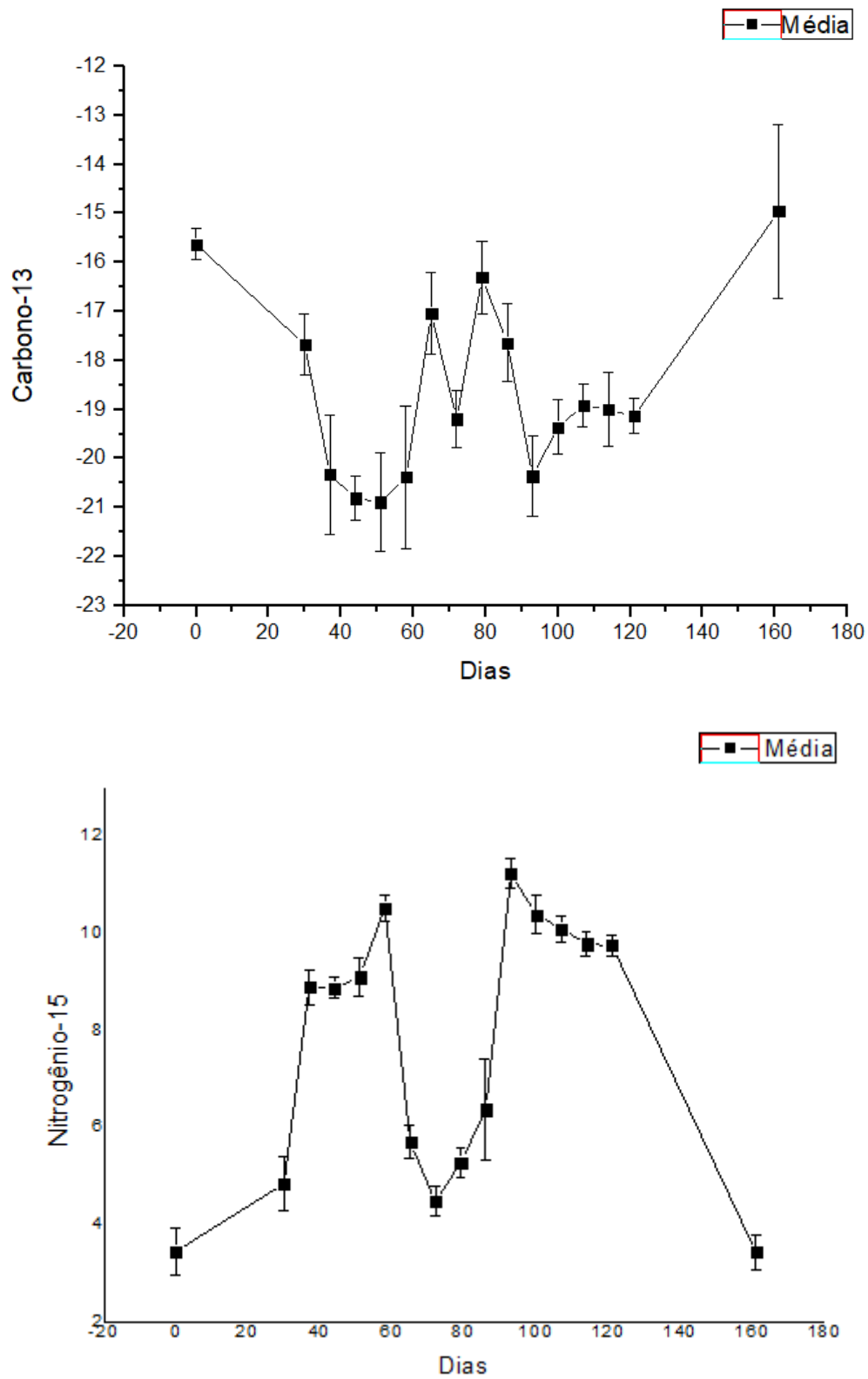


Figura 16: Comportamento dos valores médios de ^{13}C e ^{15}N dos tratamentos nas fezes em função dos períodos apresentados.

10.2 Comportamento isotópico no sangue

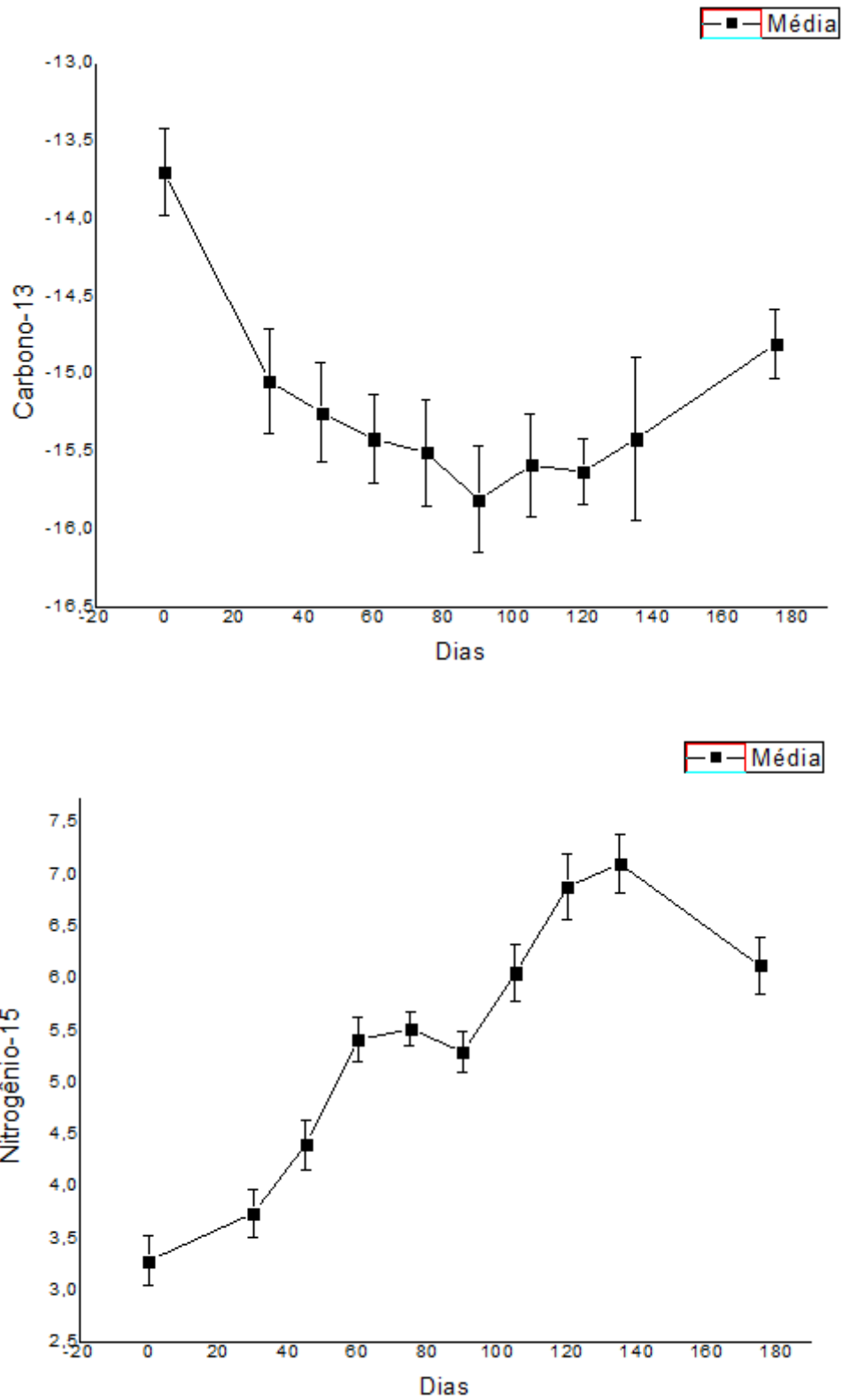


Figura 17: Comportamento dos valores médios de ^{13}C e ^{15}N dos tratamentos no sangue em função dos períodos apresentados

10.3 Comportamento isotópico no plasma

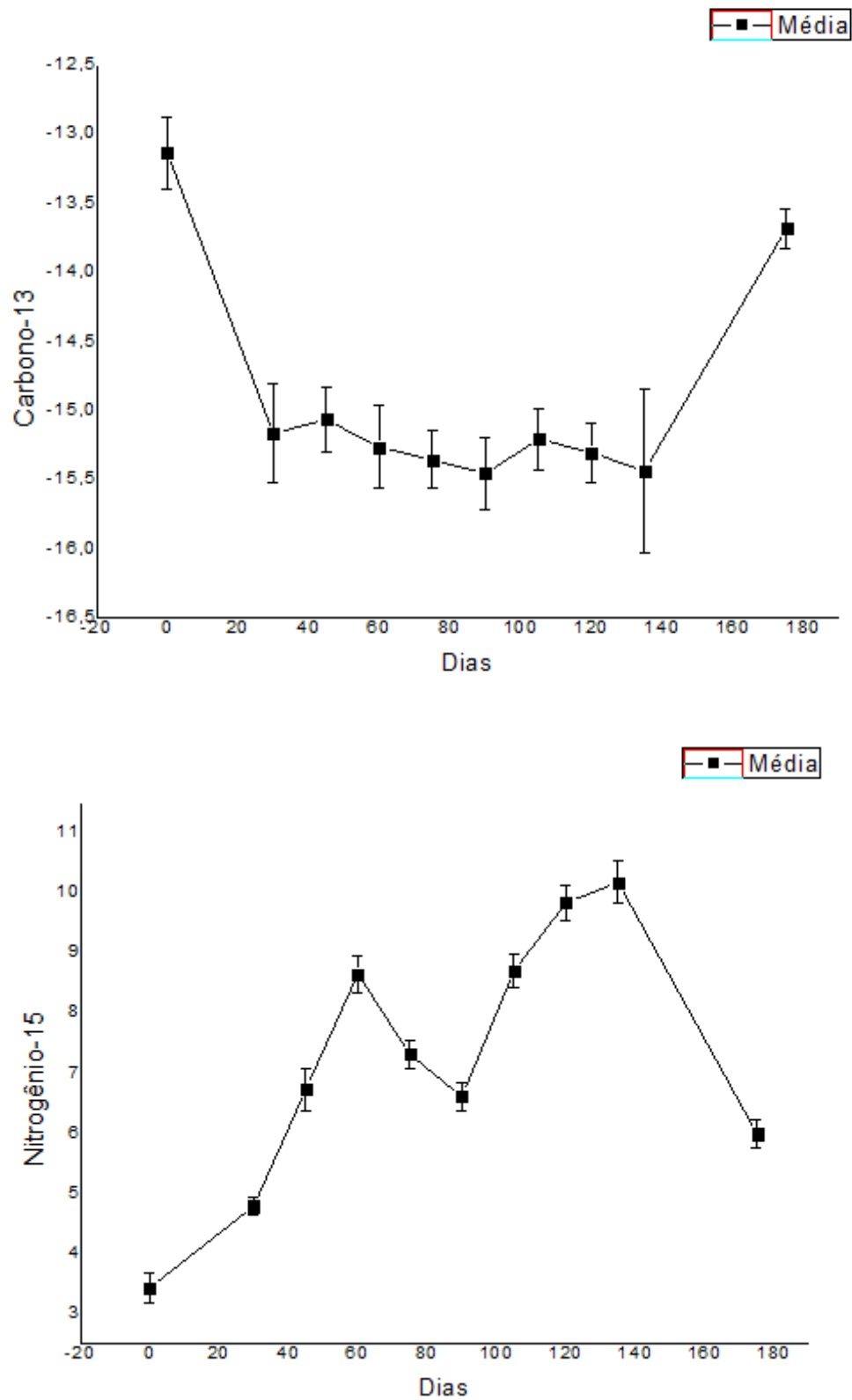


Figura 18: Comportamento dos valores médios de ^{13}C e ^{15}N dos tratamentos no plasma em função dos períodos apresentados.

Conclusões

As análises dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio detectaram mudanças nos valores isotópicos dos componentes analisados (fezes, sangue total e plasma) em tratamentos diferentes, de acordo com a taxa de incorporação do isótopo proveniente da dieta.

O sangue total e plasma refletiram mais o valor isotópico do tratamento quando comparados as fezes, podendo ser utilizados como ferramenta confiável em processos de rastreabilidade em sistemas de produção de bovinos de corte com a inclusão de cama aviária ou uma dieta com consórcio com leguminosa.

Referências Bibliográficas

ANUALPEC. **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2016.

CABRITA ARJ, Fonseca AJM and Dewhurst RJ 2014. Short communication: relationship between the efficiency of utilization of feed nitrogen and ^{15}N enrichment in casein from lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** 97, 7225–7229.

Camin F, Boner M, Bontempo L, Fahl-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.

Cheng L, Sheahan AJ, Gibbs SJ, Rius AG, Kay JK, Meier S, Edwards R and Roche JR 2013. Technical note: nitrogen isotopic fractionation can be used to predict nitrogen-use efficiency in dairy cows fed temperate pasture. **Journal of Animal Science** 91, 5785–5788.

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

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.

DUKES. *Fisiologia dos animais domésticos / editorial de William O. Reece; (revisão técnica Newton da Cruz Rocha; tradução Cid Figueiredo, Idilia Ribeiro Vanzellotti, Ronaldo Frias Zanon)*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FACTORI, M.A., **Potencial dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio como método de rastreabilidade de bovinos Nelore a pasto**, 2014 Projeto de Pós Doutorado

vinculado ao Projeto Temático Isótopos Estáveis Ambientais em Zootecnia da FAPESP processo 08/57411-4.

Gaye-Siessegger J, Focken U, Muetzel S, Abel H and Becker K 2004. Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* 138, 175–183.

JONES R.; LUDLOW M.; TROUGHTON J. Estimation of the proportion of C_3 and C_4 plant species in diet of animals from the ratio of natural ^{12}C and ^{13}C isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v.18, p.91-100; v.92, p.91-100, 1979.

Martinez del Rio C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ . Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. **Biol Rev** 84: 91–111. 2009

Martinez del Rio C, Wolf BO. Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: Starck JM, Wang T, editors. Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates: **Science Publishers, Inc.** pp. 141–174. 2005

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.

Sutoh M, Koyama T and Yoneyama T 1987. Variations of natural ^{15}N abundances in the tissues and digesta of domestic animals. **Radioisotopes** 36, 74–77.

Sutoh M, Obara Y and Yoneyama T 1993. The effects of feeding regimen and dietary sucrose supplementation on natural abundance of ^{15}N in some components of ruminal fluid and plasma of sheep. **Journal of Animal Science** 71, 226–231.

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

Wattiaux MA and Reed JD 1995. Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria. **Journal of Animal Science** 73, 257–266.

Werner RA and Schmidt 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. **Jounal Zhejiang University Science B** 13, 824–830.

CAPÍTULO 3

Implicações

O uso de produtos proibidos na alimentação de ruminantes pode acarretar riscos sanitários aos animais e à população. Dentre esses produtos, cama aviária, geralmente contém proteínas de origem animal em sua composição, podendo dar origem ao 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 na carne, 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.

A análise dos isótopos estáveis está sendo utilizada em pesquisas de diversas áreas. No entanto, sua utilização como ferramenta aplicada em estudos com animais ruminantes é recente e, por este motivo, outros estudos são necessários para contribuir com o desenvolvimento desta técnica.

No presente estudo, houve a recusa, a princípio, da dieta com o ingrediente cama aviária, uma vez que esses animais nunca tiveram contato com o mesmo, por isso também podem ser realizados novos experimentos com diferentes níveis de inclusão da cama de aviário na dieta de ruminantes ou farinha de carne e ossos, que também é um ingrediente proibido no país, para verificar qual o limite de detecção pela análise dos isótopos estáveis.

ANEXO I

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Potencial dos isótopos estáveis de multi-elementos como método de rastreabilidade da cama de aviário na alimentação de bovinos**" Protocolo nº 109/2015 - CEUA, do Professor Carlos Ducatti, a ser conduzido por **Vânia Luzia Fournou de Lima**, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 04 de setembro de 2015.



Prof.ª Ass. Dr.ª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO II



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



INFORMAÇÃO CRHE Nº 2016

Assunto: **Pesquisa UNESP em parceria com Mapa.**

Data: **5 de abril de 2016**

Referência: **21052.013311/2015-98**

O processo sob referência trata de solicitação da UNESP/Botucatu ao Mapa, para pesquisa de isótopos estáveis para rastreabilidade de cama de aviário na alimentação de bovinos.

2. Somos favoráveis ao desenvolvimento da pesquisa em questão, mas sob condições específicas, pois é um tema ainda em estudo e somente após a conclusão da pesquisa é que será possível observar a pertinência de sua divulgação e aplicação. Assim, a autorização está condicionada à assinatura de um termo de confidencialidade pela UNESP/Botucatu quanto à divulgação de seu resultado, sendo que tal divulgação estará dependente a um parecer do DSA/SDA/Mapa.

3. Isto posto, sugerimos retorno ao SSA/SFA-SP, para elaboração do termo acima citado e demais providências, no sentido de dar seguimento à autorização solicitada pela instituição de ensino.

4. Adicionalmente, sugerimos à Unesp que em próximas pesquisas utilize a farinha de carne e ossos - FCO, e não apenas a cama de aviário, considerando que em várias regiões do país o risco de uso da FCO como alimento para bovinos é maior do que para cama de aviário.


 Elaine Fátima de Sena
 Coordenadora CRHE