

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

***TURNOVER DO  $\delta^{13}\text{C}$  EM SANGUE E OVO DE CODORNA  
JAPONESA NA FASE DE CRESCIMENTO E POSTURA***

GUILHERME EMYGDIO MENDES PIMENTA

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

BOTUCATU – SP

Junho - 2013

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

***TURNOVER DO  $\delta^{13}\text{C}$  EM SANGUE E OVO DE CODORNA  
JAPONESA NA FASE DE CRESCIMENTO E POSTURA***

GUILHERME EMYGDIO MENDES PIMENTA

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS DUCATTI

CO-ORIENTADOR: ANTONIO CELSO PEZZATO

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

BOTUCATU – SP

Junho - 2013

Pimenta, Guilherme Emygdio Mendes.

*Turnover do  $\delta^{13}\text{C}$  em sangue e ovo de codorna japonesa na fase de crescimento e postura /*  
Guilherme Emygdio Mendes Pimenta. - Botucatu, 2013

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

Orientador: Carlos Ducatti

Coorientador: Antonio Celso Pezzato

Capes : 50403028

1. Codorna japonesa - Alimentação e rações. 2. Nutrição animal. 3. Dietas.

Palavras-chave: Carbono-13; *Coturnix coturnix japonica*; Incorporação isotópica; Plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ ; Substituição de dietas.

## DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a proteção de **DEUS**, que sempre me guiou para o caminho da bondade e do respeito.

**AOS MEUS PAIS**, João e Maria, pela vida de luta e sacrifícios que tiveram para que eu chegasse até aqui, pelo amor incondicional e por nunca deixarem de acreditar e investirem em mim.

**AOS MEUS ANJOS DA GUARDA**, minhas irmãs Gisele e Gislene; pela amizade, cumplicidade e força perante cada obstáculo. A Gabriela, o pedacinho de gente, pelo amor e pureza que sempre derrete nossos corações.

**AS MINHAS QUERIDAS AVÓS**, que com suas orações sempre me abençoaram a distancia.

*"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos."*

*Elleanor Roosevelt*

*"As boas ações elevam o espírito e predisõem-no a praticar outras."*

*Jean Jacques Rousseau*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, *Campus* Experimental de Dracena, pela minha formação profissional e pessoal, me oferecendo todo apoio dentro de suas limitações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP-Botucatu, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, pela orientação, confiança e paciência durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato, por acreditar em meu potencial durante o primeiro contato, apoio e incentivo.

À Prof.<sup>a</sup> Juliana Célia Denadai, meu eterno agradecimento por acreditar, pela paciência e imensa ajuda para o desenvolvimento desta dissertação.

À Prof.<sup>a</sup> Maria Márcia Pereira Sartori pela grande ajuda nas análises estatística, amizade e apoio.

À FRANGOESTE<sup>®</sup>, em especial ao Samuel Marangoni, pela doação das farinhas de origem animal para a realização do experimento.

Aos funcionários e grandes amigos do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais IBB/UNESP, Evandro Tadeu Silva, Cibele de Souza Kruliski, Silvia Maschette e Mariana Sasso pelo acolhimento, auxílio na execução deste trabalho, amizade e ajuda concedida.

À equipe de alunos e amigos do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais IBB/UNESP, Adriele Nayara Dias Ishizuka, Barbara Cristina da Silva Fernandes,

Marcela Buosi Martins, Marco Antonio Gonzáles de Carvalho, Luciene Seraphim, Michelle Ravelli, Rhani Ducatti, Vanessa Cristina Pelícia, Vânia Fornou.

Aos Professores do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal e de Produção Animal da FMVZ/UNESP-Botucatu, pela orientação, auxílio na realização do experimento, ensinamentos e competência, em especial ao Prof. Jose Roberto Sartori, Prof. Edivaldo Antonio Garcia e Prof. Dirlei Antonio Berto.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Bromatológicas da FMVZ, pela colaboração na extração de lipídios de minhas amostras.

Aos funcionários da Supervisão de Fazendas e Fabrica de ração da FMVZ, que me auxiliaram na execução do experimento.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação (Seila Cristina Cassineli e Carlos Pazini) e do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal (Luis Carlos Fernandes, Silene Vitoratti Mamede, Magali de Arruda) da FMVZ/UNESP-Botucatu, pelos auxílios prestados.

A toda a equipe do Laboratório de Nutrição de Aves da FMVZ/UNESP-Botucatu: Ana Cristina Stradiotti, Carolina Carvalho de Miranda, Daniela Aparecida Berto, Everton Moreno Muro, Fabiana Luiggi, Fernanda Uhlmann, Guilherme Aguiar Matheus Pasquali, Ivan Mailinch Gonçalves Pereira de Souza, Jessica Conteçote Russo, Juliana Cristina Ramos Rezende, Mariana Kiyomi Maruno, Mônica Megumi Aoyagi, Nathália Martins Guerra Causso, Patrícia Versuti, Priscila Cavalca de Araujo, Renata Sena de Souza Gomes de Oliveira, Ricardo Fasanaro, Thaila Cristina Putarov, Vitor Barbosa Fascina, Wanderley Thiago da Silva.

Aos amigos Anderson Silva, Augusto Ungaro, Cássio Yuzo Uehara, Danilo Vanci Fernandez, Erikelly Aline Santana, Guilherme Mendes Machado Franco de Arruda, Gabriel Martinelli, Henrique Augusto Travaini Grecco, Murilo Massufaro Giffu.

## SUMÁRIO

	<i>Página</i>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
1. Introdução.....	2
2. Revisão de literatura.....	3
2.1. Coturnicultura.....	3
2.2. Isótopos estáveis .....	4
2.3. Plantas do ciclo fotossintético C <sub>3</sub> e C <sub>4</sub> .....	6
2.4. Isótopos estáveis em animais .....	7
2.5. <i>Turnover</i> .....	8
3. Justificativas e objetivos.....	9
4. Referências Bibliográficas.....	11
<b>CAPÍTULO II</b> .....	18
<i>TURNOVER ISOTÓPICO DO <math>\delta^{13}\text{C}</math> NO SANGUE E PLASMA DE CODORNAS</i> <i>JAPONESAS (COTURNIX COTURNIX JAPONICA) NAS FASES DE CRESCIMENTO</i> <i>E POSTURA</i> .....	18
Resumo.....	19
Abstract.....	20
1. Introdução.....	21
2. Material e Métodos.....	22
3. Resultados e Discussão .....	31
4. Conclusões.....	39
5. Referência Bibliográfica.....	39
<b>CAPÍTULO III</b> .....	43
<i>UTILIZAÇÃO DE OVOS DE CODORNAS JAPONESAS (COTURNIX</i> <i>COTURNIX JAPONICA) PARA ANÁLISE DA TAXA DO TURNOVER</i> <i>ISOTÓPICO DO <math>\delta^{13}\text{C}</math></i> .....	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45

1. Introdução.....	46
2. Material e Métodos.....	48
3. Resultados e Discussão .....	54
4. Conclusões.....	59
5. Referência Bibliográfica.....	60
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>63</b>
<b>IMPLICAÇÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	18
<b>Tabela 1.</b> Composição centesimal, valor nutricional calculado e sinal isotópico das dietas na fase de crescimento. ....	26
<b>Tabela 2.</b> Composição centesimal, valor nutricional calculada e sinal isotópico das dietas da fase de postura. ....	27
<b>Tabela 3.</b> Média e desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do sangue por dia de idade expressos em ‰ dos tratamentos ASFB e ASFCO. ....	32
<b>Tabela 4.</b> Média e desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do plasma por dia de idade expressos em ‰ dos tratamentos ASFB e ASFCO. ....	33
<b>Tabela 5.</b> Valores calculados em unidade dias da meia-vida (T) e troca de total de átomos de carbono ( $t_{(99\%)}$ ) do sangue e plasma das codornas no período de crescimento. ....	34
<b>Tabela 6.</b> Valores calculados em unidade dias da meia-vida (T) e troca de total de átomos de carbono ( $t_{(99\%)}$ ) do sangue e plasma das codornas a partir da substituição das dietas..	37
<b>CAPÍTULO III</b> .....	43
<b>Tabela 1.</b> Composição centesimal, nutricional e sinal isotópico das dietas da fase de crescimento.....	50
<b>Tabela 2.</b> Composição centesimal, nutricional e sinal isotópico das dieta da fase de postura.....	51
<b>Tabela 3.</b> Valores calculados da meia-vida (T) e troca de total de átomos de carbono ( $t_{(99\%)}$ ) do ovo inteiro (gema + albúmen), gema e albúmen dos tratamentos experimentais (ASFCO-MSFC e MSFCO-ASFCO) a partir do dia de substituição das dietas.....	57

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	18
<b>Figura 1.</b> Curvas de diluição isotópica do carbono no sangue das codornas dos tratamentos ASFB (a) e ASFCO (b) no período de crescimento. ....	31
<b>Figura 2.</b> Curvas de diluição isotópica do carbono no plasma das codornas dos tratamentos ASFB (a) e ASFCO (b) no período de crescimento. ....	32
<b>Figura 3.</b> Curvas de diluição isotópica do carbono no sangue das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFCO (b) no período de postura.....	35
<b>Figura 4.</b> Curvas de diluição isotópica do carbono no plasma das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFCO (b) no período de postura.....	35
<b>CAPÍTULO III</b> .....	43
<b>Figura 1.</b> Curvas de diluição isotópica do carbono no ovo (gema+albúmen) das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFCO (b) em função do intervalo de avaliação.....	55
<b>Figura 2.</b> Curvas de diluição isotópica do carbono na gema dos ovos das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFCO (b) em função do intervalo de avaliação.....	55
<b>Figura 3.</b> Curvas de diluição isotópica do carbono no albúmen dos ovos das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFCO (b) em função do intervalo de avaliação.....	56

## LISTA DE APÊNDICE

	<b>Página</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	65
<b>Figura 1.</b> Representação da incorporação isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ (em módulo) no plasma e sangue de codornas de postura.....	66
<b>Tabela 1.</b> Incorporação isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ (em módulo) do sangue e plasma de codornas de postura nos dias de idade.....	67

*CAPÍTULO I*  
**CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## 1. Introdução

As codornas são aves da ordem dos galináceos, Família *Fasianidae* e Gênero *Coturnix*. A codorna considerada doméstica é a codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*), espécie para produção de ovos, enquanto a codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) é destinada para produção de carne (MURAKAMI & ARIKI, 1998).

A criação de codornas, com finalidade de produção de carne e ovos, tem se tornado cada vez mais uma atividade de interesse econômico no Brasil. Como em qualquer outra exploração animal, o sucesso normalmente depende da qualidade dos animais, controle sanitário, manejo e alimentação.

A composição química do ovo de codorna indica que a gema consiste de aproximadamente 30% de gordura e 19% de proteína, enquanto que para o ovo de galinha são de 34 e 16%, respectivamente. No albúmen, a proteína varia entre 11 e 9,5% para os ovos de codorna e galinha, respectivamente. Os lipídios na gema do ovo de codorna são compostos de aproximadamente dois terços (67,5%) de lipídios neutros e um terço (32,5%) de fosfolipídios, proporções semelhantes estão presentes nos ovos de galinhas, patas e peruas. Quanto a minerais (cálcio, fósforo e ferro) não há diferenciação entre os ovos de codornas e galinhas, mas em relação às vitaminas os ovos de codornas apresentam em média 300 mg de vitamina A, 0,12 mg de tiamina, 0,85 mg de riboflavina e 0,10 mg de niacina, enquanto que nos ovos de galinhas são encontrados 221 mg, 0,089mg, 0,32mg e 0,089 mg respectivamente (MORAES & ARIKI, 2000).

A coturnicultura é um setor da avicultura que está em franco crescimento com grande produtividade e rentabilidade, como consequência do rápido crescimento das aves, da maturidade precoce, da alta taxa de postura e do baixo consumo de ração (MURAKAMI & FURLAN, 2002). No entanto, ainda são escassas as informações nas áreas de manejo e nutrição, dificultando a criação e contribuindo para o aumento no custo de produção desta espécie. Em virtude de sua importância zootécnica, é necessário o esclarecimento de algumas características, como por exemplo, o tempo de incorporação da dieta nas diversas fases de criação dessas aves. Para isso a técnica de isótopos estáveis, que já vem sendo utilizada de forma satisfatória como ferramenta para a determinação de *turnover* em diversos animais com finalidade zootécnica pode ser útil na coturnicultura.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Coturnicultura

No cenário da produção avícola brasileira, durante muitos anos, a coturnicultura foi considerada como atividade alternativa para pequenos produtores. Apesar disso, o efetivo de codornas em 2010 foi de aproximadamente 13.070.900 aves (IBGE, 2012), apresentando aumento de 45% em relação ao registrado em 2008.

Em função de características singulares como pequena exigência de espaço, baixo consumo de ração, pequeno intervalo entre gerações, maturidade sexual precoce, rusticidade e alta taxa de crescimento inicial, a exploração comercial de codornas se encontra, nos últimos anos, em expansão. Estes fatores possibilitaram a caracterização da codorna como excelente ave, tanto para produção de carne como de ovos, em diferentes regiões do país (BERTO, 2012).

Segundo dados registrados pelo Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE, 2009), durante os anos de 2006 a 2007 houve uma variação na produção de 25,8 %, saltando de 123,706 para 131,045 milhões de dúzias de ovos de codornas. Em 2008, foram produzidos 157,781 milhões de dúzias com aumento de 20,4% relativo ao ano de 2007.

A Região Sudeste do Brasil é a maior produtora de codornas, independentemente da finalidade, produção de carne ou de ovos. Em 2009, esta região alojava 64,9% das codornas do cenário nacional, sendo São Paulo, o estado com maior efetivo de codornas (48,67%), com destaque para o município de Bastos (12,1%).

Segundo Silva et al. (2011), o Brasil é atualmente o segundo maior produtor mundial de ovos de codornas da espécie *Coturnix coturnix japonica* (codorna japonesa).

As exportações brasileiras de ovos de galinha cresceram 111% de janeiro a outubro de 2008, quando comparadas a igual período de 2007, passando de US\$ 33 milhões para US\$ 69 milhões. De janeiro a outubro de 2008, as exportações brasileiras para países árabes cresceram 423% em relação ao mesmo período de 2007, saltando de US\$ 6,14 milhões para US\$ 32,14 milhões. Em volume, passaram de 16,5 milhões de dúzias, nos primeiros dez meses de 2007, para 46,7 milhões de dúzias de janeiro a outubro de 2008 (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2008).

Interessante observar que as regiões de maior produção de ovos de codorna, também são polos tradicionais na produção de ovos de galinhas. Fato que pode ser resultado das crises sofridas pelos produtores de ovos de galinhas nos últimos anos, devido ao baixo valor do produto. Produtores em crise viram a possibilidade de investir na coturnicultura, como forma de diversificar a produção de ovos ou como nova área em expansão a ser aproveitada, sem grandes custos de investimento (PASTORE et al., 2012).

Para manter a posição obtida em escala de produção, além da conquista de novos mercados, torna-se necessário conhecer os efeitos de temperaturas elevadas, prevalentes na maioria das regiões brasileiras durante grande parte do ano, sobre o desempenho e qualidade dos ovos de codornas japonesas para que se possam adotar medidas corretivas a fim de minimizar estes efeitos sobre a produção e ainda promover maior bem-estar às aves.

## 2.2. Isótopos estáveis

O termo isótopo é originado do grego, *iso* significa mesmo ou igual e, *topos* significa lugar, e refere-se ao fato de dois ou mais elementos ocuparem a mesma posição na tabela periódica. Já o vocábulo estável é referente a não emissão de radiação.

Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, com o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons e, conseqüentemente, com diferentes massas. Por possuírem sua camada eletrônica igual, ou seja, com o mesmo número de elétrons, pode-se inferir que os isótopos são elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas (eletrosfera) e diferentes propriedades físicas (núcleo) (CLARK & FRITZ, 1997).

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

Os diferentes números de massas dos isótopos possibilitam a sua identificação, através da espectrometria de massas, ou seja, é possível quantificar os diferentes isótopos de um mesmo elemento químico (GROOT, 2004).

Os isótopos de núcleos instáveis, também são chamados de radioisótopos, sofrem desintegração espontânea, por emissão de partículas nucleares ou radiação

eletromagnética, e geram os isótopos radiogênicos. Os isótopos de núcleos estáveis não se desintegram e correspondem a aproximadamente 270 nuclídeos (TIERZO, 2012).

Os isótopos ambientais são elementos em abundância e de ocorrência natural no nosso planeta, como o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre (CHON'S); principais bioelementos de interesse em estudos das áreas de biológicas e disciplinas afins, pois, fazem parte da estrutura de carboidratos, lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos (DNA, RNA).

Os bioelementos são formados por um isótopo dominante: carbono-12 ( $^{12}\text{C}$ ), hidrogênio-1 ( $^1\text{H}$ ), oxigênio-16 ( $^{16}\text{O}$ ), nitrogênio-14 ( $^{14}\text{N}$ ), enxofre-32 ( $^{32}\text{S}$ ) e um ou dois isótopos mais pesados, por exemplo: carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), hidrogênio ( $^2\text{H}$ ), oxigênio-17 ( $^{17}\text{O}$ ), oxigênio-18 ( $^{18}\text{O}$ ), nitrogênio-15 ( $^{15}\text{N}$ ), enxofre-33 ( $^{33}\text{S}$ ) e enxofre-34 ( $^{34}\text{S}$ ) e com uma abundância natural menor (PRESTON, 1992).

São estes isótopos de baixa abundância que incitam a novas oportunidades para o uso de isótopos como traçadores em estudos bioquímicos, biológicos e ambientais.

A medida da relação entre isótopos estáveis é realizada por espectrometria de massas, que detecta a concentração dos diferentes isótopos dos elementos. O enriquecimento isotópico relativo é obtido pela expressão  $\delta X_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}}) - 1] \cdot 10^3$ .

A simbologia da expressão indica que  $\delta X_{(\text{amostra, padrão})}$  é o enriquecimento da razão isotópica do elemento químico em questão, de uma dada amostra em relação ao seu respectivo padrão internacional em partes per mil (‰) e R significa razão isotópica do isótopo pesado em relação ao leve (ex:  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ;  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) da amostra e do padrão, respectivamente. O padrão utilizado para o carbono é o fóssil de *Belemnitella americana* da formação PeeDee (PDB), da Carolina do Sul (EUA) e, para o nitrogênio, o  $\text{N}_2$  atmosférico (CRISS, 1999).

Quando o valor da composição isotópica é positivo, a proporção do isótopo estável mais pesado é maior na amostra, em relação ao padrão. Já quando o valor é negativo, a amostra é empobrecida no isótopo estável mais pesado, comparado ao padrão.

### 2.3. Plantas do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>

A utilização dos isótopos estáveis ambientais na Zootecnia, e a aplicabilidade em fisiologia, metabolismo, nutrição e rastreabilidade nos animais começa com a sua principal fonte de alimentação: as plantas e seus subprodutos.

A fonte primária do carbono para as plantas terrestres é o CO<sub>2</sub> atmosférico, o qual possui valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -7,7‰. De acordo com seu ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos principais: C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>.

Durante o ciclo fotossintético, o primeiro composto orgânico sintetizado pode conter três (Ciclo de Calvin) ou quatro átomos de carbono (Ciclo Hatch-Slack) (SCHIMEL, 1993). As plantas que possuem ciclo bioquímico onde o primeiro composto orgânico sintetizado possui três átomos de carbono são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C<sub>3</sub>; pertencem a este grupo cerca de 85% das espécies vegetais (grande parte das dicotiledôneas; maioria das árvores, arbustos, além de alimentos conhecidos, como soja, arroz, trigo, cevada entre outros). Por outro lado, as plantas em que o primeiro composto orgânico formado possui quatro átomos de carbono são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C<sub>4</sub>; neste grupo estão algumas dicotiledôneas e grande parte das monocotiledôneas (milho, sorgo, cana-de-açúcar e outras gramíneas tropicais ou subtropicais) (LEHNINGER et al., 1995; GANNES et al., 1998).

Ao longo de todas estas etapas nas plantas, o carbono sofre discriminação isotópica, ocorrendo diminuição da concentração de <sup>13</sup>C e aumento da concentração de <sup>12</sup>C. Nas plantas C<sub>3</sub>, o valor de  $\delta$  varia de -22‰ a -34‰, dependendo da espécie, e nas plantas C<sub>4</sub> este valor encontra-se entre -9‰ a -16‰. A diferença entre estes valores é devido principalmente à rota bioquímica da produção de carboidratos, por exemplo, plantas C<sub>3</sub> reduzem o CO<sub>2</sub> a 2 moléculas de ácido 3-fosfoglicerato (3 átomos de carbono) através da enzima ribulose carboxilase oxigenase (RubisCO ou RudPase), que discrimina o <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, resultando em valores de  $\delta^{13}\text{C}$  relativamente baixos; todavia, as plantas C<sub>4</sub> reduzem o CO<sub>2</sub> a ácido aspártico ou ácido málico (ambos com 4 átomos de carbono), através da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcarboxilase), que não discrimina o <sup>13</sup>C como a RudPase, originando valores de  $\delta^{13}\text{C}$  mais altos (BOUTTON,

1996; GANNES et al., 1998; SILVA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; DUCATTI, 2007).

A diferença natural, de 14‰ mais rica em  $^{13}\text{C}$ , em plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_4$ , em relação às plantas do ciclo  $\text{C}_3$ , possibilita utilizar essas plantas e seus subprodutos como traçadores naturais em animais, sem a necessidade de síntese de compostos enriquecidos em carbono-13 ou a utilização de isótopos radioativos (METGES et al., 1990).

#### **2.4. Isótopos estáveis em animais**

Os animais utilizam os alimentos para obtenção de energia e crescimento. A composição isotópica do carbono-13 no tecido animal reflete a sua dieta, com variabilidade de 1 a 4‰ (DeNIRO & EPSTEIN, 1978; TIESZEN & BOUTTON, 1989; HARE et al., 1991; HOBSON & CLARCK, 1992).

A composição isotópica dos tecidos animais serve como traçador natural na rastreabilidade das diferentes dietas com distintas assinaturas isotópicas. Por outro lado, a relação entre a composição isotópica do material ingerido e a do tecido animal pode responder ao status nutricional, taxa de *turnover* e rota biossintética (KOCK, et al. 1994).

Partindo do pressuposto que a razão isotópica dos elementos do corpo dos consumidores geralmente assemelha-se a suas dietas, tem-se uma ferramenta potencialmente poderosa para pesquisas realizadas com aves de postura (CARRIJO et al., 2000; DENADAI et al. 2009), frangos de corte (PELICIA et al., 2011; CRUZ et al., 2012), codornas de corte (MÓRI et al., 2007), peixes (ZUANON et al., 2006; LIMA, 2010), ovinos (MARTINS, 2010), mel (SOUZA-KRULISKI et al., 2010), suínos (CALDARA et al., 2010), ecologia alimentar (BISI et al., 2012), bovinos de leite (CHESSON et al., 2010), bovino de corte (GUO et al., 2010), entre outras.

Para interpretar a composição isotópica em tecidos animais é necessário entender o papel de três fontes principais de variação isotópica: a composição isotópica da dieta; os fracionamentos entre a dieta e o tecido dos consumidores; e o tempo em que o valor isotópico das fontes demora em refletir nos tecidos do consumidor (taxa de *turnover*) (NEWSOME et al., 2010).

## 2.5. Turnover

Existe um estado de equilíbrio dinâmico no interior celular, no qual a biossíntese é constante e exatamente contrabalançada por igual velocidade de degradação. Este processo de troca metabólica, “renovação celular”, é também chamado de “lavagem celular”.

O *turnover* consiste na síntese do novo tecido no corpo e da degradação do velho. A velocidade na qual ocorre a degradação do tecido velho refere-se ao *turnover* metabólico e pode ser determinada pela comparação nas alterações observadas da composição isotópica relativa ao crescimento. Cada tecido ou fração bioquímica pode apresentar memória isotópica própria em função do conteúdo isotópico da alimentação e da taxa de renovação bioquímica. O *turnover* pode ocorrer por meio de renovação tecidual resultante do processo de síntese e degradação em tecidos adultos e/ou pelo próprio crescimento nos tecidos em formação (diluição isotópica) (ZUANON et al. 2006).

Os tecidos mais ativos metabolicamente (fígado e plasma sanguíneo) possuem taxas de *turnover* mais elevadas, refletindo a dieta recente, de poucos dias. Tecidos com taxas metabólicas intermediárias refletem uma dieta de semanas a meses, como no caso do músculo, pele, cérebro e hemácias, enquanto que tecidos menos ativos, como barbatanas e dentes (estruturas laminares que os cetáceos da *Parvordem Mysticeti* apresentam na boca), refletem uma dieta de anos (TIESZEN et al., 1983; HOBSON & CLARK 1992; WALKER et al., 1999).

Ducatti et al. (2002), fundamentados em resultados da literatura, propuseram um modelo teórico-experimental capaz de exprimir os resultados do enriquecimento relativo de carbono em função do tempo de alimentação, fornecendo dietas contrastantes em  $\delta^{13}\text{C}$  à animais adultos chegando a equação  $\delta^{13}\text{C}_{(t)} = \delta^{13}\text{C}_{(f)} + [\delta^{13}\text{C}_{(i)} - \delta^{13}\text{C}_{(f)}]e^{-kt}$ , onde a simbologia adimensional empregada significa  $\delta^{13}\text{C}_{(t)}$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo;  $\delta^{13}\text{C}_{(f)}$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final,  $\delta^{13}\text{C}_{(i)}$  = enriquecimento isotópico do tecido na condição inicial e  $k$  = constante de troca (*turnover*) em função do tempo.

A meia-vida refere-se ao intervalo de tempo requerido para que o sinal do isótopo estável do tecido do consumidor alcance o valor médio entre a dieta original

observada e o que será verificado na nova dieta em equilíbrio. Neste sentido, o conceito da meia-vida ( $T = \ln 2/k$ ) torna-se um parâmetro de ordem prática a ser mensurado (DUCATTI et al. 2002).

Na equação,  $t = (-1/k)\ln(1 - f)$ , proposta por Wolfe & Chinkes (2005), observa-se que é possível encontrar o tempo necessário para determinar a fração ( $f$ ) de átomos trocados (remanescentes) no patamar de equilíbrio alcançado, desde que conheça a constante do *turnover*  $k$ .

Portanto a elucidação do *turnover* não apenas auxiliará no entendimento da taxa de mudança isotópica nos tecidos, como também servirá de base para futuros estudos com rastreabilidade de produtos de origem animal, autenticação de produtos e aperfeiçoamento de estudos ecológicos.

### **3. Justificativas e objetivos**

No Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP/Botucatu, fundamentados no sistema de equações de duas fontes e dois isótopos (DUCATTI, 2007), surgiu à linha de pesquisa que visa detectar, no produto final, a inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação de aves.

Inicialmente, Carrijo et al. (2006) rastrearam no músculo peitoral a inclusão de farinha de carne e ossos bovinos (FCOB) na alimentação de frangos de corte. Gottmann et al. (2008) identificaram no músculo peitoral a inclusão de farinha de vísceras de aves na alimentação, mesmo com a adição de outros ingredientes alternativos (farelo de trigo e levedura). Em seguida, Oliveira et al. (2010 e 2012), analisaram músculo peitoral, quilha e tíbia de frangos de corte, com o objetivo de identificar o melhor tecido para rastrear a presença de farinha de vísceras de aves na dieta de frangos de corte em alguma fase da criação. Denadai et al. (2008, 2009 e 2011) detectaram a farinha de carne e ossos bovinos, farinhas de origem animal, farinha de carne e ossos bovinos, mesmo com a adição de outros ingredientes (leveduras, farelo de trigo, glúten de milho) em ovos de poedeiras comerciais. Em codornas de corte, Móri et al. (2007 e 2008) detectaram os subprodutos de origem animal utilizados nas dietas destas aves, no músculo peitoral, quilha e tíbia.

Entretanto, para o desenvolvimento dessa linha de pesquisa, Oliveira (2005) evidenciou a necessidade de realização de estudos que contribuam para o conhecimento

da assimilação isotópica do carbono em diferentes tecidos e em outras fases de criação dessas aves (*turnover*).

Neste sentido, o presente trabalho objetivou avaliar o *turnover* do  $\delta^{13}\text{C}$  pela substituição de dietas a base de plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_3$  em sangue, plasma, ovos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) e suas frações (gema e albúmen) utilizando a técnica de isótopos estáveis.

O **Capítulo II**, denominado “*TURNOVER ISOTÓPICO DO  $\delta^{13}\text{C}$  NO SANGUE E PLASMA DE CODORNAS JAPONESAS (COTURNIX COTURNIX JAPONICA) NAS FASES DE CRESCIMENTO E POSTURA*”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **Brazilian Journal of Poultry Science**. O objetivo deste estudo foi avaliar o *turnover* do  $\delta^{13}\text{C}$  pela substituição de dietas a base de plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  (fase de crescimento);  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_3$  (fase de postura) em sangue e plasma de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) utilizando a técnica de isótopos estáveis.

O **Capítulo III**, denominado “*UTILIZAÇÃO DE OVOS DE CODORNAS JAPONESAS (COTURNIX COTURNIX JAPONICA) PARA ANÁLISE DA TAXA DO TURNOVER ISOTÓPICO DO  $\delta^{13}\text{C}$* ”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **Brazilian Journal of Poultry Science**. O objetivo deste estudo foi avaliar o *turnover* do  $\delta^{13}\text{C}$  pela substituição de dietas do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_4$  para  $\text{C}_3$  utilizando ovos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) e suas frações (gema e albúmen) perante a técnica de isótopos estáveis.

#### 4. Referências Bibliográficas

AVICULTURA INDUSTRIAL. **Exportação de ovos para os países árabes quintuplicaram**. Disponível em <[http://www.aviculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/WebSite/Noticias/exportacao-de-ovos-para-os-paises-arabes-quintuplicaram,36788,20081118090935\\_B\\_868.Asp](http://www.aviculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/WebSite/Noticias/exportacao-de-ovos-para-os-paises-arabes-quintuplicaram,36788,20081118090935_B_868.Asp)>. Acesso em: 14 dez. 2008.

BERTO, D.A. **Temperatura ambiente e nutrição de codornas japonesas**. 2012. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

BISI, T.L.; LAILSON-BRITO, J.; MALM, O. Ecologia alimentar em mamíferos marinhos: técnicas de estudo. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 210-234, 2012.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. chap. 2, p. 47-82.

CALDARA, F.R.; DUCATTI, C.; BERTO, D.A.; DENADAI, J.C.; GARCIA, R.G.; FERREIRA, V.M.O.S.F.; Glutamina e *turnover* do carbono da mucosa intestinal de leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2664-2669, 2010.

CARRIJO, A.S. **Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras, pela técnica dos isótopos estáveis do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), provenientes das rações formuladas com plantas do ciclo  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  e nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ )**. 2000. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C; SARTORI, J.R.; TRINCA, L; SILVA, E.T; Traceability of bovine meat bone meal in poultry by stable isotope analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, p.37-42, 2006.

CHESSON, L.A.; VALENZUELA, L.O.; O'GRADY, S.P.; CERLING, T.E.; EHLERINGER, R., J.R. Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios of Milk in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.4, p.2358-2368, 2010.

CLARK, I.; FRITZ, P. **Environmental isotopes in hydrogeology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997. 328 p.

CRISS, R.E. **Principles of stable isotope distribution**. New York: Oxford University Press., 1999. 254p.

CRUZ, V.C.; ARAUJO, P.C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; POLYCARPO, G.V.; ZANETTI, L.H.; DUCATTI, C. Poultry offal meal in chicken: Traceability using the technique of carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) stable isotopes. **Poultry Science**, v.91, p. 478-486, 2012.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; MÓRI, C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O.; BORDINHON, A.M. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 10, p. 147-152, 2008.

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

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; GOTTMANN, R. Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovinos em ovos de poedeiras comerciais pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 2760-2766, 2011.

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

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2007. 205 p. (Apostila do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia).

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

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

GOTTMANN, R.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; MORI, C.; MITUO, M.A.O.; SARTORI, J.R. Rastreabilidade de subprodutos de origem animal em dietas com levedura e trigo para frangos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1641-1647, 2008.

GROOT, P.A. **Handbook of stable isotope analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 2004. v.1, p. 1234.

GUO, B.L.; WEI, Y.M.; PAN, J.R.; LI, Y. Stable C and N isotope ratio analysis for regional geographical traceability of cattle in China. **Food Chemistry**, p. 915–920, 2010.

HARE, P.E.; FOGEL, M.L.; STAFFORD, W.; MITCHELL A.D.; HOERING, T.C. The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. **Journal of Archaeological Science**, v.18. p.277-292, 1991.

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

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, v.94, p.189-197, 1992b.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>, Acessado em: 28 jan. 2012.

KOCK, P.L.; FOGEL, M.L.; TUROSS, N. Tracing the diets of fossil animals using stable isotopes. In: LAJTHA, K.; MICHENER, R.H. (Ed). **Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. p.63-92.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. Sarvier: São Paulo, 1995.

LIMA, E.J.V.M.O. **Utilização de isótopos estáveis de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  na identificação de bacalhau *Gadus* e outras espécies de peixes salgados secos**. 2010. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

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

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

MORAES, V.M.B.; ARIKI, J. Importância da nutrição na criação de codornas e qualidades nutricionais do ovo e carne de codorna. In: **III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**. Mogi das Cruzes, p.97-103, 2000.

MORI, C.; GARCIA, E.A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; PELICIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O.; BORDINHON, A.M. Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) stable isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, p.263-269, 2007.

MORI, C.; GARCIA, E.A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O. Poultry offal meal traceability in meat quail tissues using the technique of stable carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.10, p.45-52, 2008.

MURAKAMI, A.E.; ARIKI, J. **Produção de codornas japonesas**. Jaboticabal: Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, 1998. 79p.

MURAKAMI, A.E.; FURLAN, A.C. Pesquisas na nutrição e alimentação de codornas em postura no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 2002, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. p.113-120.

NEWSOME, S.D.; CLEMENTZ, M.T., KOCH, P.L. Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology. **Marine Mammal Science**, v.26, p.509-572, 2010.

OLIVEIRA, A.C.B.; SALIMON, C.I.; CALHEIROS, D.F.; FERNANDES, F.A.; VIEIRA, I.; CHARBEL, L.F.; PIRES, L.F.; SALOMÃO, M.S.M.B.; NOGUEIRA, S.F.; VIERIRA, S.; MOREIRA, M.Z.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B. Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 285-288, 2002.

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

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

OLIVEIRA, R.P.; DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; SARTORI, J.R.; CRUZ, V.C. Isotopic traceability in body tissues and in different breeding periods of broilers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1325-1334, 2012.

PASTORE, S.M.; OLIVEIRA, W.P.; MUNI, J.C.L. 180. **Panorama da coturnicultura no Brasil**.v. 9, n. 06, nov/dez., 2012. Disponível em: <[http://www.nutritime.com.br/arquivos\\_internos/artigos/180%20Panorama%20da%20coturnicultura\\_.pdf](http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/180%20Panorama%20da%20coturnicultura_.pdf)>. Acesso em: 21 jan. 2013.

PELICIA, V.C.; ZAVARIZEL, K.C.; DUCATTI, C.; STRADIOTTI, A.C.; PEZZATO, A.C.; ARAUJO, P.C.; MITUO, M.A.O.; MADEIRA, L.A.; SARTORI, J.R. Nucleotídeos na dieta de frangos de corte e seus efeitos sobre taxa de *turnover* da mucosa intestinal antes e após lesões causadas por coccidiose. **Ciência Rural, Santa Maria**,v.41, n.9, p.1652-1659, set, 2011.

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

SCHIMEL, D.S. **Theory and application of tracers**. San Diego: Academic Press, 1993. p.119.

SILVA, M.B.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B.; OLIVEIRA, M.B.; FERREIRA, M.A. Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 4, p. 184-191, 1999.

SILVA, J.H.V.; JORDÃO FILHO, J.; COSTA, F.G.P.; LACERDA, P.B.V.; VARGAS, D.G.V.; LIMA, M.R. Exigências nutricionais de codornas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 21., 2011, Maceió. **Anais...** Brasília: ABZ, 2011. p. 1-15.

SOUZA-KRULISKI, C.R.; DUCATTI, C.; FILHO, W.G.; ORSI, R.O.; SILVA, E.T. Estudo de adulteração em méis brasileiros através de razão isotópica do carbono. **Ciências Agrotecnologia de Alimentos**, v.34, n.2. 2010.

TIERZO, V. L.; **Turnover do carbono nos tecidos de suínos em diferentes fases de crescimento**. 2012. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p. 32-37, 1983.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W. Stable carbon isotopes in terrestrial ecosystem research. In: RUNDEL P.W.; EHLERINGER, J.R.; NAGY, K.A. (Eds). **Stable isotopes in ecological research ecological studies**. New York, 1989. p.167-195.

WOLFE, R.; CHINKES, D.L. **Isotope tracers in metabolic research**. Principles and Prattice of kinetic analysis. New Jersey : John Wiley & Sons, 2005. 474p.

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

***CAPÍTULO II***

***TURNOVER ISOTÓPICO DO  $\delta^{13}\text{C}$  NO SANGUE E  
PLASMA DE CODORNAS JAPONESAS (*COTURNIX  
COTURNIX JAPONICA*) NAS FASES DE CRESCIMENTO  
E POSTURA***

***Turnover* isotópico do  $\delta^{13}\text{C}$  no sangue e plasma de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) nas fases de crescimento e postura**

**Resumo** - O estudo objetivou avaliar a diferença de incorporação do sinal isotópico de dietas a base de plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  contendo ou não farinha de origem animal na fase de crescimento e o *turnover* do  $\delta^{13}\text{C}$  pela substituição de dietas com base  $\text{C}_3$  ou  $\text{C}_4$  na fase de postura, em sangue e plasma de codornas japonesas. O período experimental foi dividido entre o período de crescimento (1-43 dias de idade) e o de postura (50-98 dias de idade). Foram utilizadas 300 codornas japonesas, sexadas para o sexo feminino com 1 dia de idade distribuídas em três tratamentos na fase de crescimento e dois na fase de postura. Os tratamentos da fase de crescimento foram constituídos de dietas a base de arroz (planta  $\text{C}_3$ ) e farelo de soja, contendo ou não farinha de carne e ossos bovinos (FCO) e a base de milho (planta  $\text{C}_4$ ) contendo FCO, o qual foi mantido. Na fase de postura houve a substituição das dietas, de  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4$  e de  $\text{C}_4$  para  $\text{C}_3$ , todos contendo FCO. Foram coletadas amostras de sangue e plasma nos dias de idade 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 20, 26, 33 e 43 na fase de crescimento e 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 e 98 da fase de postura. Os resultados obtidos de troca de átomos total e meia-vida no sangue e plasma na fase de crescimento revelou diferença de incorporação  $\delta^{13}\text{C}$  na dieta com FCO, já na postura foi possível observar a diferença do *turnover* após a troca das dietas.

**Palavras-chave:** Farinha de carne e ossos bovinos, incorporação isotópica, plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , substituição de dietas.

**$\delta^{13}\text{C}$  isotope *turnover* in blood and plasma of japanese quail  
(*Coturnix coturnix japonica*) during the growing and laying**

**ABSTRACT** – The study aimed to evaluate the difference in the isotopic incorporation of diets based on plant photosynthetic  $\text{C}_3$  cycle or not containing animal meal in the growth phase and the turnover of the  $\delta^{13}\text{C}$  by replacing diets based on  $\text{C}_3$  or  $\text{C}_4$  do posture in blood and plasma of japanese quail. The experimental period was divided into the growth period (1-43 days of age) and laying (50-98 days of age). A total of 300 Japanese quail, sexed for female with 1 day old in three treatments in the growth phase and two in the laying phase. The treatments of the growth phase consisted of diets based on rice ( $\text{C}_3$  plant) and soybean meal, with or without meat and cattle bones (FCO) and maize ( $\text{C}_4$  plant) containing FCO, which was maintained. In the laying diets were replaced from  $\text{C}_3$  to  $\text{C}_4$  and  $\text{C}_3$  to  $\text{C}_4$ , each containing FCO. Blood samples were collected and plasma in the old days 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 20, 26, 33 and 43 in the growth phase and 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 and 98 of the laying phase. The results of exchange of atoms and total half-life in blood and plasma during growth revealed difference in  $\delta^{13}\text{C}$  incorporation in the diet with FCO, since the posture was possible to observe the difference in *turnover* after switching diets.

**Key words:** Meat and cattle bones, isotopic incorporation,  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plants, replacement diets.

## 1. Introdução

Os isótopos são átomos de um determinado elemento que possuem o mesmo número de prótons, mas diferem quanto ao número de massa (soma de prótons e nêutrons no núcleo), devido às diferenças no número de nêutrons contidos no núcleo do átomo. Esses isótopos são estáveis quando a razão próton/nêutron está, aproximadamente, entre 1 e 1,5. (Bisi *et al.*, 2012).

A técnica de isótopos estáveis tem sido utilizada para o estabelecimento de esboço geral da via metabólica, empregando a forma isotópica de um dado elemento químico para marcar um metabólito, considerando que a composição dos tecidos do consumidor reflete a sua dieta. Um dos avanços mais significativos realizados com este método foi à descoberta de que os componentes macromoleculares das células e dos tecidos sofrem um processo constante de renovação metabólica. Existe um estado de equilíbrio dinâmico no interior celular, no qual a biossíntese é constante e exatamente contrabalançada por igual velocidade de degradação (Maneta & Cecílio, 2003). Este processo de troca metabólica, “renovação celular”, é também chamado de taxa de reposição de tecidos biológicos ou taxa de *turnover*.

Os tecidos mais ativos metabolicamente (fígado e plasma sanguíneo) possuem taxas de *turnover* mais elevadas, refletindo a dieta recente, de poucos dias. Tecidos com taxas metabólicas intermediárias refletem uma dieta de semanas a meses, como no caso do músculo, pele, cérebro e hemácias, enquanto que tecidos menos ativos, como dentes e barbatanas, refletem uma dieta de anos (Tieszen *et al.*, 1983; Hobson & Clark, 1992; Walker *et al.*, 1999; Alves-Stanley & Worthy, 2009).

A diferença natural, de 14‰ mais rica em  $^{13}\text{C}$ , em plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_4$ , em relação às plantas do ciclo  $\text{C}_3$ , possibilita utilizar essas plantas e seus

subprodutos como traçadores naturais em animais, sem a necessidade de síntese de compostos enriquecidos em carbono-13 ou a utilização de isótopos radioativos (Metges *et al.*, 1990).

Hobson & Clark (1992) observaram que analisar frações separadas do sangue, por exemplo, o plasma, permite refletir a dieta recente, pois possuem taxas de *turnover* mais elevadas assim como o fígado.

Outra vantagem da utilização de sangue é que permite amostragem múltipla do mesmo indivíduo, criando assim a possibilidade de controlar as alterações de dieta através do tempo sem que a ave seja sacrificada.

O objetivo do estudo foi avaliar a diferença na incorporação do sinal isotópico de dietas a base de plantas do ciclo fotossintético C<sub>3</sub>, contendo ou não farinha de origem animal no sangue e plasma na fase de crescimento das codornas e o *turnover* do  $\delta^{13}\text{C}$  pela substituição de dietas com base C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub> na fase de postura, em sangue e plasma de codornas japonesas utilizando a técnica de isótopos estáveis.

## **2. Material e Métodos**

O experimento foi conduzido na UNESP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu/SP, no Laboratório de Nutrição de Aves/Câmara Bioclimática, durante os meses de fevereiro a maio de 2012. O protocolo experimental (nº56/2011-CEUA/FMVZ) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal desta Universidade.

As codornas foram obtidas de matrizes alimentadas com dietas compostas predominantemente por grãos de plantas de ciclo fotossintético C<sub>4</sub>. Ao nascerem,

possuíam em seus tecidos corporais sinais isotópicos de  $^{13}\text{C}$  semelhantes ao da dieta dessas matrizes.

O período experimental foi dividido em 2 períodos: crescimento (1-43 dias) e postura (50 -98 dias de idade) .

O programa de luz utilizado na fase de crescimento foi o de luz natural e de 17 horas de luz na fase de postura, este período de luz foi controlado por relógio automático (timer) que permitia apagar as luzes à noite e acender de madrugada, conforme procedimento adotado nas granjas comerciais.

A temperatura e ventilação foram controladas a fim de manter uma zona de conforto térmico (temperatura termoneutra) durante todo o período de criação. O aquecimento inicial e resfriamento das salas foram realizados por meio da utilização de aparelhos aquecedores e de ar condicionado, dotados de controle automático de temperatura.

As aves foram alojadas e distribuídas em gaiolas de arame galvanizado, medindo 0,40m de altura, 0,50m de largura e 0,60m de profundidade, dispostas em três andares e localizadas em uma câmara climatizada de ambiente termoneutro, as gaiolas foram revestidas com folhas de jornal e sobre estas foram colocadas telas plásticas de malha de um centímetro para evitar fuga das aves e possíveis traumatismos nas pernas das mesmas e equipadas com bebedouro infantil e comedouro tipo bandeja.

Aos 14 dias foi realizada a debicagem de 1/3 do bico das aves, para evitar canibalismo e desperdício de ração.

Aos 32 dias de idade as aves foram transferidas para a sala de postura, a qual possuía 4,30 m de comprimento por 4,50 m de largura e 2,60 m de altura. A sala comportava duas baterias de gaiolas, sendo a capacidade de cada uma para 180 aves.

Cada bateria composta de cinco andares, com duas gaiolas por andar, com 1,00 m de comprimento por 0,34 m de largura e 0,16 m de altura. As gaiolas foram equipadas com comedouros, de chapa metálica galvanizada, e bebedouros tipo nipples.

### ***Fase de crescimento***

Foram utilizadas 300 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), sexadas para o sexo feminino e com 1 dia de idade. As aves foram alojadas em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e seis repetições, com água e a ração fornecida à vontade durante todo o período de crescimento.

Os tratamentos consistiam de ASFB: dieta à base quirera de arroz sem adição de farinha de carne e ossos bovinos, e ASFCO, dieta a base de quirera de arroz adicionada de farinha de carne e ossos bovinos.

No dia do alojamento foram coletadas aleatoriamente amostras de sangue e plasma das codornas, as demais coletas foram realizadas aos 2, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 20, 26, 33 e 43 dias de idade.

### ***Fase de postura***

Foram utilizadas 216 codornas com 50 dias de idade. O delineamento experimental utilizado no período de postura foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos, sendo cada tratamento com seis repetições. Os tratamentos consistiam de troca de alimentação C<sub>4</sub> para C<sub>3</sub> e C<sub>3</sub> para C<sub>4</sub>, ou seja: as aves que receberam ASFCO na fase de crescimento passaram a receber MSFCO (dieta a base de quirera de arroz adicionada de farinha de carne e ossos bovinos) na fase de postura e as codornas que

receberam MSFCO na fase de crescimento passaram a receber ASFCO na fase de postura.

Durante a fase de crescimento foi mantido um grupo de 108 aves consumindo dieta a base MSFCO, para que a nesta fase de postura pudesse ser realizada a troca da dieta.

As coletas foram realizadas nos dias de idade das codornas: 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 e 98. O primeiro dia tem por objetivo expressar a composição isotópica do alimento consumido antes da troca.

### ***Dietas***

A formulação, composição nutricional e o valor isotópico das dietas estão descritas nas Tabelas 1 e 2. Após a confecção foram colhidas amostras para a determinação da razão isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  das dietas.

As dietas experimentais foram formuladas de modo a atender as exigências das aves e os ingredientes utilizados estiveram seus teores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos, estabelecidos por Rostagno et al. (2011).

**Tabela 1.** Composição centesimal, valor nutricional calculado e sinal isotópico das dietas na fase de crescimento.

Ingredientes (%)	ASFB <sup>*</sup>	ASFCO <sup>**</sup>	MSFCO <sup>***</sup>
Milho moído	-	-	59,72
Arroz, quirera	56,56	60,28	-
Soja, farelo	37,87	32,55	33,71
Soja, óleo bruto	2,12	0,97	0,71
Farinha de carne e ossos	-	5,00	4,60
Fosfato bicálcico	1,55	-	-
Calcário calcítico	1,08	0,39	0,54
DL-Metionina	0,12	0,12	0,13
L-Lisina	-	0,05	0,06
Suplemento vit+min <sup>****</sup>	0,30	0,30	0,30
Sal comum	0,40	0,34	0,34
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Valor nutricional calculado</b>			
Energia metabolizável, kcal/kg	2900,00	2900,00	2900,00
Proteína bruta, %	22,00	22,00	22,00
Cálcio, %	0,90	0,90	0,90
Fósforo disponível, %	0,38	0,38	0,38
Fibra bruta,%	2,29	2,09	2,88
Metionina digestível,%	0,42	0,42	0,42
Metionina+cistina digestível, %	0,69	0,68	0,71
Lisina digestível, %	1,11	1,10	1,10
Sódio, %	0,18	0,18	0,18
<b>Sinal isotópico (Média±DP, n=3)</b>	<b>-28,79± 0,37</b>	<b>-28,38±0,03</b>	<b>-18,44±0,26</b>

ASFB<sup>\*</sup>: dieta à base quirera de arroz sem adição de farinha de carne e ossos bovino; ASFCO<sup>\*\*</sup>: dieta a base de quirera de arroz adicionada de farinha de carne e ossos bovinos; MSFCO<sup>\*\*\*</sup>: dieta a base de milho adicionada de farinha de carne e ossos bovinos e Suplemento vitamínico/mineral<sup>\*\*\*\*</sup>, níveis de garantia/kg de ração: Vit. A 6999,99 UI, Vit. D3 2000,00 UI, Vit. E 5,00 UI, Vit. K 1,59 mg, Vit. B2 3 mg, Vit. B12 8,00 mg, niacina 20,00 mg, ácido pantotênico 5,00 mg, colina 0,23 g, cobre 8,00 mg, ferro 50 mg, manganês 90 mg, zinco 50 mg, iodo 1,20 mg, selênio 0, 20 mg, B.H.T. 15,00 mg, bacitracina de zinco 20,00 mg.

**Tabela 2.** Composição centesimal, valor nutricional calculada e sinal isotópico das dietas da fase de postura.

Ingredientes (%)	MSFCO*	ASFCO**
Milho, grão	56,99	-
Soja, farelo	30,64	29,47
Soja, óleo bruto	1,13	1,98
Arroz, quirera	-	57,06
Farinha de carne e ossos	3,72	4,15
Fosfato bicálcico	-	-
Calcário calcítico	6,70	6,54
DL-Metionina	0,23	0,22
Suplemento vit+min***	0,30	0,30
Sal comum	0,29	0,28
Total	100,00	100,00
Valor nutricional calculado		
Energia metabolizável, kcal/kg	2800,00	2800,00
Proteína bruta, %	20,00	20,00
Cálcio, %	3,10	3,10
Fósforo disponível, %	0,32	0,32
Fibra bruta,%	2,66	1,90
Metionina digestível,%	0,50	0,50
Metionina+cistina digestível, %	0,76	0,73
Lisina digestível, %	0,96	0,96
Sódio, %	0,15	0,15
Sinal isotópico (Média±DP, n=3)	-18,19±0,13	-27,63±0,36

MSFCO\*: dieta à base milho com adição de farinha de carne e ossos bovinos; ASFCO\*: dieta a base de quirera de arroz adicionada de farinha de carne e ossos bovinos; Suplemento vitamínico/mineral\*\*\*, níveis de garantia/kg de ração: Vit. A 6999,99 UI, Vit. D3 2000,00 UI, Vit. E 5,00 UI, Vit. K 1,599 mg, Vit. B2 3 mg, Vit. B12 8,00 mg, niacina 20,00 mg, ácido pantotênico 5,00 mg, colina 0,23 g, cobre 8,00 mg, ferro 50 mg, manganês 90 mg, zinco 50 mg, iodo 1,20 mg, selênio 0,20 mg, B.H.T. 15,00 mg, bacitracina de zinco 20,00 mg.

### *Coletas e preparo de amostras*

Durante as seis primeiras coletas foi realizado um *pool* de três aves para compor cada amostra, devido ao tamanho corporal da espécie. Até a sétima coleta as codornas eram sacrificadas por deslocamento da articulação crânio-cervical, nas demais as coletas de sangue foram colhidas da veia braquial, da asa esquerda das aves, com seringa e

agulha descartável, sendo que cada ave analisada representou uma medida da unidade experimental.

Aproximadamente 2 mL de sangue era coletado de cada ave, esta quantidade era fracionada em 0,7 mL em microtubos plásticos para a amostragem de sangue e o restante em tubos de ensaio devidamente heparinizados e identificados.

Os tubos de ensaio foram centrifugados a uma velocidade de 5000 rpm em duração de 10 minutos. Após esta etapa o plasma foi pipetado em microtubos identificados e assim armazenados para o processamento.

Na etapa do processamento, as amostras foram liofilizadas em aparelho L108 (Liobras®). Primeiramente as amostras contidas nos microtubos plásticos foram acomodadas nas bandejas do equipamento. Estas bandejas foram acondicionadas em caixa criogênica contendo nitrogênio líquido, dando início ao processo de congelamento das amostras por 5 minutos.

Após este período estas bandejas foram retiradas da caixa criogênica e colocadas no liofilizador. A duração do processo de liofilização de 48 horas, a vácuo, a  $-55^{\circ}\text{C}$  e pressão em torno de  $50\mu\text{Hg}$ .

As amostras das dietas foram moídas em moinho criogênico (Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010), à  $-196^{\circ}\text{C}$  por 8 minutos, em frequência máxima a fim de obter material homogêneo de finíssima granulometria, com aspecto de talco (Ducatti, 2004).

As análises isotópicas das amostras foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIEA/IBB) da UNESP, *Campus* de Botucatu, de forma que o material liofilizado foi colocado em capsulas de estanho e

pesados em balança analítica de alta sensibilidade, aproximadamente, 50 a 70 µg de amostras de sangue e dietas e 70 a 90 µg de plasma.

Após a pesagem as cápsulas foram introduzidas, por meio de um amostrador automático no analisador Elementar, Flash 2000 *Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*, no qual, em presença de oxigênio e óxido de cobre, foram queimadas quantitativamente para dióxido de carbono. Os gases formados foram separados em colunas cromatográficas gasosa e analisados no espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific, Alemanha).

Os resultados serão expressos em notação  $\delta^{13}\text{C}$ , em relação ao padrão *PeedeeBelemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

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

Onde:  $\delta^{13}\text{C}$  = enriquecimento relativo da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra em relação ao padrão PDB, em partes per mil (‰) e R = razão isotópica ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) da amostra e do padrão.

Para mensurar o *turnover* isotópico do carbono (diluição isotópica) em um determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2 (Ducatti *et al.*, 2002):

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

Onde:  $\delta^{13}\text{C}(t)$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t);  $\delta^{13}\text{C}(f)$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final;  $\delta^{13}\text{C}(i)$  = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial; k = constante de troca (*turnover*) em  $\text{dia}^{-1}$  e t = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

A constante k engloba os processos de *turnover* metabólico de carbono e o acréscimo de compostos de carbono, ambos para o processo de diluição isotópica do carbono.

Para determinar o tempo de troca de 50% (meia-vida) e 99% de átomos de carbono, será utilizada a equação 3:

$$t = (-1/k) \ln (1-f) \quad (3)$$

Onde: t = tempo de troca do carbono; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo<sup>-1</sup> e f = fração de átomos trocados, neste caso 0,50 e 0,99.

O cálculo de troca total fornece confiabilidade no cálculo de meia-vida, ou seja, se o período experimental foi necessário para que ocorresse a troca total dos carbonos então o parâmetro meia-vida serve para comparação dos tratamentos.

### ***Análise dos dados***

Os resultados da incorporação de  $\delta^{13}\text{C}$  no sangue e plasma na fase de crescimento foram interpretados estatisticamente aplicando-se o teste t a 5% de probabilidade para a comparação das médias.

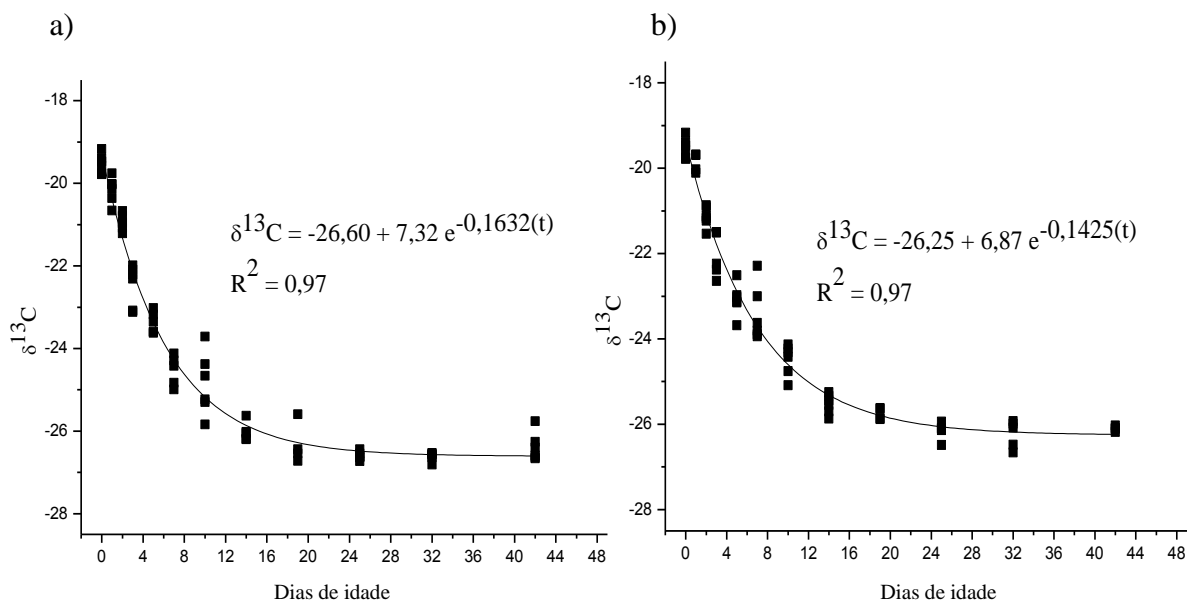
Os dados obtidos na fase de crescimento e postura foram analisados através do método de equações exponenciais do MINITAB<sup>®</sup> 16 Statistical Software 2010.

### 3. Resultados e Discussão

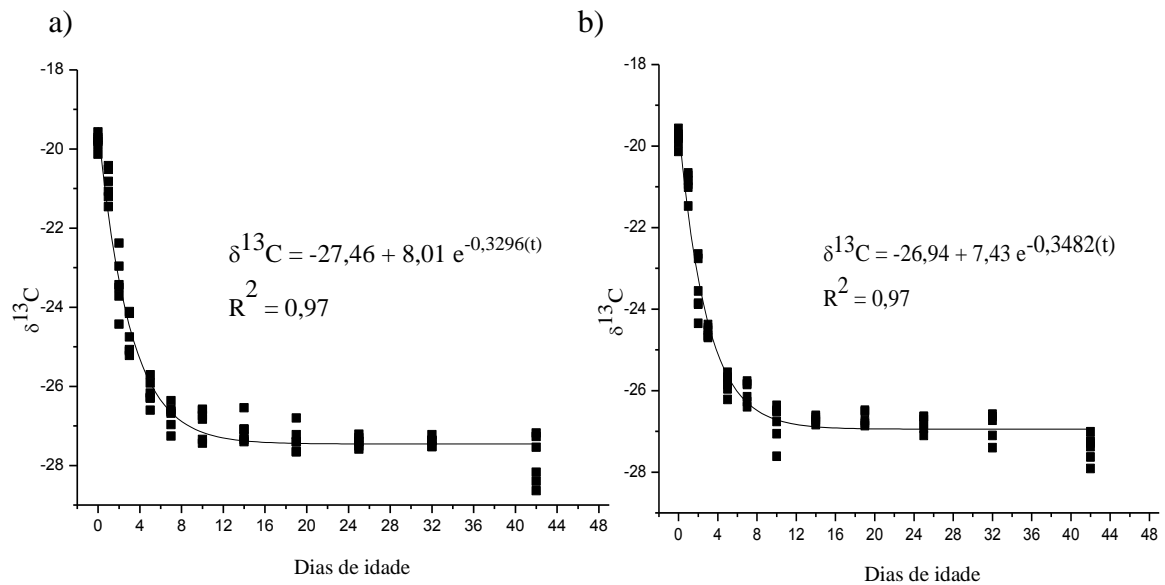
O valor do  $\delta^{13}\text{C}$  do sangue e plasma das aves foi alterado gradativamente ao longo do tempo até alcançar o patamar de equilíbrio. As Figuras 1, 2, 3 e 4 representaram os ajustes das diluições isotópicas do sangue e plasma durante o período experimental (crescimento e postura).

No período de crescimento o sinal isotópico inicial foi em média de  $-19,28\text{‰}$  para o ASFB e  $-19,38\text{‰}$  (Figura 1) para o tratamento ASFCO. Com o término desta fase os valores calculados foram de  $-26,60$  e  $-26,25\text{‰}$ , respectivamente.

O plasma coletado no dia zero apresentou valores médios de  $-19,45$  e  $-19,51\text{‰}$ , para os tratamentos ASFB e ASFCO. Aos 43 dias de idade os valores isotópicos chegaram a  $-27,46$  e  $-26,94\text{‰}$  (Figura 2), respectivamente para os tratamentos citados acima.



**Figura 1** Curvas de diluição isotópica do carbono no sangue das codornas dos tratamentos ASFB (a) e ASFCO (b) no período de crescimento.



**Figura 2.** Curvas de diluição isotópica do carbono no plasma das codornas dos tratamentos ASFB (a) e ASFCO (b) no período de crescimento.

**Tabela 3.** Média e desvio padrão dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do sangue por dia de idade expressos em ‰ dos tratamentos ASFB e ASFCO.

Dias de idade	ASFB	ASFCO
2	-20,16±0,31	-19,91±0,20
3	-20,95±0,19	-21,14±0,24
4	-22,47±0,50	-21,96±0,51
6	-23,35±0,25	-23,08±0,37
8	-24,53±0,36*	-23,43±0,65*
11	-25,26±0,48*	-24,37±0,24*
15	-26,02±0,23*	-25,53±0,23*
20	-26,37±0,44*	-25,75±0,13*
26	-26,60±0,09*	-26,15±0,20*
33	-26,12±0,05	-26,23±0,32
43	-26,38±0,34	-26,12±0,057

\*Médias que se diferem pelo Teste t ( $P < 0,05$ ) expresso na mesma linha

**Tabela 4.** Média e desvio padrão dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do plasma por dia de idade expressos em ‰ dos tratamentos ASFB e ASFCO

Dias de idade	ASFB	ASFCO
2	-20,92±0,40	-20,94±0,29
3	-23,40±0,69	-23,51±0,67
4	-24,74±0,49	-24,57±0,13
6	-26,16±0,31	-25,83±0,23
8	-26,75±0,31*	-26,05±0,26*
11	-26,92±0,40	-26,80±0,46
15	-27,12±0,31*	-26,72±0,09*
20	-27,36±0,31*	-26,44±0,60*
26	-27,40±0,13*	-26,81±0,18*
33	-27,40±0,11*	-26,53±0,93*
43	-27,87±0,61	-27,41±0,30

\*Médias que se diferem pelo Teste t ( $P<0,05$ ) expresso na mesma linha

Os valores isotópicos do sangue e plasma nos dias de coleta (Tabelas 3 e 4) entre os tratamentos foram diferentes a partir do dia oito ( $P<0,05$ ), esta diferença pode ser consequência das dietas possuírem sinais isotópicos distintos.

Observou-se que em decorrência da inclusão de farinha de carne e ossos bovinos (FCO) nas dietas, houve enriquecimento nos valores isotópicos de  $^{13}\text{C}$  (enriquecimento de 0,41‰ entre elas). Esse fato ocorreu provavelmente, devido às variações na composição percentual dos ingredientes nas dietas. Como as rações foram formuladas para serem isocalóricas e isoprotéicas entre si, com a inclusão de farinha de carne e ossos bovinos na ração, diminuiu-se a percentagem de farelo e óleo de soja (Tabela 1), dados corroborados por Carrijo *et al.* (2006), Móri *et al.*, (2007) e Denadai *et al.*,

(2008), que também incluíram farinhas de origem animal em dietas para frangos de corte, codornas de corte e poedeiras comerciais; respectivamente.

Através do modelo exponencial proposto, obteve-se a meia-vida e troca de 99% dos carbonos (troca total) para o sangue e plasma do período de crescimento (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores calculados em unidade dias da meia-vida (T) e troca de total de átomos de carbono ( $t_{(99\%)}$ ) do sangue e plasma das codornas no período de crescimento.

Material coletado	Tratamentos	T	$t_{(99\%)}$
Sangue	ASFB	4,9	32,3
	ASFCO	4,2	28,2
Plasma	ASFB	2,1	14
	ASFCO	1,9	13,2

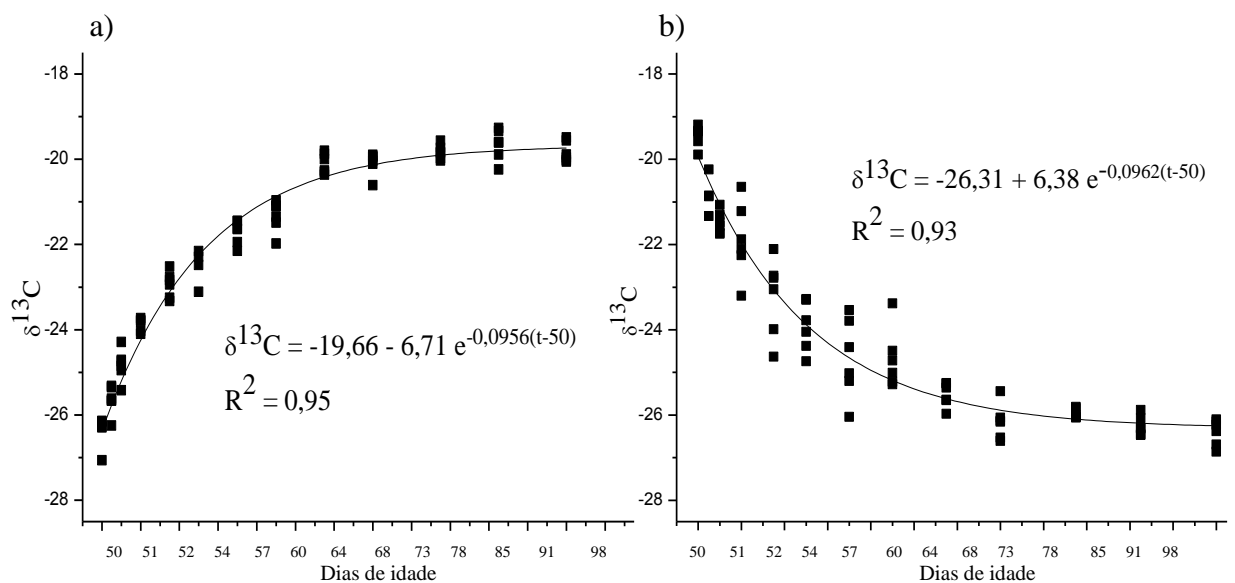
Por meio da observação do tempo de troca total de carbonos (Tabela 5), pode-se notar que o tempo experimental da fase de crescimento foi suficiente para que ocorresse incorporação do novo sinal isotópico no sangue e plasma, pois levou 32,3 e 28,2 dias para incorporação de 99% no sangue e 14 e 13,2 dias no plasma e o tempo de avaliação foi de 43 dias.

A incorporação da dieta contendo farinha de carne e ossos bovinos foi 14,3 e 9,5% mais rápida para o sangue e plasma respectivamente, quando comparada a dieta com fosfato bicálcico o que pode ser explicada pela disponibilidade de nutrientes. Segundo Pozza *et al.* (2005), as diferenças entre os coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos, além de ser influenciadas pela composição da matéria-prima utilizada, podem ainda ser decorrentes do processamento térmico ao qual as farinhas são submetidas. Ao serem contrastadas as digestibilidades médias dos aminoácidos essenciais e não-essenciais, nota-se a superioridade dos essenciais, o que, segundo Ost

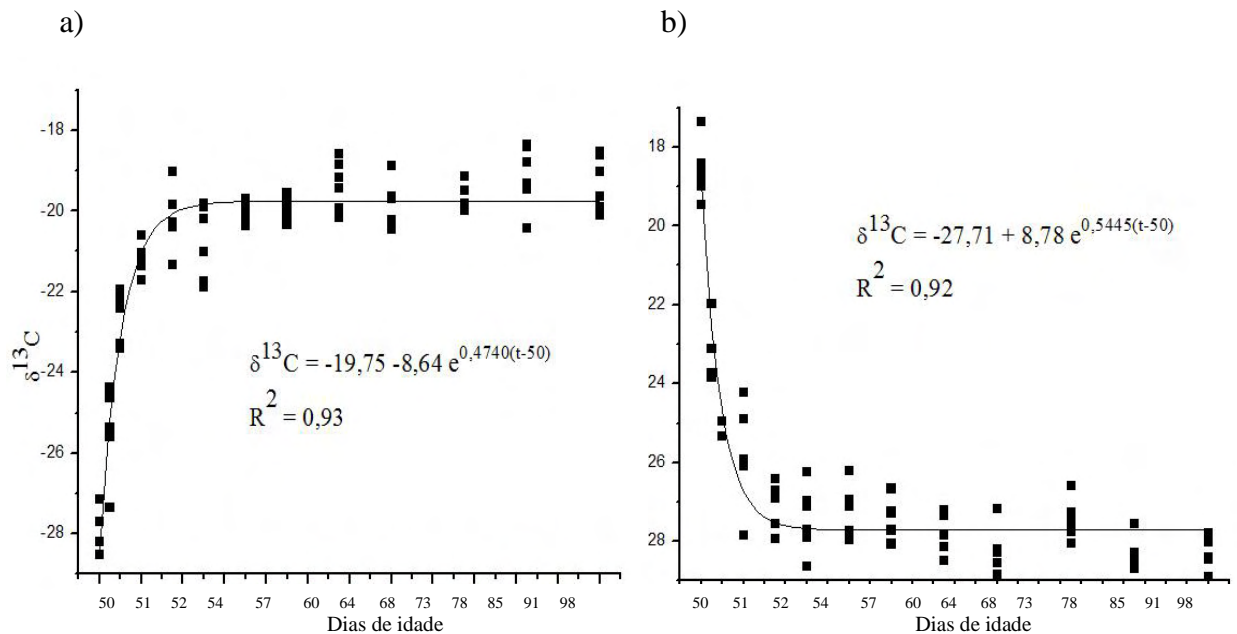
*et al.* (2007), pode indicar um mecanismo do organismo das aves para melhor aproveitamento dos aminoácidos nutricionalmente indispensáveis.

O sinal isotópico no início do período de postura do sangue das codornas do tratamento ASFCO-MSFCO, ou seja, com 50 dias de idade foi de  $-19,66\text{‰}$  e ao término de  $-26,37\text{‰}$  (Figura 3) e das aves do tratamento MSFCO-ASFCO de  $-19,93\text{‰}$  para  $-26,31\text{‰}$  (Figura 3) com a troca das dietas.

Nos tratamentos ASFCO-MSFCO e MSFCO-ASFCO o sinal isotópico inicial do plasma que eram de  $-28,39\text{‰}$  e  $-18,93\text{‰}$ , passaram para  $-19,75\text{‰}$  e  $-27,71\text{‰}$ , respectivamente, com a troca da dieta (Figura 4).



**Figura 3.** Curvas de diluição isotópica do carbono no sangue das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFCO (b) no período de postura



**Figura 4.** Curvas de diluição isotópica do carbono no plasma das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFCO (b) no período de postura.

Na Tabela 6 é possível observar os resultados da meia-vida e a troca de 99% dos carbonos para o sangue e plasma do período de postura. O tempo experimental de 49 dias foi suficiente para que ocorresse incorporação do novo sinal isotópico no sangue e plasma das aves, pois a duração do *turnover* de 99% de átomos de carbono foi de 48,2 e 47,8 dias para o sangue e 9,7 e 8,4 dias para o plasma.

Além disso, a incorporação da dieta C<sub>3</sub> foi 1,4 e 14% mais rápida para o sangue e plasma respectivamente, o que pode ser explicado pelas diferenças histo-anatômica destes dois grupos fotossintéticos.

Na composição química do arroz quirera e milho a percentagem de amido encontrado é de 74,45 e 62,66; respectivamente. Em relação aos aminoácidos limitantes, metionina e lisina, os valores digestíveis (%) são 0,17 e 0,24 para a quirera de arroz e de 0,15 e 0,19 para o milho (Rostagno *et al.*, 2011). Ou seja, plantas do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> tanto histo-anatomicamente quanto bromatologicamente possuem elementos mais

biodisponíveis do que as plantas C<sub>4</sub>, fatores que podem justificar a diferença de incorporação.

**Tabela 6.** Valores calculados em unidade dias da meia-vida (T) e troca de total de átomos de carbono ( $t_{(99\%)}$ ) do sangue e plasma das codornas a partir da substituição das dietas.

Material coletado	Tratamentos	T	$t_{(99\%)}$
Sangue	ASFCO-MSFCO	7,3	48,2
	MSFCO-ASFCO	7,2	47,8
Plasma	ASFCO-MSFCO	1,4	9,7
	MSFCO-ASFCO	1,2	8,4

É notável que o tempo de incorporação do novo sinal isotópico no plasma é mais rápido tanto no período de crescimento quanto ao de postura quando comparado ao do sangue (Tabela 5 e 6).

Estes resultados estão de acordo com Hobson & Clark (1993) que observaram maiores taxas de *turnover* do carbono para a fração plasma comparado a fração de células sanguíneas em corvos americanos (*Corvus brachyrhynchos*) e Pearson *et al.* (2003), que através de estudos indicaram que o plasma sanguíneo fornece informações de curto prazo (cerca de 1-4 dias), enquanto o sangue total fornece informações mais tardias (cerca de 8-12 dias) porque suas células têm maior longevidade do que os constituintes do plasma, tendo um ritmo mais lento na taxa de *turnover*.

O cálculo do tempo de troca total na substituição das dietas foi importante para concluir o quanto de troca total dos carbonos que o período experimental possibilitou. Quanto maior a troca maior é a confiabilidade do valor da meia-vida.

O valor confiável da meia-vida permite obter com garantia o tempo necessário para que o animal realize a troca total do sinal isotópico de uma nova dieta. Esta ferramenta pode ser utilizada, por exemplo, em auditorias evitando fraudes.

A hematopoiese (do grego: haima, haimatos: sangue; e poiein: fazer) no momento do nascimento é praticamente toda medular. Após o nascimento, a hematopoiese limita-se exclusivamente a medula óssea e compreende duas etapas: a infantil, que envolve a medula de todos os ossos, e a adulta, somente a medula dos ossos chatos e a das extremidades dos ossos longos. Esta informação pode ser utilizada para justificar a atividade hematopoiética limitada na fase adulta das codornas, ou seja, *turnover* do sangue mais lento na fase adulta das aves. Estudos realizados por Hobson & Clark (1992) foram realizados com codorna que já tinha alcançado o tamanho adulto, a fim de garantir que as mudanças nos valores de isótopos dos tecidos refletem o *turnover* do carbono verdadeiro e não uma combinação de crescimento e *turnover*.

Outra hipótese é que a taxa de crescimento é modificada como resultado do balanço entre os processos anabólicos e catabólicos teciduais. No início, a taxa de anabolismo é maior que a taxa de catabolismo, e o tecido cresce. Com o passar do tempo, a diferença entre os processos anabólicos e catabólicos vai diminuindo, portanto a taxa de *turnover* é alterada de acordo com a idade do animal (Macari *et al.*, 2008)

Uma das funções do sangue é absorção e transporte de nutrientes do lúmen intestinal para o fígado e demais tecidos e em relação ao plasma sanguíneo a albumina, uma de suas principais proteínas, atua como transportadora de muitas substâncias, incluindo ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina, cátions, microelementos e muitos fármacos. Estes são um dos motivos pela utilização do sangue e seus

constituintes em trabalhos, buscando no metabolismo da absorção de dietas para justificar diferentes taxas de *turnover* sem que o animal seja sacrificado.

#### **4. Conclusões**

De acordo com a realização do estudo, pode-se concluir que com a utilização da técnica dos isótopos estáveis de  $^{13}\text{C}$  foi possível observar que o reflexo do sinal isotópico é mais rápido no tratamento com farinha de carne e ossos em relação ao de fosfato bicálcico na fase de crescimento e o *turnover* de dietas  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_4$  para  $\text{C}_3$  na fase de postura, resultando a incorporação mais lenta de dietas a base de plantas  $\text{C}_4$  no sangue e plasma de codornas japonesas.

#### **5. Referência Bibliográfica**

Alves-Stanley CD, Worthy GAJ. Carbon and nitrogen stable isotope turnover rates and diet–tissue discrimination in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *The Journal of Experimental Biology* 2009; 2349-55.

Bisi TL, Lailson-Brito J, Malm O. Ecologia alimentar em mamíferos marinhos: técnicas de estudo. *Oecologia Australis*, 2012; 16 (2):210-34.

Carrijo AS, Pezzato AC, Ducatti C, Sartori JR, Trinca L, Silva ET; Traceability of Bovine Meat Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2006; 8: 37-42.

Denadai JC, Ducatti C, Sartori JR, Pezzato C, Móri C, Mituo MAO, Bordinhon AM. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2008; 10: 147-52.

Ducatti C, Carrijo AS, Pezzato AC, Mancera PFA. Modelo teórico e experimental de reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agrícola*, Piracicaba 2002; 59: 29-33.

Ducatti C. Isótopos estáveis ambientais. [Apostila]. Botucatu (SP): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2004; p.184.

Hobson KA, Clark RG. *Turnover* of  $^{13}\text{C}$  in cellular and plasma fractions of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. *Auk* 1993; 110: 638-41.

Hobson KA, Clark RG. Assessing avian diets using stable isotopes I: *turnover* of  $^{13}\text{C}$  in tissues. *The Condor* 1992; 94:181-18.

Macari M, Furlan RL, Gonzales E. Fisiologia aviaria aplicada a frangos de corte 2ª Edição. Funep, FCAV/Jaboticabal 2008; p. 280.

Manetta GI, Cecilio EB. Aplicação da técnica de isótopos estáveis na estimativa da taxa de *turnover* em estudos ecológicos: uma síntese. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, Maringá 2003; 25: 121-9.

Metges C, Kempe K, Schimidt HL. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the delta  $^{13}\text{C}$  value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition* 1990; 63: 187-96.

MINITAB<sup>®</sup> 16 .Statistical Software. State College: Minitab Inc.; 2010.

Móri C, Garcia EA, Ducatti C, Denadai JC, Pelícia K, Gottmann R, Mituo MAO, Bordinhon AM. Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) stable isotopes. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2007; 9: 263-9.

Ost PR, Rodrigues PB, Freitas RTF, Fialho RTF, Bertechini AG, Silva HO. Aminoácidos digestíveis verdadeiros de alguns alimentos proteicos determinados em galos cecectomizados e por equações de predição. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2007; 36: 1820-8.

Pearson SF, Levey DJ, Greenberg CH, del Rio C.M. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia* 2003; 135: 516-23.

Pozza PC, Gomes PC, Donzele JL, Rostagno HS, Pozza MSS, Lopes DC. Digestibilidade ileal aparente e verdadeira dos aminoácidos de farinhas de vísceras para suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2005, 34: 2334-7.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT, Euclides RF. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3 ed Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia; 2011. p.31-9, 160-6.

Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia*, Berlin 1983; 57: 32-7.

Walker J, Potter C, Mack S. The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflect through stable isotopes. *Marine Mammal Science* 1999; 15: 335-50.

*CAPÍTULO III*

**UTILIZAÇÃO DE OVOS DE CODORNAS JAPONESAS  
(*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) PARA ANÁLISE DA  
TAXA DO TURNOVER ISOTÓPICO DO  $\delta^{13}\text{C}$**

## **Utilização de ovos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) para análise da taxa do *turnover* isotópico do $\delta^{13}\text{C}$**

**RESUMO** – O estudo objetivou avaliar o *turnover* do  $^{13}\text{C}$  pela substituição de dietas do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_4$  para  $\text{C}_3$  nas estruturas que sintetizam ovos (albúmen + gema), albúmen e gema de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) utilizando a técnica de isótopos estáveis. Foram utilizadas 216 codornas japonesas, com 50 dias de idade, distribuídas em dois tratamentos em um período experimental de 48 dias. Anteriores aos 50 dias de idade metade das codornas consumiam dieta a base de plantas  $\text{C}_4$  (milho) e a outra metade a base de plantas  $\text{C}_3$  (arroz), ambas contendo farinha de carne e ossos bovinos. Houve substituição dessas dietas no período experimental, dieta a base  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4$  e vice versa. No total 12 ovos foram coletados de cada tratamento por dia de coleta, separando 6 para amostragem de ovo inteiro (gema+albúmen) e 6 para albúmen e gema. As coletas foram realizadas nos dias de idade das codornas: 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 e 98. Para determinar a taxa de *turnover* foi empregado o modelo exponencial de diluição isotópica, mediante os resultados foi possível observar que o tempo experimental de 48 dias foi suficiente para que ocorresse o *turnover* total nos ovos e suas frações, pois levaram 27,4 e 20,6; 28,6 e 27,3; 18,2 e 19,5 dias para a incorporação de 99% dos átomos de carbono da nova dieta nos ovos, gema e albúmen respectivamente. O reflexo do sinal isotópico da dieta foi mais rápido no albúmen, seguido pelo ovo e gema.

**Palavras-chave:** Albúmen, gema, ovo inteiro, diluição isotópica, plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$

## **Use of japanese quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*) to analyze the rate of *turnover* of $\delta^{13}\text{C}$ isotopic**

**ABSTRACT** – The study aimed to assess the *turnover* of  $^{13}\text{C}$  for replacing diets for  $\text{C}_4$  photosynthesis cycle  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  to  $\text{C}_3$  structures which synthesize eggs (albumen + yolk), albumen and yolk japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) using the stable isotope technique . 216 Japanese quails were used, with 50 days of age were assigned to two treatments in a trial period of 48 days. Prior to 50 days of age half of quail consumed diet based on  $\text{C}_4$  plants (maize) and half the base of  $\text{C}_3$  plants (rice), both containing meat and cattle bones. These diets were replaced during experimental diet based  $\text{C}_3$  to  $\text{C}_4$  and vice versa. In total 12 eggs were collected from each treatment per day collecting, separating 6 for sampling whole egg (yolk + albumen) and 6 for albumen and yolk. The collections were made in the old days the quails: 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 and 98. To determine the rate of employee *turnover* was the exponential model of isotopic dilution by the results it was observed that the experimental time of 48 days was enough that occurred the total *turnover* in eggs and their fractions, as led 27,4 and 20,6; 28,6 and 27,3; 18,2 and 19,5 days for the incorporation of 99% of the carbon atoms of the new diet on eggs, yolk and albumen respectively. The reflection of the isotopic signal of the diet was faster in albumen, followed by the egg and yolk.

**Key word:** Albumen, yolk, whole egg, isotopic dilution,  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plants.

## 1. Introdução

A palavra “isótopo” vem do grego ISO = igual ou mesmo e TOPOS = lugar, o que se refere a uma posição comum na tabela periódica de um elemento específico; onde o isótopo possui o mesmo número de prótons e número diferente de nêutrons (Ferreira, 2011). O termo estável refere-se a átomos que não emitem radiação.

Os isótopos estáveis de vários elementos são formados por um isótopo dominante (ex:  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ , e  $^1\text{H}$ ), e um ou dois isótopos mais pesados (ex:  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  e  $^2\text{H}$ ) com uma abundância natural menor (Ducatti, 2012). São estes isótopos de baixa abundância que incitam a novas oportunidades para o uso de isótopos como traçadores em estudos bioquímicos, biológicos e ambientais.

Existe um processo de discriminação isotópica que é chamado de fracionamento isotópico, o qual pode ser resumido como enriquecimento ou empobrecimento do isótopo pesado da amostra em estudo em relação a sua fonte (Pereira, 2007).

As plantas apresentam grupos distintos quanto a sua caracterização isotópica, principalmente com relação aos valores de  $\delta^{13}\text{C}$ . As plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  apresentam mecanismo fisiológico que discriminam diferentemente o carbono atmosférico. No ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  as plantas fixam o carbono via ciclo de Calvin e discriminam o  $\text{CO}_2$ , apresentando um valor médio de  $\delta^{13}\text{C}$  de -27‰, enquanto que as plantas do ciclo  $\text{C}_4$  fixam  $\text{CO}_2$  via ciclo de Hatcheslacker, no qual ocorre menor discriminação do  $\text{CO}_2$ , originando valor médio de  $\delta^{13}\text{C}$  de -13‰ (Boutton, 1996).

Os animais podem apresentar, nos seus tecidos celulares, composições isotópicas diferentes das características dos alimentos que consomem, talvez devido a três fatores: “memória” isotópica; fracionamento metabólico e direcionamento isotópico. O termo

memória isotópica significa que as alterações nas dietas dos animais não provocam mudanças imediatas na composição isotópica de seus tecidos (Lima, 2010).

A dinâmica de incorporação isotópica depende de vários fatores, como o tamanho e a taxa de crescimento do animal, a composição nutricional das dietas, ou o *turnover* catabólico inerente ao tipo de tecido biológico (Reich *et al.*, 2008).

Os tecidos mais ativos metabolicamente (fígado e plasma sanguíneo) possuem taxas de *turnover* mais elevadas, refletindo a dieta recente, de poucos dias. Tecidos com taxas metabólicas intermediárias refletem dietas de semanas a meses, como no caso do músculo, pele, cérebro e hemácias, enquanto que tecidos menos ativos, como dentes e barbatanas, dietas de anos (Tieszen *et al.*, 1983; Hobson & Clark, 1992; Walker *et al.*, 1999; Alves-Stanley & Worthy, 2009).

No ovo, assim como em outros produtos de origem animal (leite, fezes) não é possível calcular a taxa de renovação tecidual (*turnover*), uma vez que estes não são considerados tecidos. Entretanto, o estudo do “*turnover*” nestes produtos indica a taxa de deposição dos nutrientes para a sua formação, refletindo o metabolismo dos tecidos que geraram estes produtos. (Denadai *et al.*, 2006).

De acordo com Carrijo *et al.* (2000) a análise isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$  em ovos de aves poedeiras permite uma avaliação precisa de possíveis alterações na composição das rações, através de múltiplas amostragens, em curto espaço de tempo, sem o sacrifício do animal.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o *turnover* do  $\delta^{13}\text{C}$  pela substituição de dietas do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_4$  para  $\text{C}_3$  nos componentes que sintetizam os ovos utilizando a técnica de isótopos estáveis na gema, albúmen e ovo inteiro.

## 2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na UNESP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu/SP, na Câmara Bioclimática, durante os meses de março a maio de 2012.

Foram utilizadas 216 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) com 50 dias de idade. O protocolo experimental (n°56/2011-CEUA/FMVZ) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal desta Universidade.

As aves foram alojadas com 43 dias de idade em câmara climática para período de adaptação e, posteriormente, iniciando o período experimental sete dias após o alojamento.

A câmara bioclimática possuía 4,30 m de comprimento por 4,50 m de largura e 2,60 m de altura. A sala continha duas baterias de gaiolas, sendo a capacidade de cada uma para 180 aves. Cada bateria composta de cinco andares, com duas gaiolas por andar, com 1,00 m de comprimento por 0,34 m de largura e 0,16 m de altura. As gaiolas foram equipadas com comedouros, de chapa metálica galvanizada, e bebedouros tipo nipples.

Foram utilizadas apenas as gaiolas dos três primeiros andares. A densidade de alojamento utilizada foi de 0,019 m<sup>2</sup>/ave. A temperatura e ventilação foram controladas a fim de manter-se na zona de conforto térmico (temperatura termoneutra) durante todo o período de criação.

O resfriamento das salas foi realizado através da utilização de aparelhos de ar condicionado, dotados de controle automático de temperatura e o programa de luz utilizado no período experimental foi de 17 horas de luz.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos, sendo cada tratamento com seis repetições. Os tratamentos consistiam de troca de alimentação C<sub>4</sub> para C<sub>3</sub> e C<sub>3</sub> para C<sub>4</sub>, ou seja: as aves que receberam dieta contendo arroz quítera (ASFCO) na fase de crescimento passaram a receber dieta contendo milho moído (MSFCO) na fase de postura e as codornas que receberam MSFCO na fase de crescimento passaram a receber ASFCO na fase de postura.

As dietas experimentais foram formuladas de modo a atender as exigências das aves e os ingredientes utilizados estiveram seus teores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos, estabelecidos por Rostagno *et al.* (2011). A formulação, composição nutricional e o valor isotópico das dietas, estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

Após a formulação foram colhidas amostras para a determinação da razão isotópica <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C dessas dietas.

Aos 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 e 98 dias de idade de foram coletados aleatoriamente 12 ovos por tratamento, para a coleta das amostras de gema, albúmen e ovo (gema + albúmen).

Seis ovos foram utilizados para a amostragem de gema e albúmen. Após a separação as amostras foram armazenadas em microtubos plásticos devidamente identificados e congelados a -18°C. Separadamente, os outros seis ovos foram homogeneizados para amostragem de ovo inteiro (gema + albúmen). As amostras foram identificadas e congeladas a -18°C para armazenagem.

**Tabela 1.** Composição centesimal, valor nutricional calculado e sinal isotópico das dietas da fase de crescimento.

Ingredientes (%)	*MSFCO	**ASFCO
Milho, grão	59,72	-
Soja, farelo	33,71	32,55
Soja, óleo bruto	0,07	0,97
Arroz, quirera	0,53	60,28
Farinha de carne e ossos	4,60	5,00
Calcário calcítico	0,54	0,39
DL-Metionina	0,13	0,12
L-Lisina	0,06	0,05
***Suplemento vit+min	0,30	0,30
Sal comum	0,34	0,34
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Valor nutricional calculado</b>		
Energia metabolizável, kcal/kg	2900,00	2900,00
Proteína bruta, %	22,00	22,00
Cálcio, %	0,90	0,90
Fósforo disponível, %	0,38	0,38
Fibra bruta,%	2,88	2,09
Metionina digestível,%	0,42	0,42
Metionina+cistinadigestível, %	0,71	0,68
Lisina digestível, %	1,10	1,10
Sódio, %	0,18	0,18
<b>Sinal isotópico (Média±DP, n=3)</b>	<b>-18,44±0,26</b>	<b>-28,38±0,03</b>

\*MSFCO: dieta à base milho com adição de farinha de carne e ossos bovino; \*\*ASFCO: dieta a base de quirera de arroz adicionada de farinha de carne e ossos bovinos; \*\*\*Suplemento vitamínico/mineral, níveis de garantia/kg de ração: Vit. A 6999,99 UI, Vit. D3 2000,00 UI, Vit. E 5,00 UI, Vit. K 1,599 mg, Vit. B2 3 mg, Vit. B12 8,00 mg, niacina 20,00 mg, ácido pantotênico 5,00 mg, colina 0,23 g, cobre 8,00 mg, ferro 50 mg, manganês 90 mg, zinco 50 mg, iodo 1,20 mg, selênio 0, 20,001 mg, B.H.T. 15,00 mg, bacitracina de zinco 20,00 mg.

**Tabela 2.** Composição centesimal, valor nutricional calculado e sinal isotópico das dietas da fase de postura (50-98 dias de idade)

Ingredientes (%)	*MSFCO	**ASFÇO
Milho, grão	56,99	-
Soja, farelo	30,64	29,47
Soja, óleo bruto	1,13	1,98
Arroz, quirera	-	57,06
Farinha de carne e ossos	3,72	4,15
Calcário calcítico	6,70	6,54
DL-Metionina	0,23	0,22
***Suplemento vit+min	0,30	0,30
Sal comum	0,29	0,28
Total	100,00	100,00
Valor nutricional calculado		
Energia metabolizável, kcal/kg	2800,00	2800,00
Proteína bruta, %	20,00	20,00
Cálcio, %	3,10	3,10
Fósforo disponível, %	0,32	0,32
Fibra bruta,%	2,65	1,89
Metionina digestível,%	0,49	0,49
Metionina+cistinadigestível, %	0,76	0,72
Lisina digestível, %	0,95	0,96
Sódio, %	0,15	0,15
Sinal isotópico (Média±DP, n=3)	-18,19±0,13	-27,63±0,36

\*MSFCO: dieta à base milho com adição de farinha de carne e ossos bovino; \*\*ASFÇO: dieta a base de quirera de arroz adicionada de farinha de carne e ossos bovinos; \*\*\*Suplemento vitamínico/mineral, níveis de garantia/kg de ração: Vit. A 6999,99 UI, Vit. D3 2000,00 UI, Vit. E 5,00 UI, Vit. K 1,599 mg, Vit. B2 3 mg, Vit. B12 8,00 mg, niacina 20,00 mg, ácido pantotênico 5,00 mg, colina 0,23 g, cobre 8,00 mg, ferro 50 mg, manganês 90 mg, zinco 50 mg, iodo 1,20 mg, selênio 0, 20,001 mg, B.H.T. 15,00 mg, bacitracina de zinco 20,00 mg.

Na etapa do processamento, as amostras foram liofilizadas em aparelho L108 (Liobras®). As amostras contidas nos microtubos foram acomodadas nas bandejas do equipamento. Estas bandejas foram acondicionadas em caixa criogênica contendo nitrogênio líquido, dando início ao processo de congelamento das amostras por 5 minutos. Após este período estas bandejas foram retiradas da caixa criogênica e

colocadas no liofilizador. A duração do processo de liofilização de 48 horas, a vácuo, a  $-55^{\circ}\text{C}$  e pressão em torno de  $50\mu\text{Hg}$ .

Depois de secas as amostras de ovo inteiro (gema + albúmen) e gema foram acondicionadas em papel filtro devidamente identificadas para a extração de gordura feita no Laboratório de Análises Bromatológicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu. Os lipídeos das amostras de ovo e gema foram extraídos porque esses são relativamente pobres em carbono-13, e a extração deles facilita a comparação entre tecidos e frações com proporções lipídicas distintas (tecidos e dietas) (Tieszen *et al.*, 1983). De acordo com Denadai *et al.* (2006) as amostras foram imersas em éter etílico no aparelho Soxhlet e mantidas sob temperatura em torno de  $55$  a  $65^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Após este período as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas éter reconicionado as lavasse. Posteriormente as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora para que houvesse evaporação do éter.

As amostras de ovos, albúmen, gema e dietas foram moídas em moinho criogênico (Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010), à  $-196^{\circ}\text{C}$  por três minutos para os ovos e componentes e oito minutos para as dietas, em frequência máxima a fim de obter material homogêneo de finíssima granulometria, com aspecto de talco (Ducatti, 2012).

As análises isotópicas das amostras foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIEA/IBB) da UNESP, *Campus* de Botucatu, de forma que o material moído foi colocado em cápsula de estanho e pesado em balança analítica de alta sensibilidade, aproximadamente,  $50$  a  $70\ \mu\text{g}$  de amostras das dietas e ovos e suas frações (gema e albúmen).

Após a pesagem as cápsulas foram introduzidas, por meio de um amostrador automático no analisador Elementar, Flash 2000 *Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*, no qual, em presença de oxigênio e óxido de cobre, foram queimadas quantitativamente para dióxido de carbono. Os gases formados foram separados em colunas cromatográficas gasosa e analisado no espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific, Alemanha).

Os resultados foram expressos em notação  $\delta^{13}\text{C}$ , em relação ao padrão *PeedeeBelemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

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

Onde:  $\delta^{13}\text{C}$  = enriquecimento relativo da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra em relação ao padrão PDB, em partes por mil (‰) e R = razão isotópica ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) da amostra e do padrão. Adimensional.

Para mensurar o *turnover* isotópico do carbono (diluição isotópica) em determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2 (DUCATTI *et al.*, 2002):

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

Onde:  $\delta^{13}\text{C}_{(t)}$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t);  $\delta^{13}\text{C}_{(f)}$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final;  $\delta^{13}\text{C}_{(i)}$

= enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial;  $k$  = constante de troca (*turnover*) em  $\text{dia}^{-1}$  e  $t$  = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

A constante  $k$  engloba os processos de *turnover* metabólico de carbono e o acréscimo de compostos de carbono, ambos para o processo de diluição isotópica do carbono.

Para determinar o tempo de troca de 50% (meia-vida) e 99% de átomos de carbono foi utilizada a equação 3:

$$t = (-1/k) \ln (1-f) \quad (3)$$

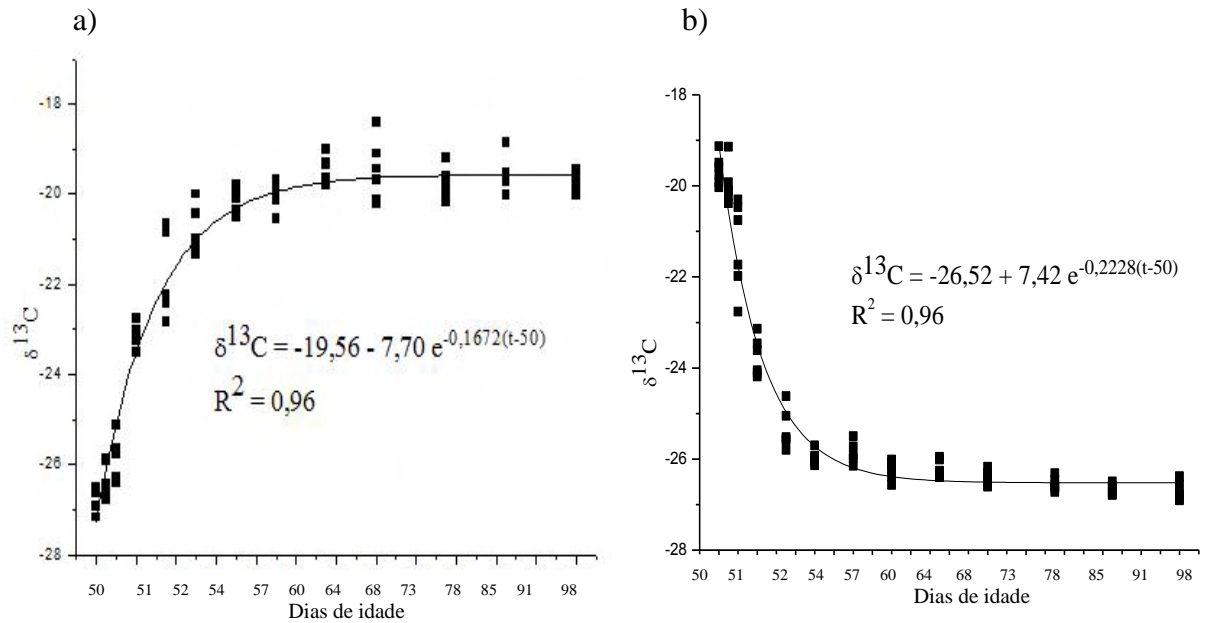
Onde:  $t$  = tempo de troca do carbono;  $k$  = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo<sup>-1</sup> e  $f$  = fração de átomos trocados, neste caso 0,50 e 0,99.

O cálculo de troca total fornece confiabilidade no cálculo de meia-vida, ou seja, se o período experimental foi necessário para que ocorresse toda troca dos carbonos da fração avaliada pelos da nova dieta, só assim o parâmetro meia-vida serve para comparação dos tratamentos.

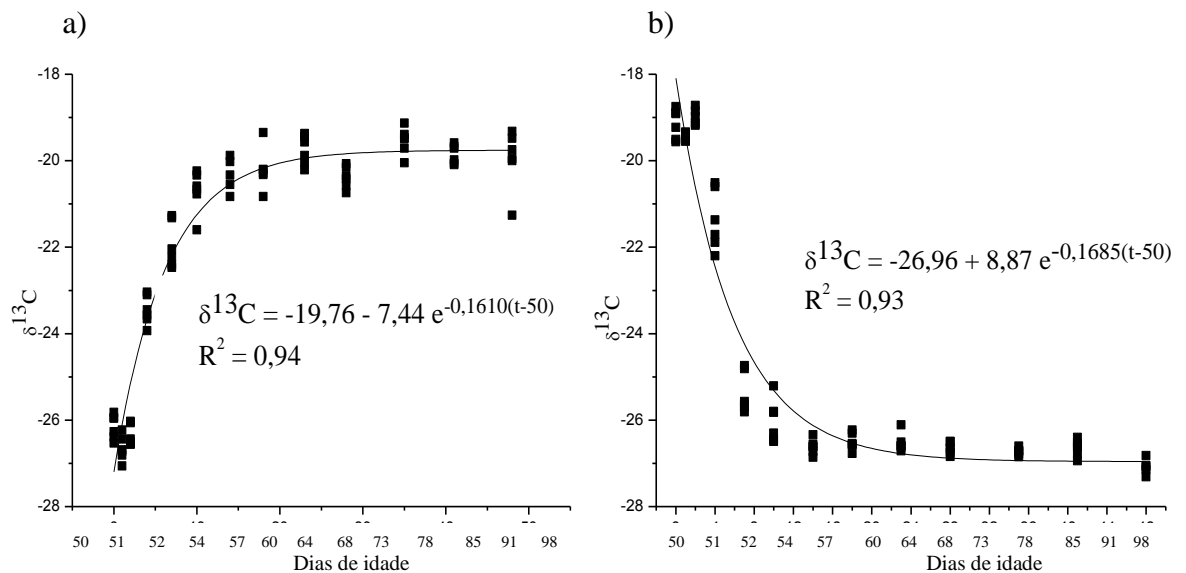
Os dados obtidos foram analisados através do método de equações exponenciais do MINITAB® 16 Statistical Software 2010.

### 3. Resultados e Discussão

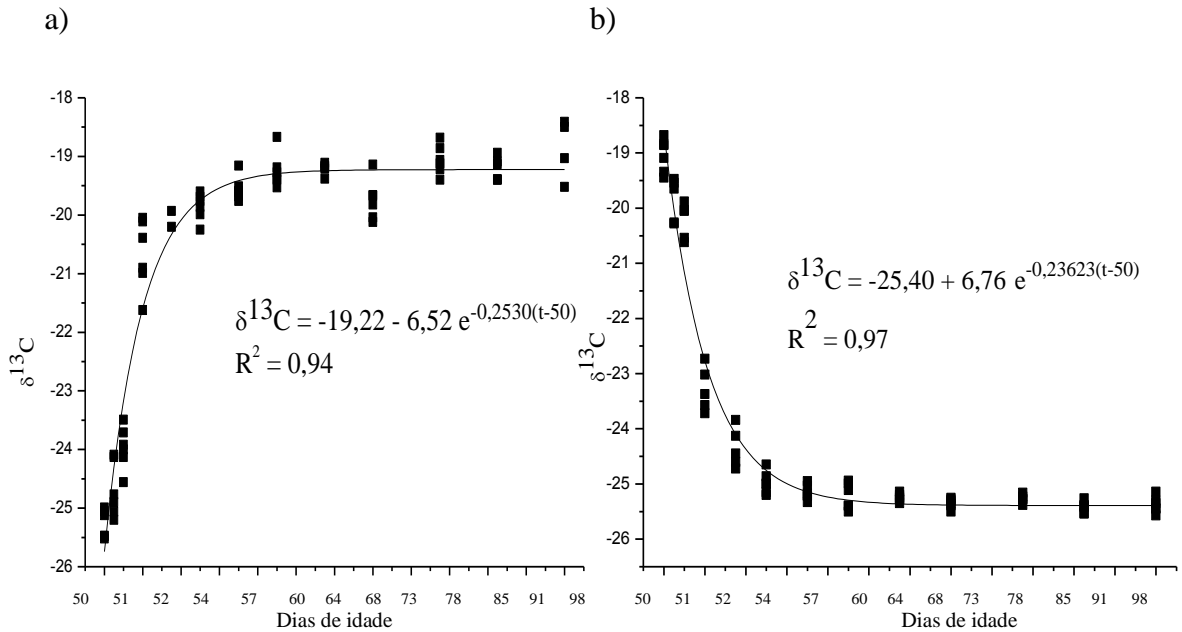
Durante o período experimental o valor do  $\delta^{13}\text{C}$  dos ovos (gema + albúmen) e de suas frações (gema e albúmen) foi alterado gradativamente ao longo do tempo até alcançar o novo patamar de equilíbrio. As Figuras 1, 2 e 3 representam os ajustes das diluições isotópicas do ovo, gema e albúmen, respectivamente.



**Figura 1.** Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono no ovo (gema+albúmen) das codornas dos tratamentos ASFÇO-MSFÇO (a) e MSFÇO-ASFÇO (b) em função do intervalo de avaliação.



**Figura 2.** Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono na gema dos ovos das codornas dos tratamentos ASFÇO-MSFÇO (a) e MSFÇO-ASFÇO (b) em função do intervalo de avaliação.



**Figura 3.** Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono no albúmen dos ovos das codornas dos tratamentos ASFSCO-MSFCO (a) e MSFCO-ASFSCO (b) em função do intervalo de avaliação.

Os ovos do tratamento ASFSCO-MSFCO o sinal isotópico no início do experimento foi em média de -27,26‰, e 48 dias após a troca da dieta, o sinal isotópico obtido foi em média de -19,56‰. No tratamento MSFCO-ASFSCO, o  $\delta^{13}\text{C}$  inicial era em média de -19,10‰ e no final em média de -26,52‰ (Figura 1).

Nas gemas dos ovos das codornas alimentadas com dietas à base de plantas  $\text{C}_3$  ao substituir a alimentação pela dieta  $\text{C}_4$  as razões isotópicas que eram de -27,20‰ passaram a -19,76‰. No tratamento que alterou a dieta de  $\text{C}_4$  para  $\text{C}_3$  (Figura 2) obteve comportamento em semelhante ao ovo (gema+albúmen), com valores isotópicos de -18,09 ‰ (inicial) e -26,96‰ (final).

As razões isotópicas do albúmen (Figura 3) que eram de -25,74‰ e -18,64‰ nos tratamentos ASFSCO-MSFCO e MSFCO-ASFSCO, respectivamente, passaram a -19,22‰ e -25,40‰ no final do período experimental.

Através do modelo exponencial proposto, obtiveram-se a meia-vida e tempo de troca de 99% dos carbonos (troca total) para o ovo, gema e albúmen. Por meio da observação do tempo de troca total de carbonos, pode-se notar que o tempo experimental de 48 dias foi suficiente para que ocorresse o *turnover* total nos ovos e suas frações, pois levaram 27,4 e 20,6; 28,6 e 27,3; 18,2 e 19,5 dias para a incorporação de 99% dos átomos de carbono da nova dieta nos ovos, gema e albúmen respectivamente. O tempo de incorporação da nova dieta (ASFCO-MSFCO) foi 4,7 e 37,2% mais lenta na gema quando comparada ao ovo e albúmen respectivamente. Para o tratamento com substituição MSFCO para ASFCO o tempo de incorporação do novo sinal isotópico na gema foi de 24,4 e 29,27% mais lento comparado aos outros componentes (ovo e albúmen, respectivamente).

**Tabela 3.** Valores calculados da meia-vida (T) e troca de total de átomos de carbono ( $t_{(99\%)}$ ) do ovo inteiro (gema + albúmen), gema e albúmen das codornas dos tratamentos ASFCO-MSFCO e MSFCO-ASFCO a partir do dia de substituição das dietas em unidade dias.

Frações	Tratamentos	T	$t_{(99\%)}$
Ovo	(ASFCO-MSFCO)	4,1	27,4
	(MSFCO-ASFCO)	3,1	20,6
Gema	(ASFCO-MSFCO)	4,3	28,6
	(MSFCO-ASFCO)	4,1	27,3
Albúmen	(ASFCO-MSFCO)	2,7	18,2
	(MSFCO-ASFCO)	2,9	19,5

Estes resultados estão de acordo com Carrijo *et al.* (2000) e Denadai *et al.* (2006), que avaliando as taxas de *turnover* no ovo (gema+albúmen) de poedeiras,

encontraram valores de meia-vida de 4,0 dias quando trocaram a dieta C<sub>3</sub> pela dieta C<sub>4</sub> e de 3,7 dias quando trocaram a dieta C<sub>4</sub> pela dieta C<sub>3</sub> para o primeiro estudo e de 3,8 na substituição de dietas C<sub>4</sub> para C<sub>3</sub> e 4,8 dias na substituição de C<sub>3</sub> para C<sub>4</sub> para o segundo estudo.

Hobson (1995), estudando *turnover* dos componentes dos ovos de codorna, afirma que o albúmen alcança novo equilíbrio em três a cinco dias e a gema em torno de oito dias; a explicação para a diferença encontrada para estes dados pode ser dada na diferença das dietas experimentais, além da idade das aves, que neste estudo estavam em início de produção.

O maior tempo para a incorporação dos carbonos da nova dieta na gema pode ser causado pela fisiologia da sua formação. Segundo Getty (1981), a fase de maturação do ooscito das aves tem início com o folículo no ovário e termina no oviduto. No desenvolvimento final do ooscito ocorre a deposição de gema em seu interior, que leva em torno de seis dias. A formação da gema ocorre através da incorporação ao citoplasma do ooscito de matéria prima, tais como: sais minerais, proteínas e lipídios.

Todavia, a formação da maior parte do albúmen ocorre de 2 a 3 horas no magno ou zona albuminifera, logo após a passagem pelo infundíbulo (Albino & Barreto, 2003). Processo este responsável pelo rápido *turnover* do albúmen, Hobson (1995), estudando *turnover* dos componentes dos ovos de codorna, afirma que devido às proteínas do albúmen serem sintetizadas de aminoácidos removidos diretamente do sangue no magno e o albúmen ser depositado rapidamente ao redor da gema, este reflete a nova dieta antes da gema.

O *turnover* do ovo, intermediário ao da gema e do albúmen, mostra a influência de cada componente (gema e albúmen) no processo de formação do ovo, onde a gema

leva mais tempo para refletir a nova dieta e o albúmen reflete mais rapidamente. Denadai et al. (2006) afirmaram que de acordo com o processo fisiológico da formação do ovo é importante observar que os resultados da razão isotópica do ovo (gema + albúmen) podem ter sofrido interferência em seu valor. Nos ovos colhidos no início do experimento, a gema pode ter fornecido carbonos referentes à ração anterior, enquanto que, o albúmen forneceu carbonos relacionados à nova dieta.

De acordo com as características físicas dos ovos de codornas, há uma contribuição de 55,74% de albúmen, 31,58% de gema e 12,66% de casca; em relação à composição química o albúmen e gema contribuem com 85,88 e 54,44g de umidade e 1,41 e 6,97g de carboidratos, respectivamente (Albino & Barreto, 2003). De acordo com estas composições foi possível observar que houve grande contribuição de massa de carbono na mistura ovo (gema+albúmen) pela gema se comparado ao albúmen no tratamento ASFCO-MSFCO.

A aliança entre a ferramenta dos isótopos estáveis e o conhecimento da nutrição e fisiologia aviária também é utilizada em estudos de ovos marcados, origem geográfica das aves e certificação de sistemas de criação. É técnica de grande importância na saúde, pois, trata-se de alimento de alto valor biológico, de baixo custo, e que pode suprir exigências nutricionais específicas nos humanos pela manipulação na nutrição das aves de acordo que é relatado em estudos recentes.

#### **4. Conclusões**

A utilização da técnica dos isótopos estáveis possibilita analisar o *turnover* na troca de ingredientes de dietas utilizado ovos de codornas. O albúmen é o primeiro a refletir o sinal isotópico da nova dieta, seguido pelo ovo inteiro e gema o que pode ser

explicado pelo processo fisiológico de formação destas frações. O tempo de incorporação no ovo inteiro se aproxima ao da gema pela maior contribuição de carbono oferecido por esta quando comparado ao albúmen.

## 5. Referência Bibliográfica

Albino LFT, Barreto SLT. Criação de codornas para a produção de ovos e carne. Viçosa: Aprenda Fácil 2003; p. 39 – 217.

Alves-Stanley CD, Worthy GAJ. Carbon and nitrogen stable isotope turnover rates and diet–tissue discrimination in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). The Journal of Experimental Biology 2009; 212: 2349-55.

Boutton TW. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: Boutton TW, Yamasaki S-I. (Eds.) Mass spectrometry of soils. New York: Marcel Dekker 1996; 47-82.

Carrijo AS, Pezzato AC, Ducatti C. Avaliação do Metabolismo Nutricional em Poedeiras pela Técnica dos Isótopos Estáveis do Carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ). Brazilian Journal of Poultry Science. p. 209-18, 2000.

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

Ducatti C, Carrijo AS, Pezzato AC, Mancera PFA. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agrícola* 2002; 59 (1): 29-33.

Ducatti C. Isótopos estáveis ambientais [apostila]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2012.

Ferreira TCG. Estudo da cadeia alimentar do cavalo-marinho *Hippocampus guttulatus* em condições de cultivo utilizando isótopos estáveis [Dissertação]. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria, 2011.

Getty R. Anatomia dos animais domésticos. 5 ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1981.

Hobson KA, Clark RG. Assessing avian diets using stable isotopes I: *turnover* of  $^{13}\text{C}$  in tissues. *The Condor*, 1992<sup>a</sup>; 94:181-8.

Hobson KA. Reconstructing avian using stable-carbon and nitrogen isotope analysis of egg components: patterns of isotopic fraction and turnover. *The Condor*, 1995; 97:752-62.

Lima EJVMO. Utilização de isótopos estáveis de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  na identificação de bacalhau *Gadus* e outras espécies de peixes salgados secos [Tese]. Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

MINITAB® 16. Statistical Software. State College: Minitab Inc; 2010.

Pereira AL. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectiva. *Revista Biociências* 2007; 13 (1-2): 16-27.

Reich KJ, Bjorndal KA, Martínez del rio, C. Effects of growth and tissue type on the kinetics of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  incorporation in a rapidly growing ectotherm. *Oecologia* 2008; 155: 651-63

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT, Euclides RF. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3 ed. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia; 2011.

Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia* 1983; 57:32-7.

Walker J, Potter C, Mack S. The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflect through stable isotopes. *Marine Mammal Science* 1999; 15: 335-50.

*CAPÍTULO IV*  
**Implicações**

## Implicações

No decorrer dos anos, devido a alguns acontecimentos, surgiu à necessidade da certificação do padrão alimentar vegetal dos animais e seus produtos. O mercado consumidor se tornou mais exigente e isto forçou o mercado agropecuário a impor inúmeras medidas no sentido de rastreabilidade dos produtos de origem animal (carne/leite/ovos). A estimativa do tempo de substituição total do carbono destes produtos pode estabelecer o tempo de carência sendo como alternativa evitar fraudes.

A utilização da técnica dos isótopos estáveis nos possibilita obter dados da incorporação do  $\delta^{13}\text{C}$  da dieta em diversos materiais coletados dos animais por meio da razão isotópica do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ).

A utilização de ovos e suas frações, gema e albúmen, possibilita analisar o *turnover* de dietas distintas, em espaço de tempo mais curto com seus respectivos  $\delta^{13}\text{C}$  sem que as aves sejam sacrificadas.

Seria interessante para futuros estudos a utilização de tratamentos com dietas verdes para obter a diferença dos valores isotópicos na incorporação de dietas com ou sem fonte de origem animal como também estudos envolvendo doses de medicamentos para assim avaliar o tempo de incorporação desta droga nos ovos.

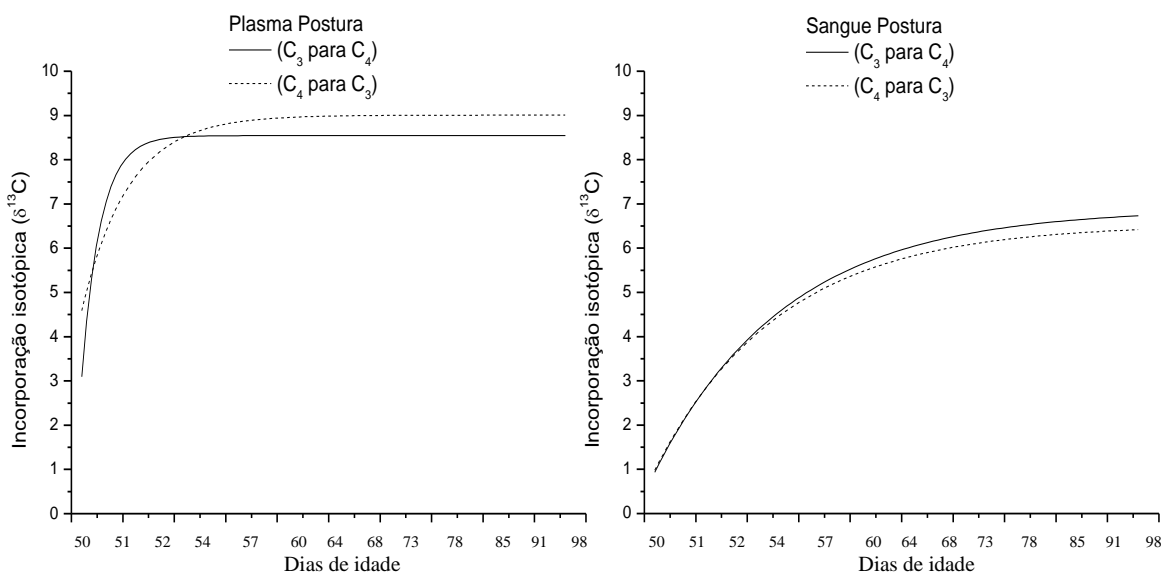
A avaliação minuciosa das dietas utilizadas nos trabalhos e aprofundamento na fisiologia avícola pode ser proposto em futuros estudos com a finalidade de enriquecer o nível de conhecimento em relação à rastreabilidade dos produtos de origem animal utilizando a técnica dos isótopos estáveis.

## *APÊNDICE*

## Apêndice (Capítulo II)

Com o objetivo de realizar comparação entre as curvas de substituição isotópica de  $C_3$  para  $C_4$  e de  $C_4$  para  $C_3$  foram realizados alguns artifícios matemáticos.

Para o cálculo de incorporação, foi feito a subtração dos valores isotópicos entre o dia 0 ( $\delta^{13}C_{inicial}$  da regressão das curvas de *turnover* do CAPÍTULO II) e os dados analisados nos dias de coleta, em módulo, os quais foram representados nas Figuras 1 e Tabela 1.



**Figura 1.** Representação da incorporação isotópica de  $\delta^{13}C$  (em módulo) no plasma e sangue de codornas de postura.

**Tabela 1.** Incorporação isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$  (em módulo) do sangue e plasma de codornas de postura nos dias de idade

Dias de idade	Sangue		Plasma	
	C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> Média $\pm$ DP	C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> Média $\pm$ DP	C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> Média $\pm$ DP	C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> Média $\pm$ DP
51	0,70 $\pm$ 0,33	0,89 $\pm$ 0,45	3,29 $\pm$ 0,57*	4,34 $\pm$ 0,71*
52	1,51 $\pm$ 0,37	1,55 $\pm$ 0,26	5,80 $\pm$ 0,61	6,22 $\pm$ 0,26
54	2,45 $\pm$ 0,17	1,95 $\pm$ 0,88	7,24 $\pm$ 0,37	6,91 $\pm$ 1,24
57	3,40 $\pm$ 0,30	3,29 $\pm$ 0,92	8,19 $\pm$ 0,76	7,74 $\pm$ 1,21
60	3,50 $\pm$ 0,65	3,99 $\pm$ 0,59	7,63 $\pm$ 0,92	8,50 $\pm$ 0,83
64	4,63 $\pm$ 0,28	4,74 $\pm$ 0,94	8,40 $\pm$ 0,25	8,38 $\pm$ 0,68
68	5,01 $\pm$ 0,37	4,75 $\pm$ 0,71	7,89 $\pm$ 1,37	8,52 $\pm$ 0,49
73	6,24 $\pm$ 0,24*	5,59 $\pm$ 0,28*	9,04 $\pm$ 0,61	8,80 $\pm$ 0,52
78	6,25 $\pm$ 0,27	6,23 $\pm$ 0,42	8,51 $\pm$ 0,61	9,30 $\pm$ 0,56
85	6,51 $\pm$ 0,17*	6,04 $\pm$ 0,11*	8,68 $\pm$ 0,33	8,53 $\pm$ 0,50
91	6,68 $\pm$ 0,36	6,32 $\pm$ 0,23	9,26 $\pm$ 0,78	9,43 $\pm$ 0,42
98	6,51 $\pm$ 0,24	6,47 $\pm$ 0,31	9,08 $\pm$ 0,67	9,51 $\pm$ 0,50

\*Médias que se diferem pelo Teste t ( $P < 0,05$ ) expresso na mesma linha